



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de Fin de Master Titulado:

“Patrones de dispersión global de la influenza A/H5N1: Análisis filogenético y temporal de aislamientos genómicos del virus”

Realizado por:

SOLÓRZANO FLORES AGUSTÍN MATEO

Director del proyecto:

Mgr. MALDONADO ORBE RUBÉN ALEXANDER

Como requisito para la obtención del título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

Quito, 01 de abril de 2026

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, SOLÓZANO FLORES AGUSTÍN MATEO, ecuatoriano, con Cédula de ciudadanía N° 1725454605, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido presentado anteriormente para ningún grado o calificación profesional, y se basa en las referencias bibliográficas descritas en este documento.

A través de esta declaración, cedo los derechos de propiedad intelectual a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido en la Ley de Propiedad Intelectual, reglamento y normativa institucional vigente.

SOLORZANO FLORES AGUSTÍN MATEO

C.I.: 1725454605

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.

MSc MALDONADO ORBE ALEXANDER

LOS PROFESORES INFORMANTES:

HERRERA YELA MANUEL ANDRÉS

ESPINOSA ESPINOSA JORGE PATRICIO

Después de revisar el trabajo presentado lo han calificado como apto para su defensa
oral ante el tribunal examinador.

MSc. Herrera Yela Manuel Andrés

PhD. Espinosa Espinosa Jorge Patricio

Quito, 01 de abril de 2026

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.

SOLORZANO FLORES AGUSTÍN MATEO

C.I.: 1725454605

AGRADECIMIENTO

Deseo expresar mi profundo agradecimiento a los profesores de la maestría, quienes con su compromiso académico, exigencia intelectual y acompañamiento constante contribuyeron de manera decisiva a mi formación. Su capacidad para guiar, cuestionar y ampliar mi perspectiva científica fue fundamental para consolidar las bases que sostienen este trabajo. A mis tutores, les agradezco especialmente su tiempo, su orientación precisa y su paciencia durante todo el proceso; su apoyo fue clave para transformar ideas iniciales en un proyecto sólido, coherente y riguroso.

Extiendo también mi agradecimiento a mis compañeros y colegas, quienes se convirtieron en una valiosa red de intercambio académico y humano. Las discusiones, el trabajo colaborativo y el apoyo mutuo durante los momentos de mayor complejidad hicieron que esta etapa fuese no solo un desafío, sino también una experiencia enriquecedora. Cada aporte compartido, cada revisión y cada conversación contribuyeron al crecimiento colectivo y al avance de este estudio.

Finalmente, agradezco profundamente a mi familia por su apoyo incondicional, su confianza y su paciencia a lo largo de este camino. Su comprensión en los momentos de ausencia, su motivación constante y su compañía silenciosa pero firme fueron esenciales para mantenerme enfocado y avanzar con determinación. Este logro no habría sido posible sin su respaldo; a ellos les debo gran parte de este resultado.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia, pilar fundamental en cada uno de mis pasos. A mis padres, por enseñarme el valor del esfuerzo, la disciplina y la honestidad; por su apoyo constante, incluso en los momentos en los que el camino parecía más complejo. Su ejemplo ha sido mi guía y su confianza, el motor que me impulsó a continuar cuando las exigencias académicas demandaban más de mí. A mis hermanos y seres cercanos, gracias por su compañía, por cada palabra de aliento y por recordarme que los logros siempre son más significativos cuando se comparten con quienes uno aprecia.

Dedico también este esfuerzo a quienes han creído en mi vocación científica y profesional. A las personas que, sin ser familia de sangre, se han convertido en parte esencial de mi entorno: amigos que celebraron cada avance, que estuvieron presentes en los momentos de agotamiento y que comprendieron mis ausencias durante los periodos más intensos del estudio. Su presencia hizo más llevadero este proceso y su apoyo emocional se transformó en una fuente invaluable de fortaleza.

Finalmente, dedico este trabajo a mí mismo: a la versión de mí que decidió emprender este camino, a la que no se rindió ante las dificultades y a la que creyó que siempre era posible aprender un poco más. Este logro representa no solo un resultado académico, sino también el reflejo de un crecimiento personal construido con esfuerzo, constancia y dedicación.

Artículo de tesis

Patrones de dispersión global de influenza A/H5N1: Análisis filogenético y temporal de aislamientos genómicos del virus

Agustín Mateo Solórzano 1, Andrés Herrera 1,2, y Alexander Maldonado1,2,*

1 Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Internacional SEK (UISEK), 170302, Quito, Ecuador

2 Grupo de investigación: Enfermedades Desatendidas, Emergentes, Ecoepidemiología y Biodiversidad, Universidad Internacional SEK (UISEK), 170302, Quito, Ecuador

*Correspondencia: ruben.maldonado@uisek.edu.ec

Resumen: En los últimos años, el virus influenza A altamente patógeno, en particular el clado 2.3.4.4b, se ha propagado a nivel global infectando a aves silvestres, de corral, animales domésticos, de producción y silvestres, así como a humanos, generando preocupación por su potencial zoonótico. Por ello, comprender su dinámica evolutiva y los patrones de dispersión intercontinentales es fundamental para fortalecer la vigilancia genómica. Para ello, el presente estudio analizó 898 secuencias disponibles en GISAID con las cuales, mediante análisis temporales y evaluación de ancestro común, se identificó la raíz predominante asociada a Asia oriental, evidenciando múltiples eventos independientes de introducción hacia Europa y América. Los resultados también demuestran desigualdad entre en la cantidad de secuencias aisladas según su linaje y su procedencia geográfica, evidenciando una dinámica poblacional compleja caracterizada por expansión policlonal, introducciones geográficas recurrentes y heterogeneidad evolutiva, resaltando la necesidad de una mayor vigilancia genómica para análisis filodinámica continuos que permitan comprender con mayor precisión la historia evolutiva y el potencial adaptativo del virus.

Palabras clave: Gripe aviar, reordenamiento molecular, clado viral, spillover, ancestro común, divergencia genética

Abstract: Last years, the highly pathogenic virus influenza A, particularly clade 2.3.4.4b, has spread globally, infecting wild birds, poultry, domestic animals, livestock, and wild animals, as well as humans, raising concerns about its zoonotic potential. Therefore, understanding its evolutionary dynamics and intercontinental dispersal patterns is essential for strengthening genomic surveillance. To this end, the present study analyzed 898 sequences available on GISAID, using temporal analysis and common ancestor evaluation to identify the predominant lineage associated with East Asia, revealing multiple independent events of introduction into Europe and the Americas. The results also demonstrate disparities in the number of isolated sequences according to their lineage and geographic origin, indicating complex population dynamics characterized by polyclonal expansion, recurrent geographic introductions, and evolutionary heterogeneity, highlighting the need for enhanced genomic surveillance to enable ongoing phylodynamic analyses that allow for a more precise understanding of the virus's evolutionary history and adaptive potential.

Keywords: Avian influenza, reassortment, viral clade, spillover, common ancestor, genetic divergence

Introducción:

La gripe aviar es una enfermedad zoonótica causada por el virus de la influenza aviar (VIA) H5N1 descubierto en Asia y que, hasta 1996, se había registrado su prevalencia en aves de corral en China; sin embargo, al año siguiente se notificaron los primeros casos de infección viral en Humanos en la región, mostrando su potencial zoonótico (Capelastegui & Goldhill, 2025a). En el año 2002 se identificó la presencia del virus en aves silvestres acuáticas y migratorias, generando preocupación por el rol en el que pueden participar las aves migratorias en la propagación del virus a nivel mundial (Soda et al., 2023); mientras que en mamíferos no humanos, los primeros casos reportados de VIA corresponden al año 2005, afectando tanto en animales de producción, entre ellos cerdos y vacas; así como carnívoros terrestres y acuáticos cuya dieta se basa en el consumo de aves (Kaplan & Webby, 2013; Peacock et al., 2024). Desde su aparición, se han identificado 52 clados virales de VIA, de los cuales, el clado 2.3.4.4b ha sido uno de los más estudiadas por su elevada propagación en diferentes continentes, siendo el principal clado aislado tanto en aves, mamíferos no humanos, y humanos (Islam et al., 2023; Sreenivasan et al., 2024).

En humanos se han reportado 1014 casos de VIA desde 1997, de los cuales, más del 40% de los casos resultaron en la muerte del hospedador (World Health Organization, 2025). El primer caso humano fue identificado en 1997 en Hong Kong en un niño de 3 años. Durante el mismo año se registraron otros 11 casos con un rango de edad entre 1 y 60 años atendidos en diferentes hospitales de esta región (Bender et al., 1999). En 2006 se reportaron casos de H5N1 en humanos principalmente de Egipto y Azerbaiyán. Años más tarde, en 2022 se notificaron los primeros casos en Reino Unido y España (Atkinson et al., 2025; Mostafavi et al., 2021; Sánchez et al., 2020). Durante el mismo año se confirmó un caso humano en Colorado, Estados Unidos, mientras que, en América del Sur, el primer caso de VIA se reportó en Ecuador en enero de 2023, seguido de otro caso en Chile durante el mismo trimestre (Bruno et al., 2023; Castillo et al., 2023).

El VIA es un virus de ARN constituido por 8 segmentos genómicos responsables de la codificación de 11 proteínas virales. En su envoltura se encuentran las glicoproteínas hemaglutinina (HA), responsables de la unión del virus a los receptores de ácido siálico presentes en las células del hospedador; y la neuraminidasa (NA), encargada de la liberación de nuevas partículas virales en el huésped (Charostad et al., 2023; Elhakim et al., 2019). En el interior del virus se encuentra el complejo RNP, conformado por nucleoproteínas (NP) y polimerasas ácidas (PA) y básicas (PB1, PB2). El complejo RNP se encarga de la transcripción, replicación y empaquetamiento del genoma viral, desempeñando un papel clave en la adaptabilidad del virus a las células del hospedador (Rather et al., 2025). Los VIA se pueden subclassificar como VIA de alta patogenicidad (HPAI) o de baja patogenicidad (LPAI) según la presencia de sitios de escisión polibásicos o monobásicos respectivamente. Los VIA pertenecientes al clado 2.3.4.4b presentan una HA con sitios de escisión polibásicos, lo que les confieren una mayor virulencia, así como la capacidad de infectar un mayor rango de hospedadores (Mena-Vasquez et al., 2025; Sreenivasan et al., 2024).

