

Análisis del genoma de un virus atípico de influenza aviar H5N2 de baja patogenicidad de origen mexicano

Giovanni Steffani Hernández¹
 Fernando Chávez Maya¹
 Edith Rojas Anaya²
 Elizabeth Loza Rubio²
 0000-0001-6812-9239
 Gary García Espinosa^{1,*}

¹ Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves
 Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
 Universidad Nacional Autónoma de México
 Av. Universidad 3000, CP 04510, DF, México

² Centro Nacional de Investigación Disciplinaria
 en Microbiología Animal
 Instituto Nacional de Investigaciones Forestales
 Agrícolas y Pecuarias
 México D. F., 05110, México

***Autor para correspondencia:**
 Tel: (55)-5622-5867 Ext. 207
 Correo electrónico:
gary@unam.mx

Resumen

Este estudio analizó el genoma de un virus de influenza aviar H5N2, aislado de heces de pollos tipo Leghorn y patos Pekín, infectados experimentalmente para conocer su origen y características moleculares. La secuencia completa del genoma del virus se obtuvo por medio del método de secuenciación de Sanger, una vez obtenida la secuencia, se caracterizó mediante comparación genética y análisis filogenético. Los resultados del análisis mostraron que los ocho segmentos del genoma están relacionados con virus aislados en México. El análisis del gen de la hemoaglutinina reveló que codifica para pocos aminoácidos básicos en el sitio de corte y quizá carece de un sitio de glicosilación en la posición once. El gen que codifica para la proteína PB1 carece del fragmento PB1-F2, así como en el gen de la PA se encuentra el fragmento PA-X. También se observó, que el gen de la polimerasa contiene la secuencia consenso del ribosoma TCC TTT CGT C, requerida para la expresión de PA-X. Las características moleculares demostraron que el virus corresponde a un virus de baja patogenicidad del subtipo H5 con excepción del posible sitio once de glicosilación. La información del genoma para esta cepa del virus, proveerá un mapa molecular para futuros estudios *in vivo* que puedan contribuir a conocer por qué algunos virus de influenza aviar persisten en los pollos por periodos prolongados. Esta información puede ser de utilidad en países como México, donde el virus ha estado en la avicultura desde 1994 y con el potencial de evolucionar a virus de alta patogenicidad.

Palabras clave: influenza aviar, H5N2, baja patogenicidad, genoma.

Recibido: 2016-04-15
 Aceptado: 2016-05-09
 Publicado: 2016-06-28

Información y declaraciones adicionales
 en la página 7

© Derechos de autor:
 Giovanni Steffani Hernández *et al.* 2016

acceso abierto 



Distribuido bajo una Licencia Creative Commons
 Atribución 4.0 Internacional (CC-BY 4.0)

Introducción

El virus de influenza aviar pertenece a la familia de los *Orthomyxoviridae* y al género influenza virus tipo A. Es conocido que los virus de influenza aviar de baja patogenicidad (VIBP) causan una enfermedad clínica, de leve a moderada, en pollos, pero el virus evoluciona a virus de influenza aviar de alta patogenicidad (VIAP) después de múltiples pases en poblaciones de pollos (Soda *et al.* 2011). Los VIAP causan una enfermedad clínicamente severa y fatal con rápida diseminación,

enfermedad que registra grandes pérdidas económicas. En algunos casos, estos virus pueden ser potencialmente contagiosos para los mamíferos, incluyendo a los humanos (Causey 2008).

Los VIBP se caracterizan por tener un índice de patogenicidad intravenoso (IPIV) menor de 1.2 en pollos de seis semanas de edad o menos del 75 % de mortalidad en pollos de cuatro a ocho semanas de edad infectados vía intravenosa, así como también la ausencia de múltiples aminoácidos básicos en el sitio de corte de la proteína hemoaglutinina (HA) (Petrini 2009).

Se conocen otras características relacionadas con la patogenicidad del virus subtipo H5 como son la ausencia de sitios probables de N-glicosilación en la HA (Deshpande *et al.* 1987), mutaciones de aminoácidos en la proteína PB2 en el virus H5N2 adaptado a ratones (Li *et al.* 2015), mutaciones en la proteína viral PB1-F2 encontrada en ratones y patos (MacAuley *et al.*, 2010; Marjuki *et al.*, 2010), así como la presencia de la proteína PA-X que suprime la replicación viral y la respuesta antiviral en ratones y aves (Jagger *et al.* 2012; Hayashi *et al.* 2015; Hu *et al.* 2015).

A partir de 1994, año en que se aisló por primera vez en México el virus de la influenza aviar H5N2 de baja patogenicidad, se comenzó una campaña de vacunación como parte del programa de erradicación de la enfermedad. Las vacunas que se utilizaron eran principalmente inactivadas y emulsionadas, pero también hubo vacunas recombinantes en virus de viruela. Sin embargo, únicamente el VIAP fue erradicado (Villareal-Chavez 2003). Desde entonces, el VIBP se ha controlado con la vacuna oficial elaborada con la cepa A/Ch/Mexico/CPA-232/1994 (H5N2), que ha sido el único caso de vacunación masiva a largo plazo en granjas de México.

A pesar de la vacunación, se reportaron constantes variaciones genéticas entre los virus de campo aislados entre los años de 1993-2008 en comparación con la cepa de la vacuna A/Ch/Mexico/CPA-232/1994 (H5N2), lo que ha sugerido que la vacuna no protege a los pollos y por lo tanto permite la circulación del virus de campo entre las granjas (Lee *et al.* 2004; Escorcía *et al.* 2010; Armas *et al.* 2015). Además, los VIBP aislados en México han tenido una relación filogenética con virus aislados de brotes en Taiwán (Chang-Chun *et al.* 2014) y Centro América (Okamoto *et al.* 2007).

En la actualidad, hay pocos reportes del laboratorio de la Comisión México-Estados Unidos para la prevención de la fiebre aftosa sobre VIBP H5N2 y otras enfermedades de los animales domésticos (CPA), y las granjas que tuvieron resultados positivos al virus fueron puestas en cuarentena y todos sus animales fueron sacrificados.

Hasta ahora, el virus H5N2 solo afecta la salud animal y no se ha reportado la reaparición de un VIAP de ese subtipo. La mayoría de los estudios sobre el VIBP H5N2 en México se han concentrado en el cambio antigénico para justificar el desarrollo de vacunas, pero no se han investigado otras características moleculares y biológicas. Durante un estudio experimental sobre la excreción viral de la cepa A/chicken/Mexico/2007 (H5N2) en pollos SPF tipo Leghorn y patos comerciales de la raza Pekín, se describió que el virus se replica principalmente en el tracto respiratorio de los pollos, y en el tracto digestivo de los patos sin causar mortalidad en ninguna de las aves, pero, esta cepa sí causa una enfermedad clínica moderada en los pollos, enfermedad de la que estas aves se recuperan.

Por otro lado, en ambas especies de aves se detectó una prolongada excreción viral determinada por RT-PCR (Carranza-Flores *et al.* 2013). En esta investigación,

se caracterizó el genoma viral de la cepa A/pollo/México/2007 (H5N2) para determinar su origen filogenético y sus características moleculares asociadas con la patogenicidad, para comprender mejor las características genéticas de esta cepa relacionadas con la baja patogenicidad.

Material y métodos

Análisis del genoma

El RNA viral se extrajo a partir del líquido alantoideo (almacenado a -75 °C), se utilizó el estuche comercial PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen) y se siguieron las especificaciones del fabricante. Cada uno de los ocho segmentos del genoma viral se amplificó por RT-PCR con los oligonucleótidos reportados (Haffman *et al.* 2001); para ello se utilizó el estuche comercial OneStep RT-PCR Kit (Qiagen).

Las secuencias de los segmentos genómicos se determinaron por el método de secuenciación de Sanger (Sanger *et al.* 1977) mediante el kit de secuenciación BigDye terminator v3.1 (Applied). Las secuencias obtenidas se alinearon y editaron con el programa MEGA versión 5.05 (Tamura *et al.* 2011).

Cada uno de los ocho segmentos se comparó con las secuencias disponibles en el *GenBank* a través del algoritmo BLAST (Altschul *et al.* 1990). Entonces se construyó un árbol filogenético para cada uno de los segmentos genómicos mediante el algoritmo Neighbor-joining con 1000 replicas (Tamura *et al.* 2011). La traducción de las secuencias de nucleótidos hacia aminoácidos se hizo con la herramienta de traducción del programa ExPASy (Gasteiger, 2003).

Números de acceso

Las secuencias de nucleótidos de cada uno de los ocho segmentos genómicos obtenidos, se ingresaron a la base de datos de las secuencias de nucleótidos del *GenBank* de la siguiente manera: proteína básica de la polimerasa 2 (PB2, por sus siglas en inglés: KJ729340); proteína básica de la polimerasa 1 (PB1, por sus siglas en inglés: KJ729341); proteína ácida de la polimerasa (PA, por sus siglas en inglés: KJ729342); hemoaglutinina (HA: KJ729343); proteína de la nucleocapside (NP, por sus siglas en inglés: KJ729344); neuraminidasa (NA: KJ729345); proteína de matriz (M: KJ729346); y proteína no estructural (NS, por sus siglas en inglés: KJ729347).

Resultados y discusión

Análisis del genoma

Los ocho genes del virus codifican once proteínas (PB2, PB1, PA, PA-X, HA, NP, NA, M1, M2, NS1 y NEP) con longitudes de 759, 756, 716, 252, 564, 493, 449, 252, 97, 230 y 121 aminoácidos respectivamente. El virus A/pollo/México/2007 (H5N2) carece de PB1-F2, pero codifica la PA-X. También el gen PA contiene la secuencia de lectura ribosomal TCC TTT CGT C que permite la expresión de PA-X. Además el gen de la HA del virus A/pollo/México/2007 (H5N2) traduce una serie de pocos aminoácidos básicos en el sitio de escisión de la HA (V-P-Q-R-E-X-R | G-L).

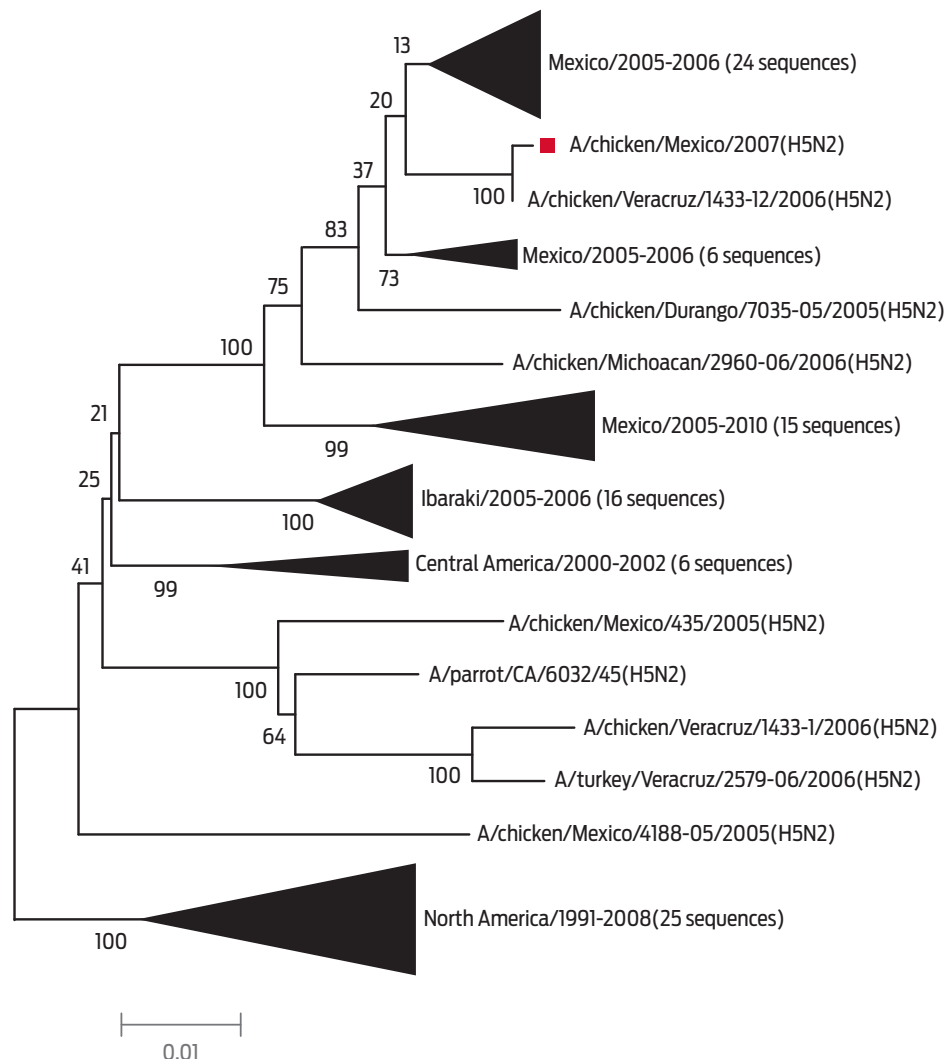


Figura 1. Árbol filogenético del gen HA del virus de influenza A/pollo/México/2007 (H5N2) [■]. El árbol filogenético se construyó a través del método de Neighbor-joining. Los porcentajes de cada rama donde están representados los grupos taxonómicos con 1000 replicas se expresan cerca de las ramas. Las distancias evolutivas se obtuvieron por el método de 2-parámetros de Kimura. El análisis incluyó 101 secuencias de nucleótidos de pollos. El análisis evolutivo se hizo con el programa MEGA 5.05. En las figuras, cada triángulo representa grupos de secuencias estrechamente relacionados, donde el tamaño del triángulo se conecta de forma directa con el número de secuencias colapsadas.

El análisis *in silico* de la proteína HA tiene cinco sitios probables de N-glicosilación localizados cerca del sitio de escisión en los aminoácidos 27, 39, 179, 302 y 555. Además, la HA tiene los residuos de aminoácidos Q226 y G228 que prefieren el receptor de virus de la influenza aviar H5N2. En la región del tallo, la neuraminidasa carece de 20 aminoácidos.