Los VIA presentan una alta capacidad de reassortment, favoreciendo la generación de combinaciones genéticas capaces de infectar células de diferentes hospedadores aumentando la probabilidad de spillover. Se ha evidenciado mutaciones en las proteínas estructurales de los HPAI del clado 2.3.4.4b aislados en mamíferos, entre las cuales se encuentra E190D, Q226L, N224K y G228S para la HA; y E627K, M631L, Q591R y D701N para la PB2 (Capelastegui & Goldhill, 2025a). Otros clados virales, como el 2.2, han presentado mutaciones E119A, o N294S en el segmento NA (Ilyushina et al., 2010). Estas mutaciones aumentan la afinidad del virus a receptores celulares presentes en las vías respiratorias en diferentes mamíferos; a pesar de ello, la presencia de estas mutaciones no ha generado evidencia que respalde una transmisión vertical sostenida entre individuos de la misma especie (Landazabal-Castillo et al., 2025).

Estudios previos realizados por Elhakim et al., 2019 en Egipto, Huang et al., 2021 en Taiwan, o Islam et al., 2023 en Bangladesh, analizaron la dinámica evolutiva de los diferentes clados de H5N1 reportados en dichas regiones; sin embargo, estos estudios se centraron en el análisis del segmento HA. Plaza et al., 2024 realizó un estudio filogenético en mamíferos del segmento genómico PB2, mientras que el estudio realizado por Pardo-Roa et al., 2025, comparó los segmentos virales HA y NA obtenidos de aves en Chile. Estos estudios demuestran un enfoque limitado a ciertos segmentos genómicos restringiendo la comprensión integral del virus, su proceso evolutivo, y el impacto zoonótico que esto puede ocasionar (Singh et al., 2025). En este contexto, en el presente estudio se realizó un análisis filogenético integral de los segmentos genómicos PB2, PB1, PA, HA, NP, y NA del virus de influenza aviar altamente patógeno (HPAI) con el objetivo de reconstruir patrones de dispersión global mediante un enfoque multilocus. Para ello, se analizaron 898 secuencias pertenecientes a clados virales previamente identificados en humanos, pero aislados en diferentes hospedadores a nivel global, con la finalidad de explorar relaciones evolutivas entre linajes virales y su presencia en hospedadores y regiones geográficas.

Materiales y Métodos

Búsqueda y obtención de secuencias

Para el estudio, se evaluaron las secuencias de H5N1 disponibles en la base de datos EpiFluTM perteneciente a la plataforma digital GISAID (www.gisaid.org), considerando aquellas secuencias aisladas en hospedadores aviares y mamíferos, humanos y no humanos, provenientes de todo el mundo y disponibles en la plataforma desde su lanzamiento, en mayo de 2008, hasta el 30 de junio del 2025 (Shu & McCauley, 2017). La investigación consideró únicamente aquellas secuencias que presentaron los seis segmentos genómicos objetos de estudio (PB2, PB1, PA, HA, NP, y NA).

Para el análisis de secuencias procedentes de hospedadores mamíferos, humanos y no humanos, se incluyeron toda aquellas aisladas del tracto respiratorio superior e inferior de los hospedadores, excluyendo muestras de origen digestivo, urinario, mamario, tejido post-mortem, así como aquellas de origen no especificado, obteniendo 287 secuencias genómicas de origen humano, y 115 procedentes de mamíferos no humanos. Hasta el 30 de junio del 2025, la plataforma tiene, a disposición, 23901 muestras de origen aviar, de las cuales el 88.7% pertenecen al clado 2.3.4.4b, con Estados Unidos y Canadá, como los países con mayor número de aislamientos obtenidos, lo que podría ocasionar un sesgo de representación por clados. Por ello, tras un cálculo muestral realizado sobre la totalidad de secuencias de origen aviar, se concluyó utilizar 496 secuencias. A partir de este valor, y con la finalidad de reducir el sesgo de representación de clados con alta disponibilidad, se aplicó un muestreo proporcional estratificado por clado para lo cual se seleccionaron hasta un máximo de 11 secuencias por clado. De esta manera se busca que, tanto clados con pocas secuencias disponibles, así como aquellas que presentan cientos o miles de registros, contribuyan en igual proporción a la investigación (Ozturk, 2019). El resultado de dicho muestreo se evaluó mediante el método estadístico de Chi cuadrado por bondad de ajuste y el análisis de V de Cramer con la finalidad de evaluar la efectividad de dicho muestreo (Atlasov & Solodukha, 2021; Rolke & Gongora, 2020).

Alineamiento de secuencias

Las 898 secuencias preseleccionadas se alinearon de forma independiente según el hospedador y el segmento genómico. Para ello se utilizó el método MUSCLE con optimización diagonal con un máximo de 16 interacciones y con agrupamiento UPGMB en la plataforma NGPhylogeny.fr (Edgar, 2004; Lemoine et al., 2019). Los alineamientos individuales fueron curados mediante la herramienta BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy) con umbral de entropía máximo de 0,4 y tamaño de ventana predefinido en 3 (Criscuolo & Gribaldo, 2010). Los alineamientos curados obtenidos de los seis segmentos fueron concatenados para cada

secuencia, generando un alineamiento final que fue sometido a un segundo proceso de curación con BMGE para eliminar posiciones ambiguas. La integración de dichos alineamientos curados se llevó a cabo en el software libre Molecular Evolutionary Genetics Analysis v. 11.0.11 (MEGA X) (Kumar et al., 2018).

Finalmente, mediante la herramienta bioinformática Biostrings en Rstudio v.4.5.1 se eliminaron 112 secuencias que presentaron más de un 5% de indeterminaciones nucleotídicas, obteniendo así una matriz de 786 secuencias con 10213 posiciones (Posit team, 2024). Para los pasos posteriores se añadieron 2 secuencias de H1N1 y 2 secuencias de H5N7, ambas provenientes de humanos, para su uso como outgroups.

Construcción de árbol filogenético.

Para la construcción del árbol filogenético se utilizó el alineamiento previamente generado con las 790 secuencias provenientes de los diferentes hospedadores (humanos, aves y mamíferos). Con dicho alineamiento, se utilizó el software IQ-TREE v.3.0.1 mediante la herramienta ModelFinder, la cual identificó al modelo GTR+F+I+R5 como el mejor modelo de sustitución con valores de BIC y AIC equivalentes a 606706.77 y 595208.81 respectivamente (Kalyaanamoorthy et al., 2017; Wong et al., 2025). Según dicho resultado se utilizó el modelo sugerido “GTR+F+I+R5” con un soporte de bootstrap de 1000 réplicas, el cual permite respaldar la veracidad de las ramas formadas, considerándose como altamente fiables los valores de Bootstrap mayores al 95%, y moderadamente fuertes valores superiores al 70%. Ramas con porcentajes menores se consideran débiles o poco fiables (Balaro et al., 2026; Hoang et al., 2018).

Análisis Temporal

Utilizando la herramienta TempEst v1.5.3, mediante una regresión de la distancia genética desde la raíz (root-to-tip), se evaluó la señal temporal de las muestras analizadas utilizando la fecha de aislamiento registrada en la plataforma GISAID para cada una de estas secuencias, para lo cual se requirió usar el árbol filogenético de máxima verosimilitud previamente enraizado. El análisis

presentó un coeficiente de determinación (R^2) de 0.7782, lo que sugiere una señal temporal moderada, sugiriendo la presencia de heterogeneidad en las tasas de sustitución (Rambaut et al., 2016; Thorne et al., 1998).

Posteriormente se realizó la inferencia ancestral mediante el software PastML utilizando el método de aproximación marginal de probabilidad posterior (MPPA) bajo el modelo F81, el cual analiza los ancestros posibles para las raíces y subraíces del árbol hasta las ramas más lejanas (Bisharat et al., 2020; Ishikawa et al., 2019). Para ello se utilizó el árbol filogenético previamente mediante IQ-TREE, interpolando cada una de las secuencias con el país de origen y su hospedador descrito en el dataset de la plataforma GISAID.

Con el objetivo de estimar tasas evolutivas y tiempos de coalescencia, se intentó realizar un análisis filodinámico utilizando BEAST v.10.5.0 (Drummond et al., 2012). Se exploraron diferentes modelos de reloj molecular (estricto, relajado log-normal) y de coalescencia (tamaño poblacional constante, exponencial, y skygrid). Sin embargo, las corridas preliminares no alcanzaron convergencia (tamaños de muestra efectivos, ESS < 100) debido a la alta heterogeneidad y estructura poblacional compleja de los datos. Por lo tanto, el análisis cuantitativo de tasas se descartó y se mantuvo un enfoque filogeográfico descriptivo realizado con PastML (Rambaut et al., 2018).

Visualización filogeográfica.

Para la visualización del árbol filogenético se utilizó el servidor web iTOL v.6, en el cual se integraron anotaciones geográficas descritas en el dataset disponible en GISAID, con lo que se realizó un análisis descriptivo entre los clados enraizados y su origen geográfico (Letunic & Bork, 2024). Para visualizar la distribución geográfica de los diferentes clados se utilizó el dataset de GISAID en el cual se presentan los países y hospedadores en los que dichos clados fueron aislados. Esta información se proyectó mediante los softwares Natural Earth v4.1.0; y ggplot2 v.4.0.2

disponibles en RStudio v.4.5.1 (Massicotte & South, 2026; Ooms, 2025; Paradis et al., 2024; Wickham, Chang, et al., 2026; Wickham, François, et al., 2026).

Resultados

Distribución de las secuencias analizadas por clado

Para llevar a cabo el análisis filogenético de los 6 principales segmentos genómicos de HPAI, se realizó el alineamiento de 898 secuencias procedentes de diferentes países, equivalente al 3,70% del número total de secuencias disponibles en la plataforma GISAID. Como se mencionó en el apartado “*Materiales y Métodos*”, el muestreo se llevó a cabo de mediante un análisis proporcional estratificado, en el cual se consideró cada clado viral como un estrato. El resultado del muestreo se evaluó mediante análisis estadístico obteniendo un p valor inferior a 0.05 (2.2×10^{-6}) para la prueba de *Chi cuadrado por bondad de ajuste* y un valor *V de Cramer* equivalente a 0.397. Estos valores demuestran que a pesar de existir diferencia significativa en su distribución entre la muestra y la población en la distribución de secuencias por clado ($chi > 0.05$) no llega a generar un fuerte efecto en la representación global ($V < 0.5$), por lo que la muestra analizada reproduce parcialmente el comportamiento global de los clados.

Tras dicho muestreo, el clado 2.3.4.4b se mantiene como el clado con mayor representabilidad frente a otros (n=309), con el 34.4% del total de secuencias analizadas. Seguido se encuentran los clados 1.1.2, 2.3.4, y 1, con un poco más del 4.10% de prevalencia cada uno. En la **figura 1** se presenta la distribución de las secuencias virales según su clado.

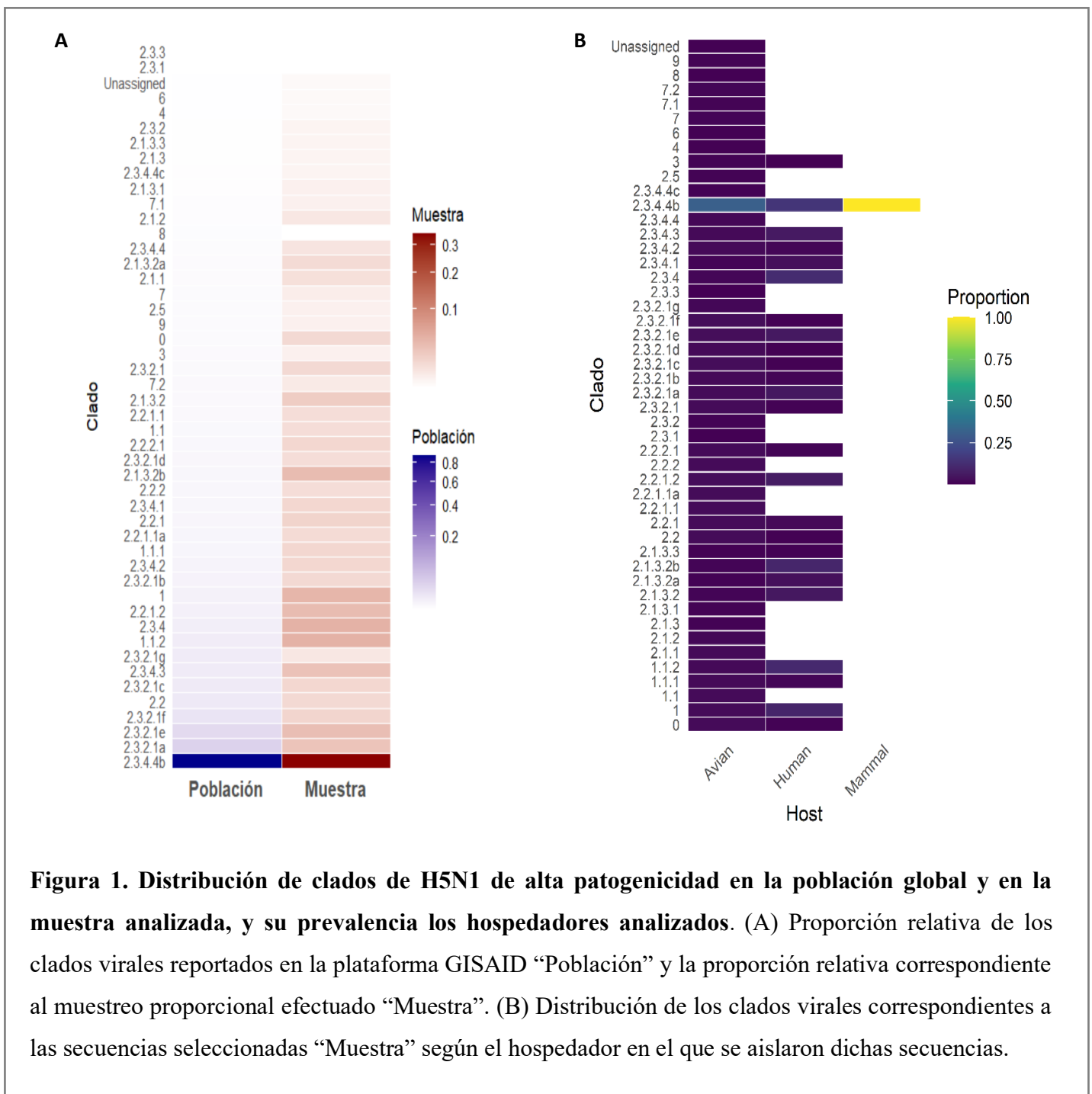


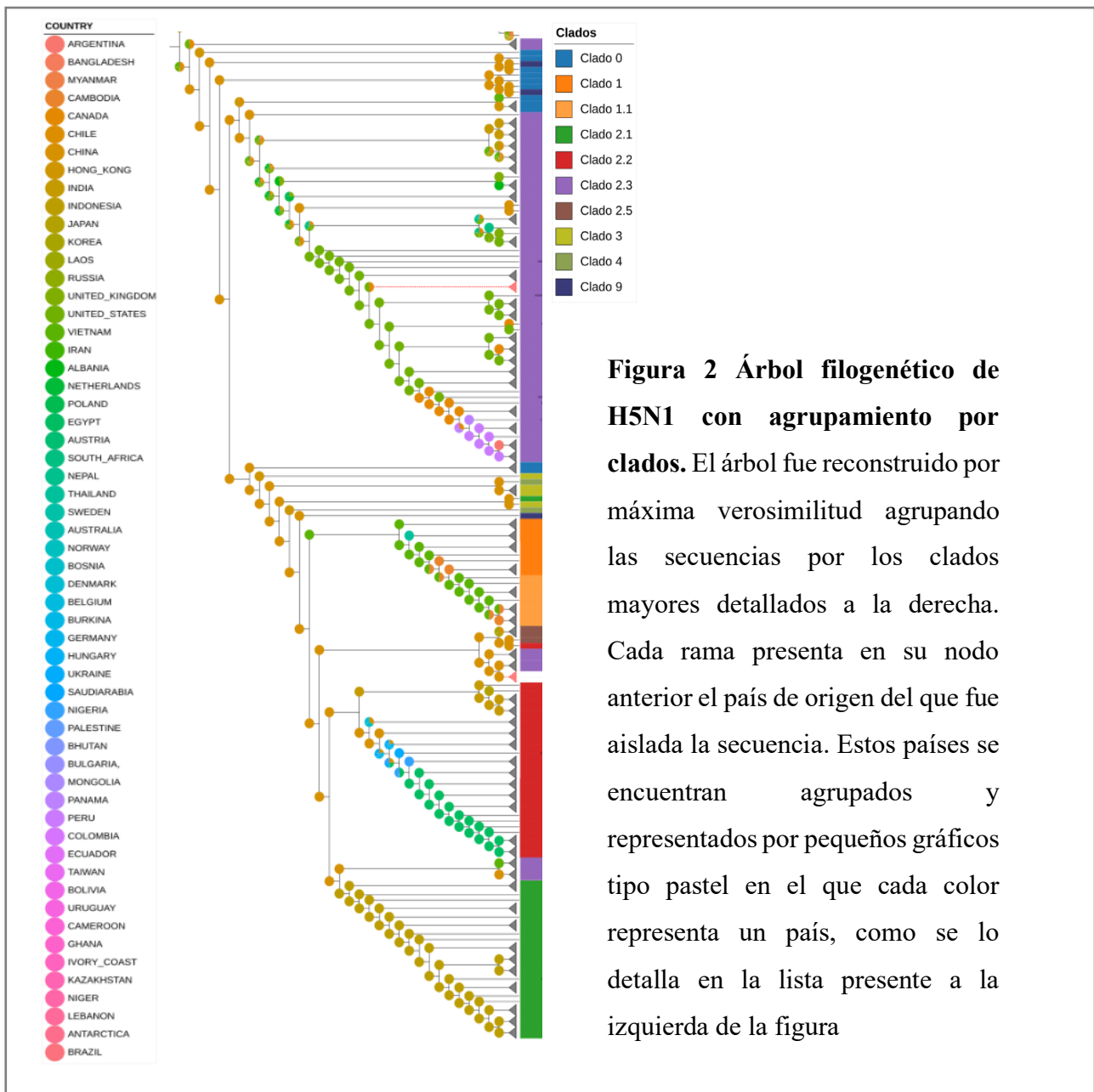
Figura 1. Distribución de clados de H5N1 de alta patogenicidad en la población global y en la muestra analizada, y su prevalencia los hospedadores analizados. (A) Proporción relativa de los clados virales reportados en la plataforma GISAID “Población” y la proporción relativa correspondiente al muestreo proporcional efectuado “Muestra”. (B) Distribución de los clados virales correspondientes a las secuencias seleccionadas “Muestra” según el hospedador en el que se aislaron dichas secuencias.

Análisis filogenético de H5N1

Tras la obtención del árbol filogenético generado por máxima verosimilitud, se evaluó el soporte de las ramas según el porcentaje de bootstrap obtenido frente a las 1000 réplicas

procesadas. Esta revisión previa confirmó la existencia de 79 nodos que presentaron un valor bootstrap menor al 70%, considerado dichos nodos de baja confianza, por lo que, para el análisis de relaciones filogenéticas, no se consideraron las ramas correspondientes, omitiendo así 158 secuencias. Una vez colapsadas las ramas de bajo bootstrap, se analizó el árbol filogenético agrupando las secuencias según su clado de origen, lo que revela la generación de un árbol de estructura evolutiva con la presencia de los clados 0 y 4 de origen temprano y baja diversificación, mientras que otros clados como el 1 y el 2 (2.1, 2.2, y 2.3) presentan alta diversificación generando ramas e interacción entre los mismos (**Figura 2**). La aparición anticipada de un nodo que deriva en secuencias pertenecientes al clado 2.3 ocasiona que en el árbol se presenta al clado 2 como tronco evolutivo común a partir del cual se generan clados polifiléticos.