El gen de la HA comparte un 99 % de similitud con el gen HA del virus A/pollo/Veracruz/1433-12/2006 (H5N2), y un 93 % con el A/pollo/Veracruz//1433-1/2006 (H5N2) (figura 1). El análisis de alineamiento múltiple de los aminoácidos de cada una de las proteínas codificadas generó resultados similares. Los ocho segmentos del genoma del virus tuvieron <98 % de similitud con virus aislados de otros estados de la República Mexicana.

La disponibilidad de varias secuencias completas de virus contemporáneos en la base de datos del *GenBank* permitió el análisis filogenético de los genes PB2,

PB1, PA, NP, NA, M y NS1, entre el virus A/pollo/México/2007 (H5N2) y el A/pollo/Veracruz//1433-1/2006 (H5N2), así como el análisis de los genes de la HA del A/pollo/México/2007 (H5N2) y el A/pollo/Veracruz/1433-12/2006 (H5N2). Los árboles filogenéticos construidos, manifiestan las relaciones filogenéticas entre 101 secuencias de nucleótidos de la HA del virus de influenza aviar (figura 1) y también de la NA (figura 2), representados como árboles con 15 y 27 ramas respectivamente. Algunas ramas indican grupos colapsados. En las figuras, cada triángulo representa grupos de secuencias estrechamente relacionados, el tamaño del triángulo está directamente relacionado con el número de secuencias colapsadas.

El genoma del virus A/pollo/México/2007 (H5N2) codifica once proteínas (Neuman 2011). El genoma carece del gen PB1-F2, el cual ha sido asociado con la patogenicidad en huéspedes aviares (Marjuki *et al.* 2010). El genoma viral codifica para la proteína PA-X, que reprime la replicación viral y la respuesta inmune en el ratón y el pollo. En conjunto, estos hallazgos explican la baja patogenicidad del virus *in vivo* (Jagger *et al.* 2012; Hayashi *et al.* 2015; Hu *et al.* 2015).

El genoma del virus A/pollo/México/2007 (H5N2) contiene la secuencia de nucleótidos ribosomal que permite la expresión del gen PA-X en VIBP en especies de aves (Hu *et al.* 2015). La secuencia de unión de la HA del genoma de este virus codifica los aminoácidos Q226 y G228 que prefieren unirse al ácido siálico en el enlace α 2-3 (Ha *et al.* 2001; Zhao *et al.* 2012). El gen de la HA del virus A/pollo/México/2007 (H5N2) tiene pocos aminoácidos básicos en el sitio de corte (V-P-Q-R-E-X-R | G-L) que en la mayoría de los casos es una característica de los VIBP (Berhane *et al.* 2014; Chan-Chun *et al.* 2014; Wood *et al.* 1996). Sin embargo, la carencia específica en un probable sitio de N-glicosilación en la posición once en la HA podría asociarse con un incremento en la patogenicidad (Deshpande *et al.* 1987). La neuraminidasa muestra la falta de 20 aminoácidos en la región del tallo, característica de virus adaptados a las aves de corral (Li *et al.* 2011).

El análisis filogenético del virus A/pollo/México/2007 (H5N2) señala que esta cepa se habría originado en el 2006 en la costa del Golfo de Veracruz. Los ocho genes del virus A/pollo/México/2007 (H5N2) se relacionan con virus de baja patogenicidad de pollos en diferentes estados de la República Mexicana. Esto indica que no han entrado virus de otros subtipos. Además, los genes HA y NA del virus A/pollo/México/2007 (H5N2) mostraron la similitud más alta con el virus A/pollo/Veracruz/1433-12/2006 (H5N2). El Estado de Veracruz junto con otros estados del centro y norte de la República Mexicana están muy conectados por carretera, lo que sería una vía probable de diseminación entre las granjas de dichos Estados.

Conclusiones

La caracterización molecular del virus H5N2 evidenció los marcadores que explicarían la baja patogenicidad observada en pollos tipo Leghorn, como la proteína PA-X, la carencia de la proteína PB1-F2 y la ausencia de aminoácidos básicos en el sitio de escisión de la HA. La falta de un probable sitio de N-glicosilación en la posición once de la HA sería la única característica en el genoma que podría estar asociada con la virulencia. Las características descritas de la cepa de este virus en este análisis, contribuirán a comprender mejor como los VIBP H5N2 continuarán siendo endémicos en México por un largo tiempo, sin evolucionar a alta patogenicidad.