Los clados 2.1 y 2.2 se presentan como linajes monofiléticos bien definidos con expansión evolutiva propia de cada clado, junto a un proceso de distribución geográfica específico para cada uno. El clado 2.1 se ha registrado en China e Indonesia, mientras que el clado 2.2 se ha aislado en hospedadores de China, Japón, India, Ucrania, Hungría, Bosnia, Alemania, Egipto y Nigeria. Por su parte el clado 2.3 refleja divergencia genética progresiva formando ramas parafiléticas y polifiléticas, con prevalencia en varios países de las regiones analizadas (América del norte, sur y centro; Asia oriental y occidental; Europa; y África).



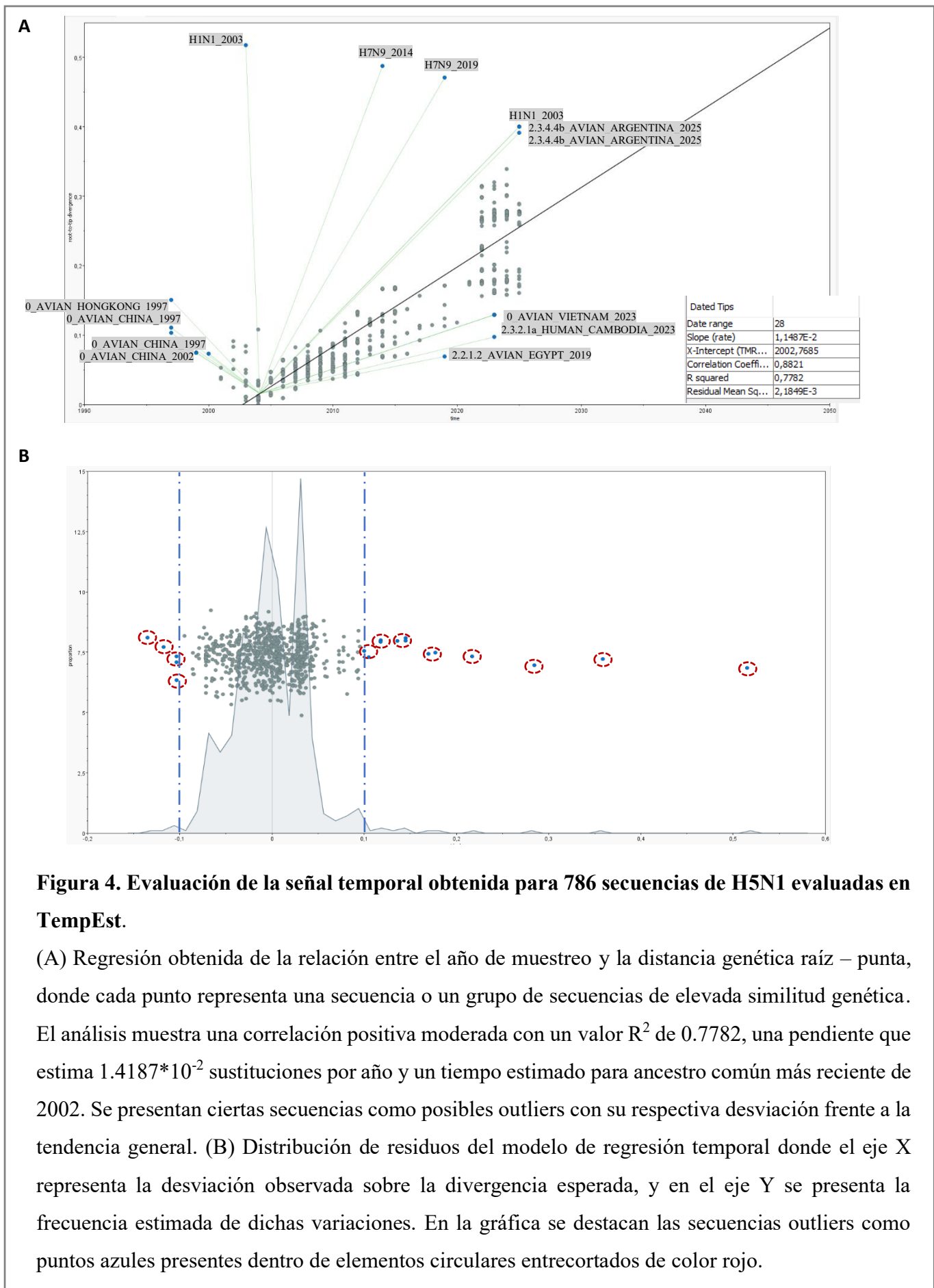
De forma adicional, se realizó un análisis exploratorio enfocado en las ramas poco confiables con bootstrap menor al 70% revelando que, a excepción de un pequeño grupo conformado por 5 secuencias del clado 1 procedentes de aves en Tailandia, las secuencias involucradas en dichas ramas pertenecen al clado 2.3.4 y los subclados 2.3.4.2, 2.3.4.3 y 2.3.4.4b. Al analizar estas ramas

que presentaron residuales estandarizados > 0.1 , expresando una alta heterogeneidad en la diversidad genética para un mismo año de muestreo reflejando una dinámica poblacional compleja, con linajes co-circulando y posiblemente diferentes tasas evolutivas (**Figura 4**). Consistente con esto, los análisis bayesianos preliminares no lograron converger ($ESS < 100$), lo que imposibilitó la estimación robusta de tasas evolutivas y tiempos de coalescencia con el dataset completo. Esta falta de convergencia refuerza la necesidad de analizar linajes individualmente en estudios futuros

Dispersión geográfica y asociación con el hospedador

La reconstrucción de estados ancestrales realizada en PastML ubicó el origen del ancestro común más reciente en China (**Figura 5A**). A partir de dicha raíz, se observa una diseminación inicial hacia otros países de la región asiática como Camboya, Vietnam, Tailandia, Indonesia, India, Japón y Laos. El análisis también infiere el ingreso del virus a otros continentes a través de los países asiáticos mencionados, siendo Europa oriental posiblemente la primera región no asiática en ser afectada por el virus. Ucrania, Bosnia y Hungría se presentan como con los nodos ancestrales para secuencias virales posteriormente aisladas en Alemania. Dentro de este mismo grupo ancestral se incluyen las secuencias aisladas en Burkina Faso y China, las cuales presentaron una distancia raíz de 0.1188 sustituciones por sitio. A partir de este linaje, se observa la expansión del virus a Nigeria y Egipto.

La llegada del virus al continente americano tiene dos posibles orígenes. Un primer grupo viral presuntamente proveniente de China se registra en Canadá y Estados Unidos con una distancia raíz de 0,1177 sustituciones por sitio; y otro grupo con mayor 0,1771 sustituciones por sitio, proveniente de países de Europa del Norte, África, y Asia (Bélgica, Suecia, Austria, Reino Unido, Sudáfrica, y Japón). Este último grupo se disemina en gran cantidad por países del continente americano, incluyendo países de Norteamérica, Centroamérica y Sudamérica, donde se presentan las secuencias virales con mayor distancia raíz equivalente a 0.2830.



A su par, se realizó la reconstrucción de estados ancestrales para hospedadores donde se presentan a las aves en nodos principales y de gran tamaño, presentando a las mismas como reservorio principal a partir del cual se generan eventos independientes de spillover a humanos y mamíferos no humanos (**Figura 5B**). Dicho análisis no refleja nodos entre humanos ni entre mamíferos, lo que apoya la teoría de ausencia de transmisión sostenida entre los mismos, exponiendo el papel que desempeñan las aves en la transmisión y procesos de reordenamiento molecular

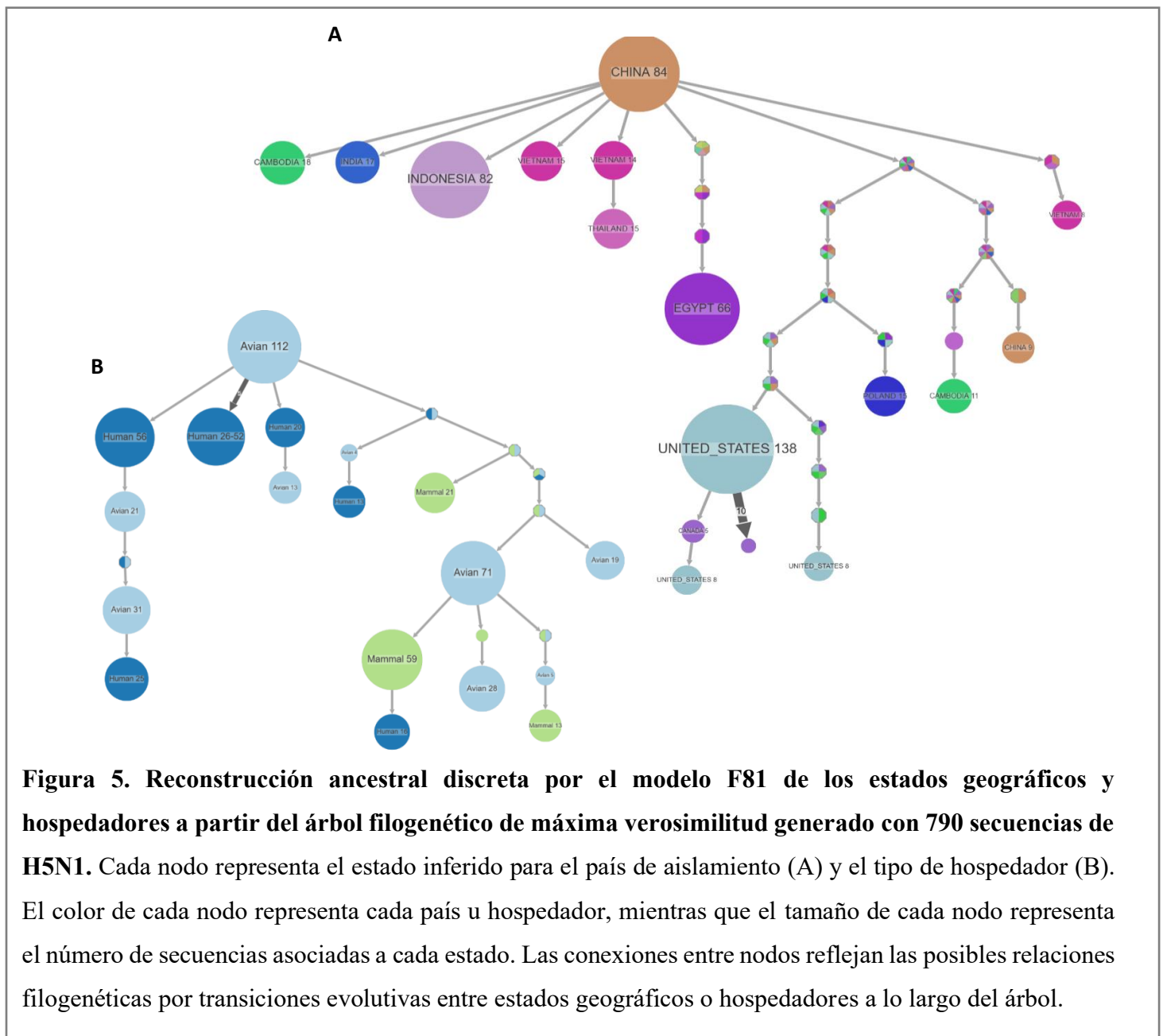


Figura 5. Reconstrucción ancestral discreta por el modelo F81 de los estados geográficos y hospedadores a partir del árbol filogenético de máxima verosimilitud generado con 790 secuencias de H5N1. Cada nodo representa el estado inferido para el país de aislamiento (A) y el tipo de hospedador (B). El color de cada nodo representa cada país u hospedador, mientras que el tamaño de cada nodo representa el número de secuencias asociadas a cada estado. Las conexiones entre nodos reflejan las posibles relaciones filogenéticas por transiciones evolutivas entre estados geográficos o hospedadores a lo largo del árbol.

Para lograr una mejor comprensión del proceso de propagación del virus, se analizó la información de los aislamientos por hospedador, clados y subclados, y año de descubrimiento de dicho clado presentado en la figura 6. La figura 6 A presenta la cronología de descubrimiento virales de los clados mayores mostrando que la primera secuencia disponible en GISAID proviene de aves de China en 1997 perteneciente al clado “0”, el cual también fue el primero obtenido en humanos el mismo año en Hong Kong.

El análisis de distribución geográfica de los clados y subclados pertenecientes al clado mayor “1” demuestran una baja diseminación del clado. Las secuencias pertenecientes a este clado se aislaron por primera vez en aves en China en 2003 presentándose en otros países de la región como Hong Kong, Vietnam, Tailandia, Camboya; así como en Bélgica. En el mismo año se identificaron secuencias del clado en Humanos en Vietnam, mostrando similar diseminación a nivel regional, sin haberse detectado en Bélgica (Figura 6.B).

Las secuencias pertenecientes al clado mayor 2.1, presentaron la menor diseminación, evidenciando presencia de dichos clados únicamente en China e Indonesia. Estas secuencias se obtuvieron por primera vez en China en aves en el año 2003 y en humanos en el año 2005 (Figura 6.C). Las secuencias pertenecientes al clado mayor 2.2, presentaron mayor diseminación aislándose en aves China, India, Japón, Bangladesh, Nigeria, Egipto, y Ucrania, ubicando el primer aislamiento del clado en aves en 2003 y en Humanos en 2006. En ambos casos China fue el país de origen. Este clado se ha aislado de humanos también en Egipto y Bangladesh (Figura 6.D).

Finalmente, como se observa en la Figura 6E, las secuencias pertenecientes al clado mayor 2.3 y su múltiples subclados muestran una fuerte propagación a nivel mundial afectando a aves, humanos y mamíferos. Tanto en aves como humanos, el clado fue descrito por primera vez en China en 2004 y 2005 respectivamente, a partir de lo cual se muestra una fuerte propagación en diversas regiones, mientras que, en mamíferos, se presenta un origen multifocal en Europa y Norteamérica durante el 2002

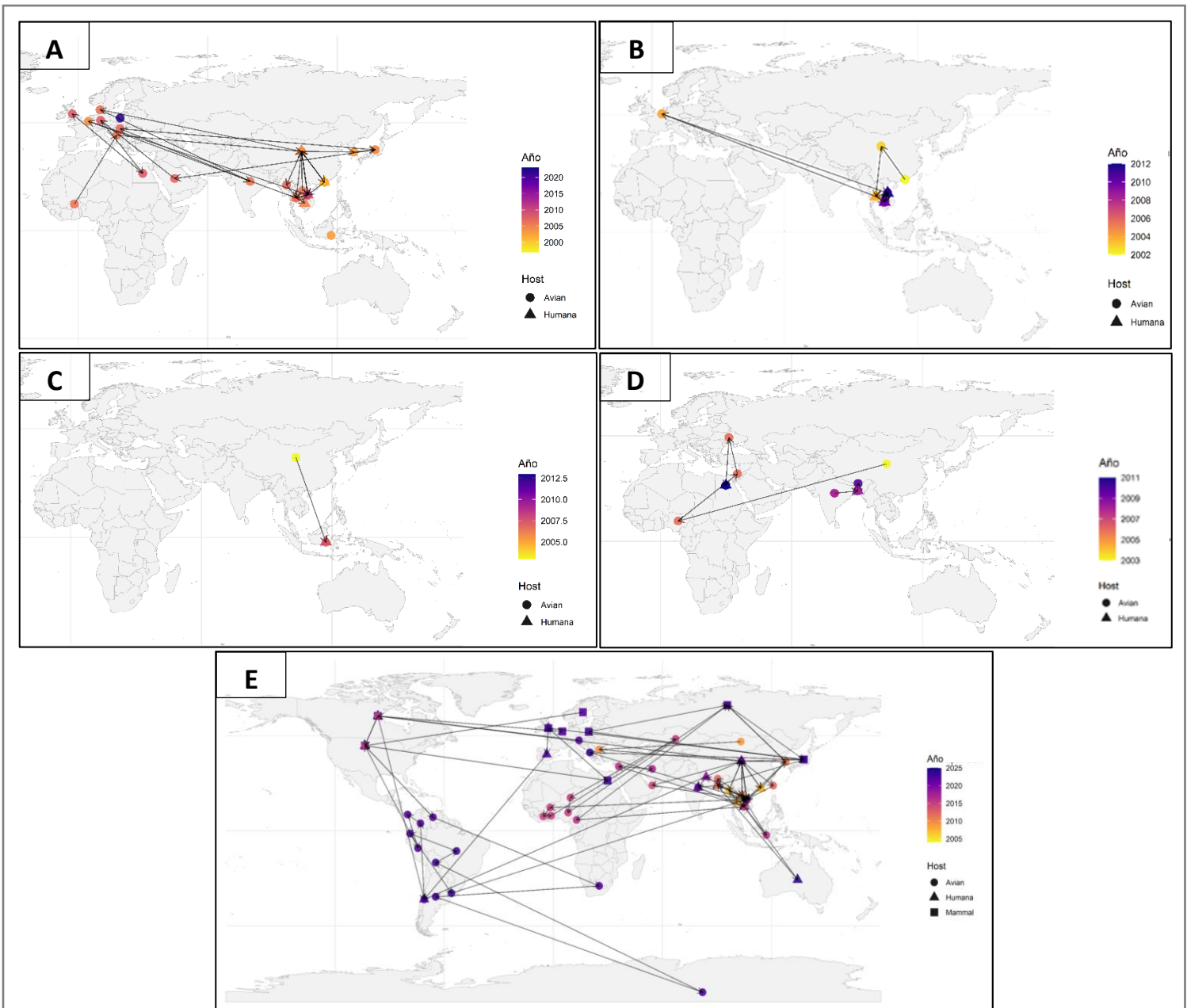


Figura 6. Mapa de dispersión espacial de los clados por hospedador y año de aislamiento. Se presenta el mapa de dispersión viral utilizando como escala temporal el año correspondiente al primer aislamiento de los diferentes clados en cada hospedador, para lo cual se generaron 5 mapas de dispersión diferentes según los clados descritos a continuación:

- (A) Clados mayores ("0","1","2.1.1","2.2","2.3.1","2.3.2","2.3.4","2.5","3","4","6","7","7.1","7.2","8","9")
- (B) Subclados del clado mayor 1 ("1","1.1","1.1.1","1.1.2")
- (C) Subclados del clado mayor 2.1 ("2.1.1","2.1.2","2.1.3","2.1.3.1","2.1.3.2","2.1.3.2a","2.1.3.2b","2.1.3.3")
- (D) Subclados del clado mayor 2.2 ("2.2.1","2.2.1.1","2.2.1.1a","2.2.1.2","2.2.2","2.2.2.1")
- (E) Subclados del clado mayor 2.3 ("2.3.1","2.3.2","2.3.2.1","2.3.2.1a","2.3.2.1b","2.3.2.1c","2.3.2.1d","2.3.2.1e","2.3.2.1f","2.3.2.1g","2.3.4","2.3.4.1","2.3.4.2","2.3.4.3","2.3.4.4","2.3.4.4b","2.3.4.4c")

Discusiones:

Desde su descubrimiento, el virus de la influenza aviar ha sido monitorizado constantemente por las pérdidas económicas que ha ocasionado al sector avícola, afectando la salud y producción animal. El reporte de casos de H5N1 de alta patogenicidad en humanos (más de mil), así como su reciente propagación del virus en mamíferos de diferentes regiones del planeta, ha generado preocupación sobre el impacto que estos hallazgos pueden ocasionar sobre la salud humana, así como las implicaciones económicas que puede ocasionar una fuerte diseminación en animales de producción. Estos hallazgos plantean un riesgo zoonótico generalizado pudiendo desencadenar una pandemia (Scheibner et al., 2023). Por ello, se vio la necesidad de evaluar patrones migratorios y de diseminación del virus, para lo cual se evaluaron 786 secuencias correspondientes a los nueve clados mayores (0 – 9) y los diversos clados menores o subclados encontrados en aves, mamíferos y humanos en los diferentes continentes. El análisis develó que, los clados 0, 1, 3, 4, y 9 se presentaron mayoritariamente en regiones asiáticas, mientras que virus del clado 2.2, y en mayor medida del clado 2.3 presentaron una propagación superior, presentándose en múltiples regiones y continentes, siendo el clado 2.3.4.4b el principal involucrado de la panzootia en mamíferos de América y Europa (Lam et al., 2025).