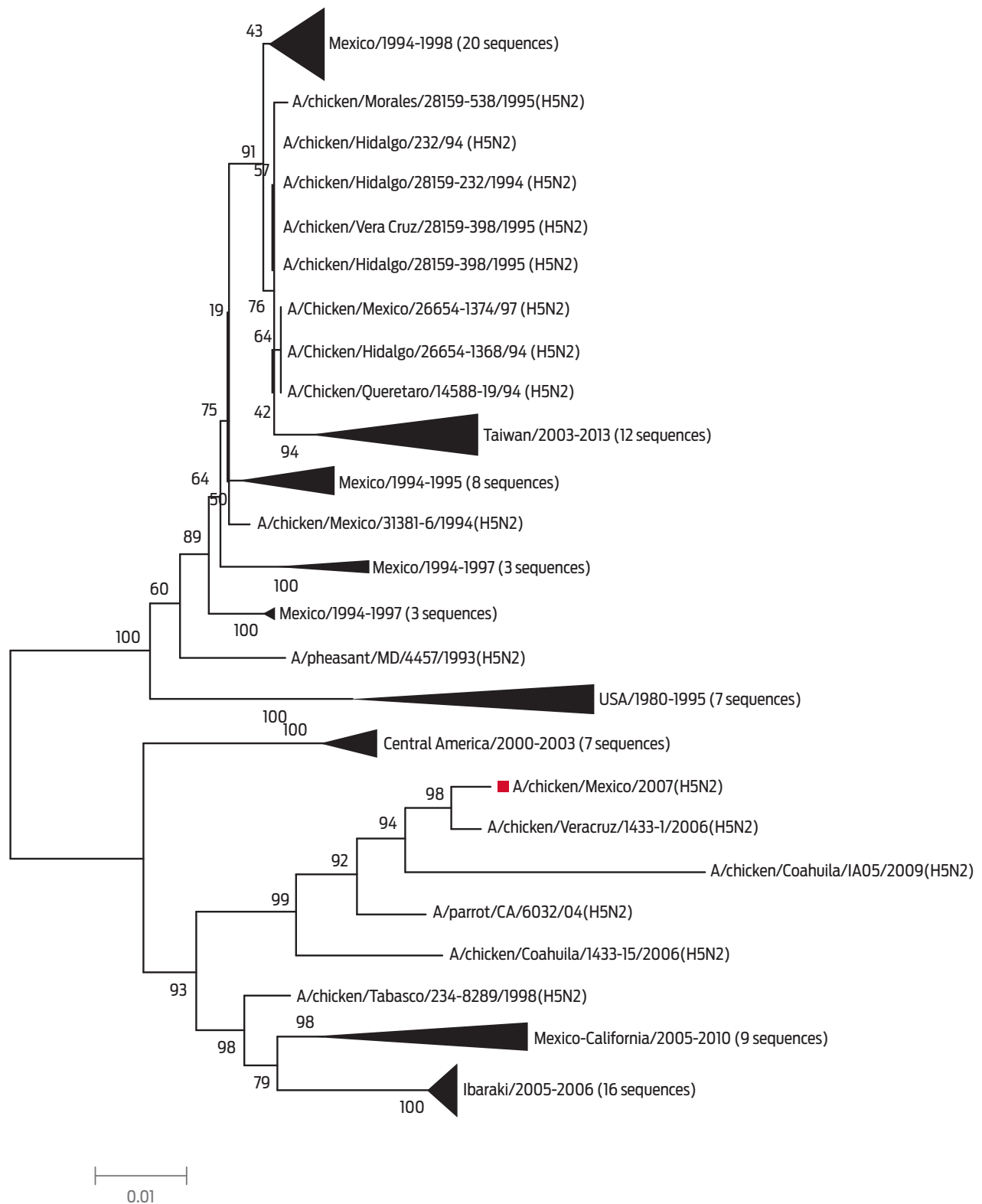


Figura 2. Árbol filogenético del gen NA del virus de influenza A/pollo/México/2007 (H5N2) [■]. El árbol filogenético se construyó a través del método de Neighbor-joining. Los porcentajes de cada rama donde están representados los grupos taxonómicos con 1000 replicas se expresan cerca de las ramas. Las distancias evolutivas se obtuvieron por el método de 2-parámetros de Kimura. El análisis incluyó 101 secuencias de nucleótidos de pollos. El análisis evolutivo se hizo con el programa MEGA 5.05. En las figuras, cada triángulo representa grupos de secuencias estrechamente relacionados, donde el tamaño del triángulo se conecta de forma directa con el número de secuencias colapsadas.

Financiamiento

Esta investigación recibió apoyo del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT, No. IN216212). Giovanni Steffani Hernández alumno de maestría recibió la beca No. 372444 del CONACyT.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no hay conflictos de interés.

Contribución de los autores

Giovanni Steffani Hernández analizó los datos mediante informática.

Edith Rojas Anaya y Elizabeth Loza Rubio analizaron los datos y escribieron la nota.

Fernando Chávez Maya hizo la secuenciación y escribió la nota.

Gary García Espinosa diseñó la investigación, analizó los datos mediante informática, estudió la información computacional obtenida y escribió la nota.

Referencias

- 1) Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215:403-410.
- 2) Armas Bojórquez E, Rojas Anaya E, Diosdado Vargas F, García Espinosa G, Loza-Rubio E. 2015. Evaluation of polyvalent vaccine obtained from divergent low pathogenic H5N2 isolates of the avian influenza virus in Mexico. *SM Vaccines and Vaccination Journal*, 1:1010.
- 3) Berhane Y, Joseph T, Kehler H, Hisanaga T, Embury-Hyatt C, Diederich S, Hooper McGreevy K, Handel K, Cottam-Birt C, Pasick J. 2014. Characterization of a low pathogenic avian influenza H5N2 virus isolated from a turkey breeder flock in Manitoba, Canada. *Avian Diseases*, 58(1):1-7. DOI: 10.1637/10591-061213-Reg.1. <http://dx.doi.org/10.1637/10591-061213-Reg.1>
- 4) Carranza-Flores JM, Padilla-Noriega L, Loza-Rubio E, García-Espinosa G. 2013. Prolonged excretion of a low-pathogenicity H5N2 avian influenza virus strain in the Pekin duck. *Journal of Veterinary Science*, 14:487-490. DOI: 10.4142/jvs.2013.14.4.487. <http://dx.doi.org/10.4142/jvs.2013.14.4.487>
- 5) Causey D, Edwards SV. 2008. Ecology of avian influenza virus in birds. *Journal of Infectious Diseases*, 197:S29-33.
- 6) Chang-Chun DL, Huachen Z, Pei-Yu H et al. 2014. Emergence and evolution of avian H5N2 influenza viruses in chickens in Taiwan. *Journal of Virology*, 88(10):5677-5686. DOI: 10.1128/JVI.00139-14. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00139-14>
- 7) Deshpande KL, Fried VA, Ando M, Webster RG. 1987. Glycosylation affects cleavage of an H5N2 influenza virus hemagglutinin and regulates virulence. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 84:36-40.
- 8) Escorcía M, Carrillo-Sánchez K, March-Mifsut S, Chapa J, Lucio E, Nava GM. 2010. Impact of antigenic and genetic drift on the serologic surveillance of H5N2 avian influenza viruses. *BioMed Central Veterinary Research*, 6:57. DOI: 10.1186/1746-6148-6-57. <http://dx.doi.org/10.1186/1746-6148-6-57>
- 9) Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31:3784-3788. DOI: 10.1093/nar/gkg563

- 10) Ha Y, Stevens DJ, Skehel JJ, Wiley DC. 2001. X-ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 98(20):11181-11186. DOI: 10.1073/pnas.201401198. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.201401198>
- 11) Hayashi T, MacDonald LA, Takimoto T. 2015. Influenza A virus protein PA-X contributes to viral growth and suppression of the host antiviral and immune responses. *Journal of Virology*, 89(12):6442-6452. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00319-15>
- 12) Hu J, Mo Y, Wang X, Gu M, Hu Z, Zhong L, Wu Q, Hao X, Hu S, Liu W, Liu H, Liu X, Liu X. 2015. PA-X decreases the pathogenicity of highly pathogenic H5N1 influenza A virus in avian species by inhibiting virus replication and host response. *Journal of Virology*, 89(8):4126-4142. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02132-14>
- 13) Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of Virology*, 146:2275-2289. DOI: 10.1007/s007050170002. <http://dx.doi.org/10.1007/s007050170002>
- 14) Jagger BW, Wise HM, Kash JC, Walters KA, Wills NM, Xiao YL, Dunfee RL, Schwartzman LM, Ozinsky A, Bell GL, Dalton RM, Lo A, Efstathiou S, Atkins JF, Firth AE, Taubenberger JK, Digard P. 2012. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science*, 337:199-204. DOI: 10.1126/science.1222213. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1222213>
- 15) Lee CW, Senne DA, Suarez DL. 2004. Effect of vaccine use in the evolution of Mexican lineage H5N2 avian influenza virus. *Journal of Virology*, 78(15):8372-8381. DOI: 10.1128/JVI.78.15.8372-8381.2004. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.15.8372-8381.2004>
- 16) Li J, Dohna H, Cardona CJ, Miller J, Carpenter TE. 2011. Emergence and genetic variation of neuraminidase stalk deletions in avian influenza viruses. *PLoS One*, 6:e14722. DOI: 10.1371/journal.pone.0014722. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0014722>
- 17) Li Q, Wang X, Sun Z, Hu J, Gao Z, Hao X, Li J, Liu H, Wang X, Gu M, Xu X, Liu X. 2015. Adaptive mutations in PB2 gene contribute to the high virulence of a natural reassortant H5N2 avian influenza in mice. *Virus Research*, 210:255-263. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2015.08.017>
- 18) MacAuley JL, Chipuk JE, Boyd KL, Van De Velde N, Green DR, McCullers JA. 2010. PB1-F2 proteins from H5N1 and 20th century pandemic influenza viruses cause immunopathology. *Plos Pathogen*, 6:e1001014. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001014>
- 19) Marjuki H, Scholtissek C, Franks J, Negovetich NJ, Aldridge JR *et al.* 2010. Three amino acid changes in PB1-F2 of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus affect pathogenicity in mallard ducks. *Archives of Virology*, 155:925-934.
- 20) Neumann G, Kawaoka Y. 2011. *Influenza Viruses: Molecular Virology. Encyclopedia of Life Sciences*. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001031.pub3. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470015902.a0001031.pub3>
- 21) Okamatsu M, Saito T, Yamamoto Y, Mase M, Tsuduku S, Nakamura K, Tsukamoto K, Yamaguchi S. 2007. Low pathogenicity H5N2 avian influenza outbreak in Japan during the 2005-2006. *Veterinary Microbiology*, 124:35-46.