El análisis realizado para inferir en ancestro común presentó a China como país origen de todos los clados a partir del cual se reportaron otros clados con alta cercanía genética. Este hallazgo se relaciona con los primeros reportes documentados del virus en humanos en el año 1997, así como la aparición de diferentes clados virales en aves y humanos en países de la zona como Tailandia, Hong Kong, Vietnam, Bangladesh e Indonesia (Noisumdaeng et al., 2022; Smith & Donis, 2012). A partir del aislamiento de secuencias del clado 2.2 y 2.3 obtenidas en aves migratorias en el lago Qinghai en China en 2005, se ha documentado una elevada propagación de virus pertenecientes a dichos clados, en especial al 2.3, cuestionando el papel que desempeñan las aves migratorias (Mao et al., 2024). Un hallazgo similar ocurrió en África en 2006, fecha en la que,

tras brotes independientes de H5N1 en aves de corral en Nigeria y Egipto, se encontraron secuencias de los clados 2.2 y 2.3 en patos migratorios (Adesola et al., 2024; Elsobky et al., 2022). En 2006 se evidenció la presencia del clado viral 2.2 en Europa procedente de China, mientras que secuencias del clado 2.3.2.1 se encontraron en Europa del este entre 2009 y 2010 (Isoda et al., 2022). El clado 2.3.4.4b, registrado por primera vez en Europa en 2020, proviene de una serie de reordenamientos acumulados generados entre secuencias pertenecientes al clado 2.3.4 y secuencias del virus H5N8, la cual circula en Europa desde el 2014 (Yang et al., 2023). Desde su aparición, el clado 2.3.4.4b ha demostrado una alta propagación impulsada principalmente por aves silvestres tanto migratorias como estacionarias, entre las que se encuentran patos, gansos, pelícanos, buitres, águilas, búhos, gaviotas, entre otras, evidenciando propagación local, así como intercontinental siguiendo rutas migratorias (Chrzastek et al., 2025; Hirschinger et al., 2025; Isoda et al., 2022).

En Norteamérica, el primer reporte de H5N1 corresponde a un caso humano registrado a fines del 2013 en un canadiense tras retomar de un viaje a China, donde presuntamente se infectó por virus del clado 2.3.2.1c (Pabbaraju et al., 2014). Un año después, en noviembre 2014 se detectaron múltiples brotes de VIA pertenecientes al clado 2.3.2.1f y al reordenamiento de 2.3.4.4c de H5N2. Dichos brotes virales se evidenciaron en aves acuáticas silvestres pertenecientes a la ruta migratoria del pacífico, generando brotes en Estados Unidos y Canadá. Este brote mostro limitación geográfica sin expansión hacia centro américa ni Sudamérica (Lee et al., 2018). A finales del 2021 se da un nuevo brote de H5N1 en Canadá, esta vez causado por el clado euroasiático 2.3.4.4b. El primer reporte de dicho clado se registra en una gaviota y posteriormente en aves cautivas de corral del mismo país. Para inicios del 2022 ya se tuvo reportes del clado en aves de Estados Unidos. A mediados del mismo año se reportaron los primeros casos de H5N1 en mamíferos acuáticos de Estados Unidos (Chrzastek et al., 2025).

En octubre de 2022 se reporta la presencia de H5N1 en Centroamérica y Sudamérica ocasionado por genotipo B3.2 del clado 2.3.4.4b. Dicho genotipo aparece por un reordenamiento entre el genotipo de origen euroasiático (A1) y el linaje norteamericano. Entre diciembre 2022 y febrero 2023 se reportan casos de este nuevo linaje en Costa Rica, Cuba, Panamá, Honduras y Guatemala. En octubre de 2022 se reportan los primeros casos de H5N1 en Colombia, Venezuela, Ecuador y Perú, expandiéndose progresivamente al resto del continente hasta mediados de 2023. Los brotes suscitados en Sudamérica afectaron a aves silvestres y de corral; y a mamíferos acuáticos (Uhart & Vanstreels, 2025). Finalmente, tras la llegada del virus al sur argentino, ocurre la introducción viral a las Islas Malvinas y Georgia del Sur pertenecientes a la región antártica, con prevalencia del virus tanto en aves acuáticas migratorias, como en grandes mamíferos acuáticos (Banyard et al., 2024).

En mamíferos se ha reportado la prevalencia de nueve genotipos virales correspondientes al clado 2.3.4.4b. Aunque algunos genotipos han demostrado cierta asociación con hospedadores mamíferos específicos, como el B3.13 reportado principalmente en ganado vacuno de Norteamérica, o el B3.2 presente especialmente en mamíferos acuáticos de Sudamérica; los 9 genotipos han sido ampliamente reportado en aves. Este patrón concuerda con la información observada en la Figura 5B, donde se describe a las aves como intermediarios en los procesos de reordenamiento genético, evidenciando spillovers continuos entre aves y mamíferos humanos y no humanos. Si bien, estudios anteriores asocian la presencia de mutaciones en la región PB2 con eventos masivos de diseminación viral en mamíferos, se ha determinado que, para que lleve a cabo una transmisión sostenida entre mamíferos, a través de partículas respiratorias, es necesario que se presenten mutaciones en el segmento genómico que codifica la HA que brinden afinidad viral a receptores celulares presentes en el tracto respiratorio superior de los mamíferos, lo que podría significar un cambio en la dinámica de diseminación del virus (Capelastegui & Goldhill, 2025b; Neumann & Kawaoka, 2024; Tomás et al., 2024).

Conclusiones:

La rápida propagación evidenciada de los diferentes clados virales de H5N1, en especial del clado 2.3.4.4b por todos los continentes, así como la gran capacidad de reordenamiento que presenta el virus, pone de manifiesto la necesidad de realizar una vigilancia epidemiológica constante del virus, en búsqueda de nuevas variantes que puedan ocasionar una transmisión sostenida entre humanos y/o de mamíferos a humanos. Esta preocupación se incrementa al entender la cercanía filogenética existente entre las secuencias obtenidas de diferentes hospedadores y la escasez de secuencias aisladas de mamíferos que se encuentren disponibles, lo que puede enmascarar eventos filogenéticos importantes.

Limitaciones

Entre las principales limitaciones detectadas durante el estudio, se encuentra la desigualdad en el número de secuencias obtenidas entre regiones geográficas, así como el escaso número de secuencias reportadas provenientes de hospedadores mamíferos. La sobrerrepresentación de ciertos aislamientos, así como la subrepresentación de otros, pudo afectar la reconstrucción del árbol filogenético, incrementando la heterogeneidad de las secuencias, lo que conlleva a la disminución del ESS para el análisis bayesiano, imposibilitando el análisis evolutivo de las secuencias, ocasionando que en el estudio actual se evaluara la dispersión geográfica por análisis discreto y no continuo

Adicionalmente, el estudio realizado no comparó las secuencias según el tipo de aves, tratando a las secuencias obtenidas de corral y de aves silvestres como un mismo tipo de hospedador, lo que conlleva un sesgo de análisis, en especial al considerar que en la mayor cantidad de reordenamientos se han generado en aves migratorias. De igual forma, para futuros análisis se sugiere tratar a los hospedadores mamíferos de forma separada y no agrupada, ya que, como han

expresado ciertos estudios, se ha encontrado similitud en secuencias procedente de grupos poblacionales cercanos genéticamente.

Bibliografía

- Adesola, R. O., Onoja, B. A., Adamu, A. M., Agbaje, S. T., Abdulazeez, M. D., Akinsulie, O. C., Bakre, A., & Adegboye, O. A. (2024). Molecular epidemiology and genetic evolution of avian influenza H5N1 subtype in Nigeria, 2006 to 2021. *Virus Genes* 2024 60:5, 60(5), 501–509. <https://doi.org/10.1007/s11262-024-02080-9>
- Atkinson, B., Beadsworth, M., & Dunning, J. (2025). Cases of high consequence infectious diseases identified in the UK, 1962–2023. *Journal of Medical Microbiology*, 74(3), 001982. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.001982>
- Atlasov, I., & Solodukha, R. (2021). Sample Representativeness Estimation as a Preliminary Stage of Statistical Steganalysis. *Proceedings - 2021 3rd International Conference on Control Systems, Mathematical Modeling, Automation and Energy Efficiency, SUMMA 2021*, 78–84. <https://doi.org/10.1109/SUMMA53307.2021.9632204>
- Balaro, M. F. A., Cordeiro, M. D., Magalhães, I. de F. B., Pereira, J. C., de Azevedo Baêta, B., Guterres, A., da Silva, C. B., & da Cunha, N. C. (2026). Tick-borne pathogens in meat sheep from Brazil: first report of *Theileria ovis* in sheep in latin America. *Parasitology Research* 2025 125:1, 125(1), 33-. <https://doi.org/10.1007/s00436-025-08587-w>
- Banyard, A. C., Bennison, A., Byrne, A. M. P., Reid, S. M., Lynton-Jenkins, J. G., Mollett, B., De Silva, D., Peers-Dent, J., Finlayson, K., Hall, R., Blockley, F., Blyth, M., Falchieri, M., Fowler, Z., Fitzcharles, E. M., Brown, I. H., & James, J. (2024). Detection and spread of high pathogenicity avian influenza virus H5N1 in the Antarctic Region. *Nature Communications*, 15(1), 7433. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-51490-8>

-
- Bender, C., Hall, H., Huang, J., Klimov, A., Cox, N., Hay, A., Gregory, V., Cameron, K., Lim, W., & Subbarao, K. (1999). Characterization of the surface proteins of influenza A (H5N1) viruses isolated from humans in 1997-1998. *Virology*, 254(1), 115–123. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9529>
- Bisharat, N., Koton, Y., & Oliver, J. D. (2020). Phylogeography of the marine pathogen, *Vibrio vulnificus*, revealed the ancestral scenarios of its evolution. *MicrobiologyOpen*, 9(9), e1103. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1103>
- Bruno, A., Alfaro-Núñez, A., de Mora, D., Armas, R., Olmedo, M., Garcés, J., & Garcia-Bereguian, M. A. (2023). First case of human infection with highly pathogenic H5 avian Influenza A virus in South America: A new zoonotic pandemic threat for 2023? *Journal of Travel Medicine*, 30(5), taad032. <https://doi.org/10.1093/JTM/TAAD032>
- Capelastegui, F., & Goldhill, D. H. (2025a). H5N1 2.3.4.4b: a review of mammalian adaptations and risk of pandemic emergence. *The Journal of General Virology*, 106(6). <https://doi.org/10.1099/JGV.0.002109>
- Capelastegui, F., & Goldhill, D. H. (2025b). H5N1 2.3.4.4b: a review of mammalian adaptations and risk of pandemic emergence. *Journal of General Virology*, 106(6), 002109. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.002109>
- Castillo, A., Fasce, R., Parra, B., Andrade, W., Covarrubias, P., Hueche, A., Campano, C., Tambley, C., Rojas, M., Araya, M., Hernández, F., Bustos, P., & Fernández, J. (2023). The first case of human infection with H5N1 avian Influenza A virus in Chile. *Journal of Travel Medicine*, 30(5), taad083. <https://doi.org/10.1093/JTM/TAAD083>
- Charostad, J., Rezaei Zadeh Rukerd, M., Mahmoudvand, S., Bashash, D., Hashemi, S. M. A., Nakhaie, M., & Zandi, K. (2023). A comprehensive review of highly pathogenic avian influenza (HPAI)

-
- H5N1: An imminent threat at doorstep. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 55, 102638. <https://doi.org/10.1016/J.TMAID.2023.102638>
- Chrzastek, K., Lieber, C. M., & Plemper, R. K. (2025). H5N1 Clade 2.3.4.4b: Evolution, Global Spread, and Host Range Expansion. *Pathogens*, 14(9), 929. <https://doi.org/10.3390/pathogens14090929>
- Criscuolo, A., & Gribaldo, S. (2010). BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC Evolutionary Biology* 2010 10:1, 10(1), 210-. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-210>
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29(8), 1969–1973. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSS075>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKH340>
- Elhakim, M. M., Kandil, S. K., Abd Elaziz, K. M., & Anwar, W. A. (2019). Epidemiology of Severe Acute Respiratory Infection (SARI) Cases at a sentinel site in Egypt, 2013–15. *Journal of Public Health (Oxford, England)*, 42(3), fdz053. <https://doi.org/10.1093/PUBMED/FDZ053>
- Elsobky, Y., El Afandi, G., Salama, A., Byomi, A., Omar, M., & Eltholth, M. (2022). Spatiotemporal analysis of highly pathogenic avian influenza (H5N1) outbreaks in poultry in Egypt (2006 to 2017). *BMC Veterinary Research* 2022 18:1, 18(1), 174-. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03273-w>
- Hirschinger, J., Höfle, U., Sánchez-Cano, A., Guinat, C., Croville, G., Barral, M., Donázar, J. A., Le Gall Ladevèze, C., Walch, M., Alvarez, V., Gerrikagoitia, X., Du Plessis, L., Dellicour, S., Arrondo, E., Sánchez-Zapata, J. A., Cortés-Avizanda, A., Minayo Martín, S., Tornos, J., Perret, S., ... Le Loc'h, G. (2025). Multidisciplinary Tracking of Highly Pathogenic Avian Influenza

-
- A(H5N1) Outbreak in Griffon Vultures, Southern Europe, 2022. *Emerging Infectious Diseases*, 31(8), 1589. <https://doi.org/10.3201/eid3108.241456>
- Hoang, D. T., Chernomor, O., Von Haeseler, A., Minh, B. Q., & Vinh, L. S. (2018). UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Molecular Biology and Evolution*, 35(2), 518–522. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSX281>
- Huang, C. W., Chen, L. H., Lee, D. H., Liu, Y. P., Li, W. C., Lee, M. S., Chen, Y. P., Lee, F., Chiou, C. J., & Lin, Y. J. (2021). Evolutionary history of H5 highly pathogenic avian influenza viruses (clade 2.3.4.4c) circulating in Taiwan during 2015–2018. *Infection, Genetics and Evolution*, 92. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104885>
- Ilyushina, N. A., Seiler, J. P., Rehg, J. E., Webster, R. G., & Govorkova, E. A. (2010). Effect of Neuraminidase Inhibitor–Resistant Mutations on Pathogenicity of Clade 2.2 A/Turkey/15/06 (H5N1) Influenza Virus in Ferrets. *PLOS Pathogens*, 6(5), e1000933. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000933>
- Ishikawa, S. A., Zhukova, A., Iwasaki, W., Gascuel, O., & Pupko, T. (2019). A Fast Likelihood Method to Reconstruct and Visualize Ancestral Scenarios. *Molecular Biology and Evolution*, 36(9), 2069–2085. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSZ131>
- Islam, A., Hossain, M. E., Amin, E., Islam, S., Islam, M., Sayeed, M. A., Hasan, M. M., Miah, M., Hassan, M. M., Rahman, M. Z., & Shirin, T. (2023). Epidemiology and phylodynamics of multiple clades of H5N1 circulating in domestic duck farms in different production systems in Bangladesh. *Frontiers in Public Health*, 11, 1168613. <https://doi.org/10.3389/FPUBH.2023.1168613>
- Isoda, N., Onuma, M., Hiono, T., Sobolev, I., Lim, H. Y., Nabeshima, K., Honjyo, H., Yokoyama, M., Shestopalov, A., & Sakoda, Y. (2022). Detection of New H5N1 High Pathogenicity Avian Influenza Viruses in Winter 2021–2022 in the Far East, Which Are Genetically Close to Those in Europe. *Viruses* 2022, Vol. 14, 14(10). <https://doi.org/10.3390/v14102168>

-
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., Von Haeseler, A., & Jermin, L. S. (2017). ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods* 2017 14:6, 14(6), 587–589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
- Kaplan, B. S., & Webby, R. J. (2013). The avian and mammalian host range of highly pathogenic avian H5N1 influenza. *Virus Research*, 178(1), 3. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.09.004>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSY096>
- Lam, T. T., Davis, C. T., & Group, W. H. O. O. for A. H. and A. O. (WHO/WOAH/FAO) H. E. W. (2025). Nomenclature updates to the hemagglutinin gene clade designations resulting from the continued evolution of high pathogenicity avian influenza A(H5) virus clades 2.3.2.1c and 2.3.4.4. *BioRxiv*, 2025.11.23.690055. <https://doi.org/10.1101/2025.11.23.690055>
- Landazabal-Castillo, S., Alva-Alvarez, L., Suarez-Agüero, D., Mamani-Zapana, E., & Mayta-Huatuco, E. (2025). Comparative Mutational Analysis and the Glycosylation Patterns of a Peruvian Isolated Avian Influenza A Virus H5N1: Exploring Possible Viral Spillover Events Within One Health Approach. *Veterinary Sciences*, 12(4), 392. <https://doi.org/10.3390/VETSCI12040392/S1>
- Lee, D. H., Torchetti, M. K., Hicks, J., Killian, M. L., Bahl, J., Pantin-Jackwood, M., & Swayne, D. E. (2018). Transmission Dynamics of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus A(H5Nx) Clade 2.3.4.4, North America, 2014–2015. *Emerging Infectious Diseases*, 24(10), 1840. <https://doi.org/10.3201/eid2410.171891>
- Lemoine, F., Correia, D., Lefort, V., Doppelt-Azeroual, O., Mareuil, F., Cohen-Boulakia, S., & Gascuel, O. (2019). NGPhylogeny.fr: new generation phylogenetic services for non-specialists. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W260. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ303>

-
- Letunic, I., & Bork, P. (2024). Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Research*, 52(W1), W78–W82. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAE268>
- Mao, Q., Li, Z., Li, Y., Zhang, Y., Liu, S., Yin, X., Peng, C., Ma, R., Li, J., Hou, G., Jiang, W., & Liu, H. (2024). H5N1 high pathogenicity avian influenza virus in migratory birds exhibiting low pathogenicity in mallards increases its risk of transmission and spread in poultry. *Veterinary Microbiology*, 292(5), 110038. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2024.110038>
- Massicotte, P., & South, A. (2026). World Map Data from Natural Earth [R package rnaturalearth version 1.2.0]. *CRAN: Contributed Packages*. <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.rnaturalearth>
- Mena-Vasquez, J., Marco-Fuertes, A., Culhane, M., & Torremorell, M. (2025). Emerging threats of HPAI H5N1 clade 2.3.4.4b in swine: knowledge gaps and the imperative for a One Health approach. *Frontiers in Veterinary Science*, 12, 1648878. <https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1648878>
- Mostafavi, E., Ghasemian, A., Abdinasir, A., Mahani, S. A. N., Rawaf, S., Vaziri, M. S., Gouya, M. M., Nguyen, T. M. N., Al Awaidy, S., Al Ariqi, L., Islam, M. M., Farag, E. A. B. A., Obtel, M., Mala, P. O., Matar, G. M., Asghar, R. J., Barakat, A., Sahak, M. N., Mansouri, M. A., & Swaka, A. (2021). Emerging and Re-emerging Infectious Diseases in the WHO Eastern Mediterranean Region, 2001-2018. *International Journal of Health Policy and Management*, 11(8), 1286. <https://doi.org/10.34172/IJHPM.2021.13>
- Neumann, G., & Kawaoka, Y. (2024). Highly pathogenic H5N1 avian influenza virus outbreak in cattle: the knowns and unknowns. *Nature Reviews Microbiology* 2024 22:9, 22(9), 525–526. <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01087-1>