- 22) Petrini A, Vallat B. 2009. Notification of avian influenza and newcastle disease to the Organization for Animal Health (OIE). In: Capua I, Alexander DJ. (eds). *Avian Influenza and Newcastle Disease*. Milan, Italy: Springer-Verlag.
- 23) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 74(12):5463-5467.
- 24) Soda K, Cheng MC, Yoshida H, Endo M, Lee SH, Okamatsu M, Sakoda Y, Wang CH, Kida H. 2011. A low pathogenic H5N2 influenza virus isolated in Taiwan acquired high pathogenicity by consecutive passages in chickens. *Journal of Veterinary Medical Science*, 73(6):767-772.
- 25) Swayne DE, Perdue ML, Garcia M, Rivera-Cruz E, Brugh M. 1997. Pathogenicity and diagnosis of H5N2 Mexican avian influenza viruses in chickens. *Avian Diseases*, 41(2):335-346.
- 26) Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. *MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Method*. <http://www.megasoftware.net/> [access: 07 apr 2014].
- 27) Villarreal-Chavez C, Rivera-Cruz E. 2003. An update on avian influenza in Mexico. *Avian Diseases*, 47(3):1002-1005.
- 28) Wood GW, Banks J, Strong I, Parsons G, Alexander DJ. 1996. An avian influenza virus of H10 subtype that is highly pathogenic for chickens, but lacks multiple basic amino acids at the haemagglutinin cleavage site. *Avian Pathology*, 25:799-806. DOI: 10.1080/03079459608419182. <http://dx.doi.org/10.1080/03079459608419182>
- 29) Zhao G, Gu X, Lu X, Pan J, Duan Z, Zhao K, Gu M, Liu Q, He L, Chen J, Ge S, Wang Y, Chen S, Wang X, Peng D, Wan H, Liu X. 2012. Novel Reassortant highly pathogenic H5N2 avian influenza viruses in poultry in China. *PLoS One*, 7(9):e46183. DOI: 10.1371/journal.pone.0046183. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0046183>

Genomic analysis of an atypical Mexican low-pathogenic H5N2 avian influenza virus

Giovanni Steffani Hernández¹
 Fernando Chávez Maya¹
 Edith Rojas Anaya²
 Elizabeth Loza Rubio²
 0000-0001-6812-9239
 Gary García Espinosa^{1,*}

¹ Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves
 Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
 Universidad Nacional Autónoma de México
 Av. Universidad 3000, CP 04510, DF, México

² Centro Nacional de Investigación Disciplinaria
 en Microbiología Animal
 Instituto Nacional de Investigaciones Forestales
 Agrícolas y Pecuarias
 México D. F., 05110, México

***Corresponding author:**
 Tel: (55)-5622-5867 Ext. 207
 Email address:
gary@unam.mx

Abstract

We analysed the genome of a low-pathogenic avian H5N2 influenza virus isolated from the faeces of experimentally infected Pekin ducks and Leghorn-type chickens to determine its origin and molecular characteristics. The complete genomic sequence was determined using a Sanger-based genome sequencing method and was subsequently characterized by phylogenetic analysis and genetic comparison. The results of this study showed that 8 genomic segments corresponded to an avian influenza virus that were related with strains isolated in Mexico. Investigation of the haemagglutinin gene revealed the presence of few basic amino acids at the cleavage site and lack of a potential N-glycosylation site at position 11. The gene encoding the PB1 protein lacked PB1-F2 and the basic polymerase gene codes for PA-X. In addition, the basic polymerase gene contained the consensus ribosomal frameshifting motif TCC TTT CGT C, which is required for the expression of the PA-X. Molecular characteristics showed that the virus has features of a low-pathogenic H5 influenza virus with the exception of a potential N-glycosylation site at position 11. The genome information for this particular virus will provide a molecular map for further *in vivo* studies to identify why some influenza viruses can persist in chickens for long periods of time. Such information will be useful in countries such as Mexico, where the virus has been a poultry health problem since 1994 and has the potential to evolve high pathogenicity.

Keywords: Avian influenza; H5N2; Low-pathogenicity; Chicken embryos; Genome.

Received: 2015-09-02
 Accepted: 2016-05-09
 Published: 2016-06-28

Additional information and declarations
 can be found on page 7

© Copyright 2016
 Giovanni Steffani Hernández *et al.*

open access 



Distributed under Creative Commons CC-BY 4.0

Introduction

The avian influenza virus belongs to the *Orthomyxoviridae* family and the genus *Influenzavirus type A*. It is known that low-pathogenic avian influenza (LPAI) viruses cause mild to subclinical disease in chickens, but they may become highly pathogenic in chickens after multiple passages in chicken populations (Soda *et al.*, 2011). High-pathogenic avian influenza (HPAI) viruses cause severe disease with high mortality and spread rapidly in short periods of time, resulting in high economical losses. In some cases, these viruses might pose a potential contagious threat to

mammals, including humans (Causey and Edwards, 2008). LPAI viruses are those that have an intravenous pathogenicity index (IVPI) lower than 1.2 in 6-week-old chickens or less than 75% mortality in 4- to 8-week-old chickens infected intravenously, as well as absence of multiple basic amino acids at the cleavage site of the HA protein (Petrini & Vallat, 2009). Additionally, there are other features related to the pathogenicity of H5 viruses, such as absence of a potential N-glycosylation site in the haemagglutinin protein (Deshpande *et al.*, 1987), amino acid mutations in the PB2 protein of mouse-adapted H5N2 virus (Li *et al.*, 2015), mutations in the PB1-F2 protein in mice and ducks (MacAuley *et al.*, 2010; Marjuki *et al.*, 2010), as well as the presence of a PA-X protein that suppresses viral replication and the host antiviral response in mouse and avian species (Jagger *et al.*, 2012; Hayashi *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2015).

Since December 1994, when the high- and low-pathogenic H5N2 avian influenza viruses were isolated in Mexico, an avian influenza vaccination campaign was established as part of an eradication programme that used inactivated, emulsified, and recombinant pox-avian influenza vaccines. However, only the high-pathogenic avian influenza (HPAI) was eradicated (Villarreal-Chavez and Rivera-Cruz, 2003). Since then, LPAI has been controlled by the officially authorized virus strain A/Ck/México/CPA-232/1994 (H5N2), which is a unique case of long-term massive vaccination of poultry in Mexico. However, major antigenic differences between isolates have been reported through haemagglutination inhibition and virus neutralization tests from viruses isolated between the years of 1993–2002 and 1994–2008, compared to the virus strain A/Ck/México/CPA-232/1994 (H5N2), which suggest that the vaccine does not protect and allows for the circulation of LPAI viruses in specific regions of Mexico (Lee *et al.*, 2004; Escorcía *et al.*, 2010; Armas *et al.*, 2015). Additionally, LPAI virus (H5N2) isolates from chickens in Mexico were genetically closely related to LPAI virus (H5N2) isolates from outbreaks in Taiwan (Chang-Chun *et al.*, 2014) and Central America (Okamatsu *et al.*, 2007).

At present, few isolates of the low-pathogenic virus H5N2 subtype have been reported by the Mexican-American Commission for the Prevention of Foot and Mouth Disease and Other Exotic Animal Diseases (CPA) laboratory, and positive identification of the virus at poultry farms results in massive culling of flocks. So far, the impact of H5N2 virus in Mexico is limited to poultry health, and no high-pathogenicity strain has yet been reported. Most studies of the Mexican LPAIV (H5N2) have been focusing on antigenic drift to justify vaccine development, but other biological or molecular features have not been investigated. During a biological study on the infection with the A/chicken/Mexico/2007(H5N2) influenza virus in specific pathogen free (SPF) Leghorn-type chickens and commercial Pekin ducks, we described that viral replication preferentially occurred in the respiratory tract of chickens and in the digestive tract of ducks and that H5N2 did not cause death in either species but caused mild illness and prolonged shedding of the virus, as determined by RT-qPCR. Furthermore, we discovered that SPF Leghorn-type chickens recovered from illness, which is an interesting trait of this strain (Carranza-Flores *et al.*, 2013). In the present study we characterize the viral genome of A/chicken/Mexico/2007(H5N2) to determine its phylogenetic origin and molecular characteristics associated with pathogenicity to better understand the genetic features related to low-pathogenicity in this particular Mexican strain.

Materials and Methods

Genome analysis

Viral RNA was extracted from the allantoic fluid (stored at -75°C) using a PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to the supplier's specifications. Each of the 8 segments of the viral genome was amplified by RT-PCR with primers following a previously reported protocol (Hoffman *et al.*, 2001) using the Qiagen OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany). The complete genomic sequence was determined by a Sanger-based genome sequencing method (Sanger *et al.*, 1977) using the BigDye terminator v3.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The obtained sequences were aligned and edited using MEGA software version 5.05 (Tamura *et al.*, 2011). Each of the 8 segments was compared to sequences available in GenBank using a BLAST algorithm (Altschul *et al.*, 1990). Phylogenetic trees were constructed for each of the 8 genes using a neighbour-joining algorithm using 1000 bootstrap replicates without making assumptions about ancestry or evolutionary history (Tamura *et al.*, 2011). The translation of nucleotide sequences into deduced amino acid sequences was performed by the ExPASy translate tool (Gasteiger, 2003).

Accession Numbers

The nucleotide sequences of the 8 segments obtained in this study were submitted to the GenBank nucleotide sequence database with the following accession numbers: Polymerase basic protein 2 (PB2) [KJ729340]; polymerase basic protein 1 (PB1) [KJ729341]; polymerase acid protein (PA) [KJ729342]; haemagglutinin (HA) [KJ729343]; nucleocapsid protein (NP) [KJ729344]; neuraminidase (NA) [KJ729345]; matrix protein (M) [KJ729346]; and non-structural protein (NS) [KJ729347].

Results and discussion

Genome analysis

The 8 genes of the viral genome encode 11 proteins (PB2, PB1, PA, PA-X, HA, NP, NA, M1, M2, NS1, and NEP) with 759, 757, 716, 252, 564, 493, 449, 252, 97, 230, and 121 amino acids, respectively. Interestingly, the A/chicken/Mexico/2007 (H5N2) virus lacks PB1-F2, but encodes a PA-X protein. Also the PA gene contains the sequence TCC TTT CGT C that allows for a ribosomal frameshift leading to expression of PA-X. In addition, the A/chicken/Mexico/2007 (H5N2) viral genome encodes few basic amino acids at the cleavage site of the HA protein (V-P-Q-R-E-X-R | G-L). Based on the genomic sequence, the HA protein of this virus has 5 potential N-glycosylation sites near the cleavage site at amino acids 27, 39, 179, 302 and 555. Additionally, the HA1 receptor binding site of this H5N2 virus has the amino acid residues Q226 and G228. The neuraminidase has a deletion of 20 amino acids in the stalk region.

A multiple sequence alignment analysis of each genomic segment of the A/chicken/Mexico/2007 (H5N2) viral genome showed that 7 genes have the closest relationship (99% similarity) with the A/chicken/Veracruz/1433-1/2006 (H5N2) virus. The HA gene shared 99% similarity to the HA gene of A/chicken/