-
- Noisumdaeng, P., Phadungsombat, J., Weerated, S., Wiriyarat, W., & Puthavathana, P. (2022). Genetic evolution of hemagglutinin and neuraminidase genes of H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses in Thailand. *PeerJ*, *10*, e14419. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.14419>
- Ooms, J. (2025). *av: Working with Audio and Video in R. R package version 0.9.6.* <https://github.com/ropensci/av>
- Ozturk, O. (2019). Post-stratified Probability-Proportional-to-Size Sampling from Stratified Populations. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics* *2019 24:4*, *24(4)*, 693–718. <https://doi.org/10.1007/S13253-019-00370-6>
- Pabbaraju, K., Tellier, R., Wong, S., Li, Y., Bastien, N., Tang, J. W., Drews, S. J., Jang, Y., Todd Davis, C., Fonseca, K., & Tipples, G. A. (2014). Full-Genome Analysis of Avian Influenza A(H5N1) Virus from a Human, North America, 2013. *Emerging Infectious Diseases*, *20(5)*, 887. <https://doi.org/10.3201/eid2005.140164>
- Paradis, E., Blomberg, S., Bolker, B., Brown, J., Claramunt, S., Claude, J., Cuong, H. S., Desper, R., Didier, G., Durand, B., Dutheil, J., Ewing, R., Gascuel, O., Guillerme, T., Heibl, C., Ives, A., Jones, B., Krah, F., Lawson, D., ... de Vienne, D. (2024). Analyses of Phylogenetics and Evolution [R package ape version 5.8-1]. *CRAN: Contributed Packages.* <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.ape>
- Pardo-Roa, C., Nelson, M. I., Ariyama, N., Aguayo, C., Almonacid, L. I., Gonzalez-Reiche, A. S., Muñoz, G., Ulloa, M., Ávila, C., Navarro, C., Reyes, R., Castillo-Torres, P. N., Mathieu, C., Vergara, R., González, Á., González, C. G., Araya, H., Castillo, A., Torres, J. C., ... Medina, R. A. (2025). Cross-species and mammal-to-mammal transmission of clade 2.3.4.4b highly pathogenic avian influenza A/H5N1 with PB2 adaptations. *Nature Communications* *2025 16:1*, *16(1)*, 2232-. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-57338-z>

-
- Peacock, T. P., Moncla, L., Dudas, G., VanInsberghe, D., Sukhova, K., Lloyd-Smith, J. O., Worobey, M., Lowen, A. C., & Nelson, M. I. (2024). The global H5N1 influenza panzootic in mammals. *Nature* 2024 637:8045, 637(8045), 304–313. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-08054-z>
- Plaza, P. I., Gamarra-Toledo, V., Rodríguez Euguí, J., & Lambertucci, S. A. (2024). Recent Changes in Patterns of Mammal Infection with Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus Worldwide. *Emerging Infectious Diseases*, 30(3), 444. <https://doi.org/10.3201/eid3003.231098>
- Posit team. (2024). *RStudio Integrated Development Environment for R. Posit Software, PBC*. <https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=3810421>
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 67(5), 901–904. <https://doi.org/10.1093/SYSBIO/SYY032>
- Rambaut, A., Lam, T. T., Carvalho, L. M., & Pybus, O. G. (2016). Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evolution*, 2(1). <https://doi.org/10.1093/VE/VEW007>
- Rather, M. A., Hassan, A., Aman, M., Gul, I., Mir, A. H., Potdar, V., Koul, P. A., Ahmad, S. M., Ganai, N. A., Shah, R. A., Chikan, N. A., Abdul-Careem, M. F., & Shabir, N. (2025). Molecular and ecological determinants of mammalian adaptability in avian influenza virus. *Infection* 2025 53:5, 53(5), 1575–1601. <https://doi.org/10.1007/s15010-025-02529-5>
- Rolke, W., & Gongora, C. G. (2020). A chi-square goodness-of-fit test for continuous distributions against a known alternative. *Computational Statistics* 2020 36:3, 36(3), 1885–1900. <https://doi.org/10.1007/s00180-020-00997-x>

-
- Sánchez, A., García-Galán, A., García, E., Gómez-Martín, Á., de la Fe, C., Corrales, J. C., & Contreras, A. (2020). Occupational exposure to influenza virus of the wild birds. *Revista Espanola de Salud Publica*, 94, E1–E9. <https://doi.org/10.4321/S1135-57272020000100006>
- Scheibner, D., Salaheldin, A. H., Bagato, O., Zaack, L. M., Mostafa, A., Blohm, U., Müller, C., Eweas, A. F., Franzke, K., Karger, A., Schäfer, A., Gischke, M., Hoffmann, D., Lerolle, S., Li, X., Abd El-Hamid, H. S., Veits, J., Breithaupt, A., Boons, G. J., ... Abdelwhab, E. M. (2023). Phenotypic effects of mutations observed in the neuraminidase of human origin H5N1 influenza A viruses. *PLOS Pathogens*, 19(2), e1011135. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011135>
- Shu, Y., & McCauley, J. (2017). GISAID: Global initiative on sharing all influenza data – from vision to reality. *Eurosurveillance*, 22(13), 30494. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.13.30494/CITE/REFWORKS>
- Singh, K., Malik, Y. S., & Hemida, M. G. (2025). Comprehensive Evolutionary and Structural Analysis of the H5N1 Clade 2.4.3.4b Influenza a Virus Based on the Sequences and Data Mining of the Hemagglutinin, Nucleoprotein and Neuraminidase Genes Across Multiple Hosts. *Pathogens* 2025, Vol. 14, 14(9). <https://doi.org/10.3390/pathogens14090864>
- Smith, G. J. D., & Donis, R. O. (2012). Continued evolution of highly pathogenic avian influenza A (H5N1): Updated nomenclature. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 6(1), 1–5. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2011.00298.x>
- Soda, K., Mekata, H., Usui, T., Ito, H., Matsui, Y., Yamada, K., Yamaguchi, T., & Ito, T. (2023). Genetic and antigenic analyses of H5N8 and H5N1 subtypes high pathogenicity avian influenza viruses isolated from wild birds and poultry farms in Japan in the winter of 2021–2022. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 85(11), 1180. <https://doi.org/10.1292/jvms.23-0121>
- Sreenivasan, C. C., Li, F., & Wang, D. (2024). Emerging Threats of Highly Pathogenic Avian Influenza A (H5N1) in US Dairy Cattle: Understanding Cross-Species Transmission Dynamics in

-
- Mammalian Hosts. *Viruses* 2024, Vol. 16, Page 1703, 16(11), 1703.
<https://doi.org/10.3390/V16111703>
- Thorne, J. L., Kishino, H., & Painter, I. S. (1998). Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 15(12), 1647–1657.
<https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.MOLBEV.A025892>
- Tomás, G., Marandino, A., Panzera, Y., Rodríguez, S., Wallau, G. L., Dezordi, F. Z., Pérez, R., Bassetti, L., Negro, R., Williman, J., Uriarte, V., Grazioli, F., Leizagoyen, C., Riverón, S., Coronel, J., Bello, S., Páez, E., Lima, M., Méndez, V., & Pérez, R. (2024). Highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infections in pinnipeds and seabirds in Uruguay: Implications for bird–mammal transmission in South America. *Virus Evolution*, 10(1). <https://doi.org/10.1093/ve/veae031>
- Uhart, M. M., & Vanstreels, R. E. T. (2025). Overview of high pathogenicity avian influenza H5N1 clade 2.3.4.4b in wildlife from Central and South America, October 2022–September 2025. *Canadian Journal of Microbiology*, 71. <https://doi.org/10.1139/cjm-2025-0189>
- Wickham, H., Chang, W., Henry, L., Pedersen, T. L., Takahashi, K., Wilke, C., Woo, K., Yutani, H., Dunnington, D., & van den Brand, T. (2026). Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics [R package ggplot2 version 4.0.2]. In *CRAN: Contributed Packages* (4.0.2). Comprehensive R Archive Network (CRAN). <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.ggplot2>
- Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller, K., & Vaughan, D. (2026). dplyr: A Grammar of Data Manipulation. In *CRAN: Contributed Packages* (1.2.0; p. 02). <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.dplyr>
- Wong, T. K. F., Ly-Trong, N., Ren, H., Baños, H., Roger, A. J., Susko, E., Bielow, C., Maio, N. De, Goldman, N., Hahn, M. W., Huttley, G., Lanfear, R., & Minh, B. Q. (2025). *IQ-TREE 3: Phylogenomic Inference Software using Complex Evolutionary Models*. <https://doi.org/10.32942/X2P62N>

World Health Organization. (2025). *H5N1 influenza: monthly reported cases*.

<https://archive.ourworldindata.org/20251202-135933/grapher/h5n1-flu-reported-cases.html>

Yang, J., Zhang, C., Yuan, Y., Sun, J., Lu, L., Sun, H., Sun, H., Chu, D., Qin, S., Chen, J., Zhang, C.,

Hao, X., Shi, W., Liu, W., Gao, G. F., Digard, P., Lycett, S., & Bi, Y. (2023). Novel Avian Influenza

Virus (H5N1) Clade 2.3.4.4b Reassortants in Migratory Birds, China. *Emerging Infectious*

Diseases, 29(6), 1244. <https://doi.org/10.3201/eid2906.221723>