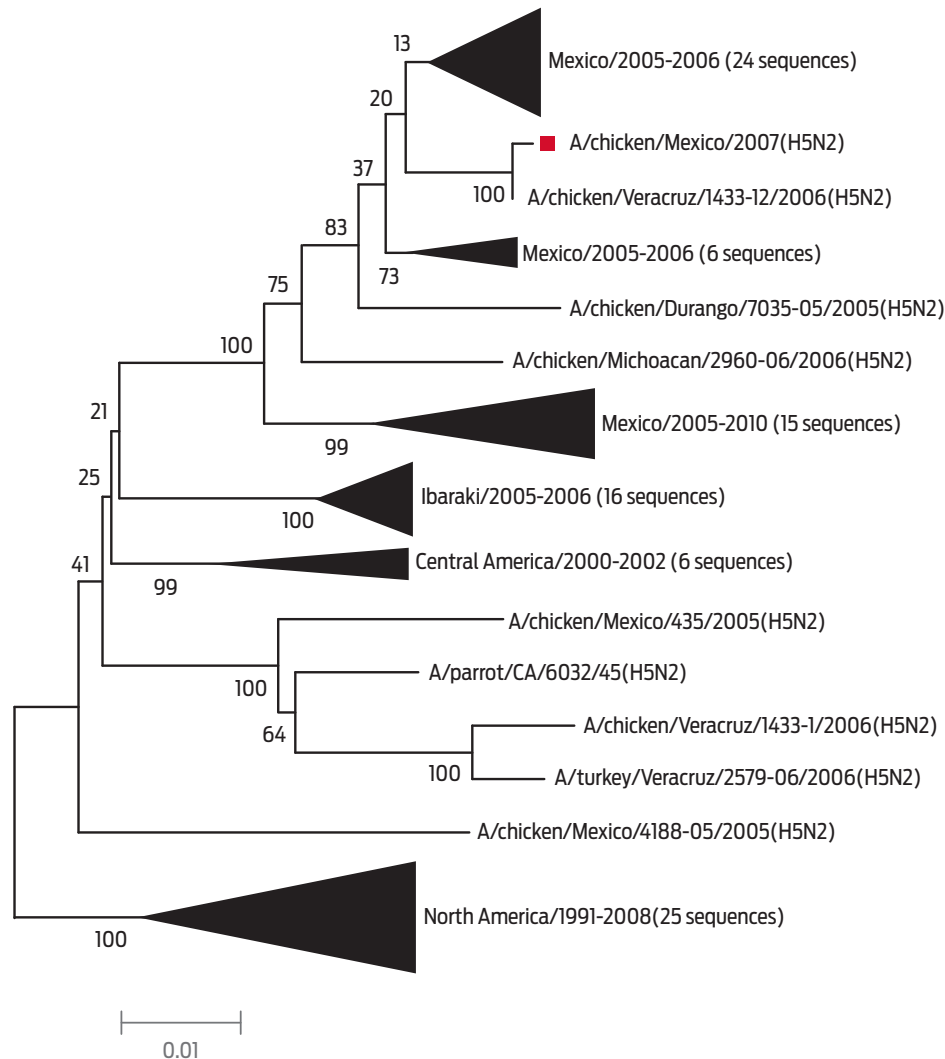


Figure 1. Phylogenetic tree of the HA gene of A/chicken/Mexico/2007 (H5N2) Influenza A virus [■]. The phylogenetic tree was constructed using the neighbour-joining method. The percentages of replicate trees in which the associated taxa clustered together in a bootstrap test (1,000 replicates) are shown next to the branches. The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method. The analysis involved 101 chicken nucleotide sequences. Evolutionary analyses were conducted in MEGA 5.05. A larger triangle size represents a larger number of nucleotide sequences with genetic relationship.

Veracruz/1433-12/2006 (H5N2) and 93% similarity to the HA gene of A/chicken/Veracruz/1433-1/2006 (H5N2) (Figure 1). The multiple sequence alignment analysis of the amino acids from each predicted protein produced similar results. All 8 genes had <98% similarity to virus isolates from other states of Mexico. The availability of several complete sequences of contemporary isolated viruses on the GenBank database allowed for an elaborated phylogenetic analysis of the PB2, PB1, PA, NP, NA, M and NS genes between A/chicken/Mexico/2007 (H5N2) and A/chicken/Veracruz/1433-1/2006 (H5N2) as well as an analysis of the HA genes of A/chicken/Mexico/2007 (H5N2) and A/chicken/Veracruz/1433-12/2006 (H5N2). Representative phylogenetic trees showing relationships between 101 chicken nucleotide sequences for the HA (Figure 1) and NA genes (Figure 2) are shown as 15 and 27 branches, respectively, with some branches representing collapsed groups.

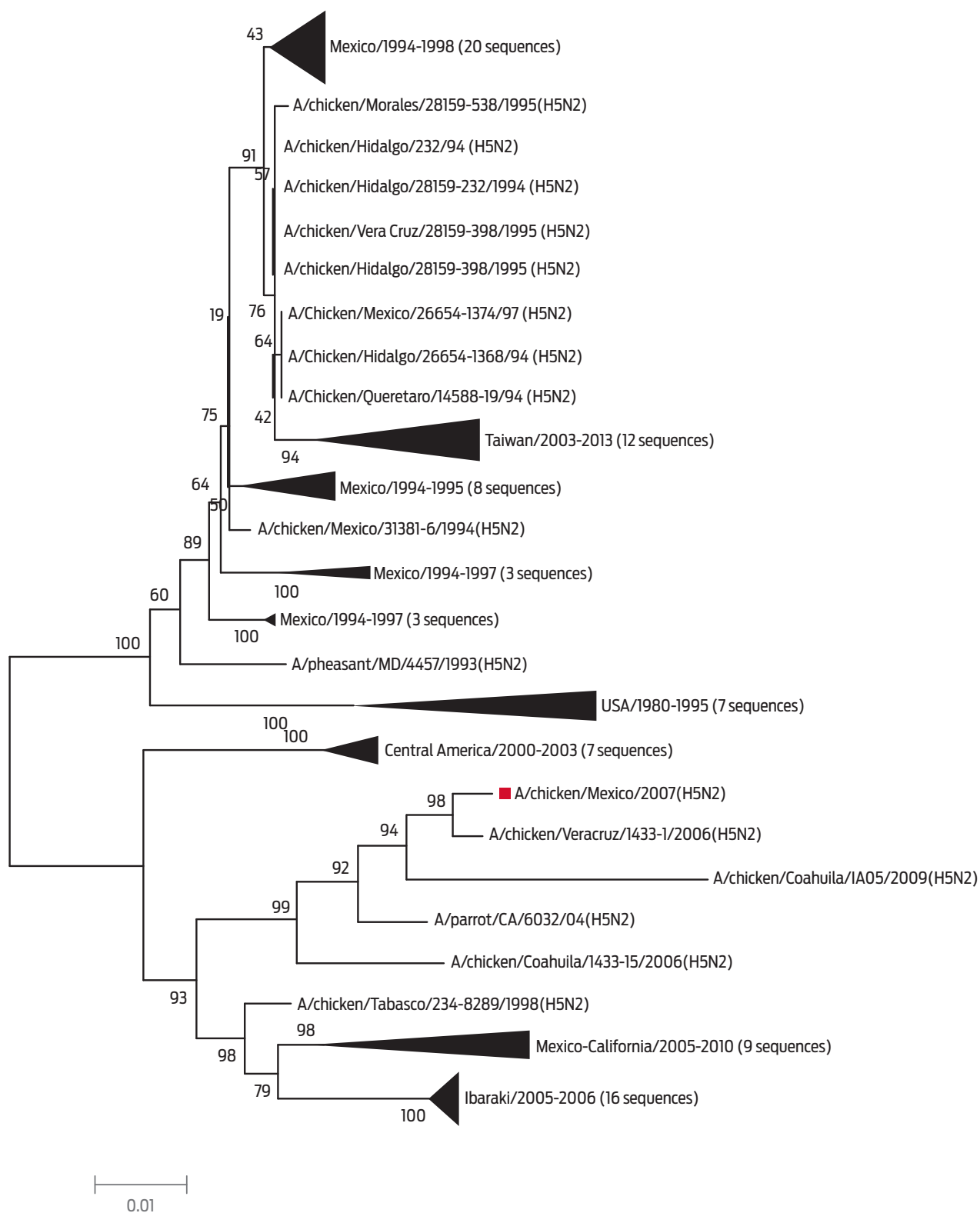


Figure 2. Phylogenetic tree of the NA gene of A/chicken/Mexico/2007 (H5N2) Influenza A virus [■]. The phylogenetic tree was constructed using the neighbour-joining method. The percentages of replicate trees in which the associated taxa clustered together in a bootstrap test (1,000 replicates) are shown next to the branches. The evolutionary distances were computed using the Kimura 2-parameter method. The analysis involved 101 chicken nucleotide sequences. Evolutionary analyses were conducted in MEGA 5.05. A larger triangle size represents a larger number of nucleotide sequences with genetic relationship.

In the figures, larger triangle size represents a larger number of avian nucleotide sequences with genetic similarities.

The genome of the A/chicken/Mexico/2007 (H5N2) virus encodes 11 proteins (Neuman and Kawaoka, 2011). The genome lacks the PB1-F2 gene, which has been associated with increased pathogenicity in avian hosts (Marjuki *et al.*, 2010). The viral genome does encode the PA-X protein that has been shown to represses viral replication and immune response in the mouse and chicken. Together, these findings explain the virus's low-pathogenicity *in vivo* (Jagger *et al.*, 2012; Hayashi *et al.*, 2015; Hu *et al.*, 2015). The genome of the A/chicken/Mexico/2007 virus contains of a conserved ribosomal frameshifting motif that allows for expression of the PA-X gene in low-pathogenic influenza A virus in avian species (Hu *et al.*, 2015). The HA1 receptor binding sequence in this viral genome encode amino acid residues Q226 and G228, which preferentially bind to avian sialic acid receptors in α 2-3 linkages (Ha *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2012). The HA gene of A/chicken/Mexico/2007 has few basic amino acids at the cleavage site of the HA (V-P-Q-R-E-X-R | G-L), which is characteristic of most avian influenza viruses with low pathogenicity (Berhane *et al.*, 2014; Chang-Chun *et al.*, 2014; Wood *et al.*, 1996). However, the lack of a specific potential N-glycosylation site at position 11 near the HA cleavage site could be associated with increased pathogenicity (Deshpande *et al.*, 1987). The neuraminidase exhibits a 20 amino acid deletion at the stalk region, which is an adaptive feature to poultry (Li *et al.*, 2011).

The phylogenetic analyses of A/chicken/Mexico/2007 (H5N2) show that this strain could have originated in 2006 from the Gulf coast state of Veracruz. Veracruz is well connected to other states by highways located in the north and central high plateau, where the main region of poultry farms is located. The 8 genes of the A/chicken/Mexico/2007 (H5N2) were related to low-pathogenic avian influenza viruses from chickens in different states of Mexico, indicating no introduction of foreign subtypes. In addition, the A/chicken/Mexico/2007 (H5N2) HA and NA genes exhibit the highest similarity to A/chicken/Veracruz/1433-12/2006 (H5N2).

Conclusions

The molecular characterization of the present virus shows that most of the molecular features could explain the low-pathogenicity observed in Leghorn-type chickens including the presence of a PA-X protein, the lack of a PB1-F2 protein and absence of polybasic amino acids at the HA cleavage site. The lack of a specific N-glycosylation site at position 11 of the HA cleavage site might be the only feature of this viral genome that can be associated with potential virulence. This characterization of the molecular features of this strain will contribute to understanding how LPAI (H5N2) viruses continue to be endemic in Mexico for long periods of time without evolving high-pathogenicity.

Funding

This study was funded by the *Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica* (PAPIIT, No. IN216212), Universidad Nacional Autónoma de México.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Author contributions

Giovanni Steffani Hernández conducted the bioinformatic analysis and received a scholarship from CONACyT (No. 372444); Edith Rojas Anaya and Elizabeth Loza Rubio analyzed the data and wrote the manuscript; Fernando Chávez Maya did de sequencing and analysed the data; and wrote the manuscript; Gary García Espinosa designed the research, conducted the bioinformatic analysis, analysed the data and wrote the paper.

References

- 1) Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215:403-410.
- 2) Armas Bojórquez E, Rojas Anaya E, Diosdado Vargas F, García Espinosa G, Loza-Rubio E. 2015. Evaluation of polyvalent vaccine obtained from divergent low pathogenic H5N2 isolates of the avian influenza virus in Mexico. *SM Vaccines and Vaccination Journal*, 1:1010.
- 3) Berhane Y, Joseph T, Kehler H, Hisanaga T, Embury-Hyatt C, Diederich S, Hooper McGreevy K, Handel K, Cottam-Birt C, Pasick J. 2014. Characterization of a low pathogenic avian influenza H5N2 virus isolated from a turkey breeder flock in Manitoba, Canada. *Avian Diseases*, 58(1):1-7. DOI: 10.1637/10591-061213-Reg.1. <http://dx.doi.org/10.1637/10591-061213-Reg.1>
- 4) Carranza-Flores JM, Padilla-Noriega L, Loza-Rubio E, García-Espinosa G. 2013. Prolonged excretion of a low-pathogenicity H5N2 avian influenza virus strain in the Pekin duck. *Journal of Veterinary Science*, 14:487-490. DOI: 10.4142/jvs.2013.14.4.487. <http://dx.doi.org/10.4142/jvs.2013.14.4.487>
- 5) Causey D, Edwards SV. 2008. Ecology of avian influenza virus in birds. *Journal of Infectious Diseases*, 197:S29-33.
- 6) Chang-Chun DL, Huachen Z, Pei-Yu H *et al.* 2014. Emergence and evolution of avian H5N2 influenza viruses in chickens in Taiwan. *Journal of Virology*, 88(10):5677-5686. DOI: 10.1128/JVI.00139-14. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00139-14>
- 7) Deshpande KL, Fried VA, Ando M, Webster RG. 1987. Glycosylation affects cleavage of an H5N2 influenza virus hemagglutinin and regulates virulence. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 84:36-40.
- 8) Escorcía M, Carrillo-Sánchez K, March-Mifsut S, Chapa J, Lucio E, Nava GM. 2010. Impact of antigenic and genetic drift on the serologic surveillance of H5N2 avian influenza viruses. *BioMed Central Veterinary Research*, 6:57. DOI: 10.1186/1746-6148-6-57. <http://dx.doi.org/10.1186/1746-6148-6-57>

- 9) Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A. 2003. ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31:3784-3788. DOI: 10.1093/nar/gkg563
- 10) Ha Y, Stevens DJ, Skehel JJ, Wiley DC. 2001. X-ray structures of H5 avian and H9 swine influenza virus hemagglutinins bound to avian and human receptor analogs. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 98(20):11181-11186. DOI: 10.1073/pnas.201401198. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.201401198>
- 11) Hayashi T, MacDonald LA, Takimoto T. 2015. Influenza A virus protein PA-X contributes to viral growth and suppression of the host antiviral and immune responses. *Journal of Virology*, 89(12):6442-6452. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.00319-15>
- 12) Hu J, Mo Y, Wang X, Gu M, Hu Z, Zhong L, Wu Q, Hao X, Hu S, Liu W, Liu H, Liu X, Liu X. 2015. PA-X decreases the pathogenicity of highly pathogenic H5N1 influenza A virus in avian species by inhibiting virus replication and host response. *Journal of Virology*, 89(8):4126-4142. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.02132-14>
- 13) Hoffmann E, Stech J, Guan Y, Webster RG, Perez DR. 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of Virology*, 146:2275-2289. DOI: 10.1007/s007050170002. <http://dx.doi.org/10.1007/s007050170002>
- 14) Jagger BW, Wise HM, Kash JC, Walters KA, Wills NM, Xiao YL, Dunfee RL, Schwartzman LM, Ozinsky A, Bell GL, Dalton RM, Lo A, Efstathiou S, Atkins JF, Firth AE, Taubenberger JK, Digard P. 2012. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science*, 337:199-204. DOI: 10.1126/science.1222213. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1222213>
- 15) Lee CW, Senne DA, Suarez DL. 2004. Effect of vaccine use in the evolution of Mexican lineage H5N2 avian influenza virus. *Journal of Virology*, 78(15):8372-8381. DOI: 10.1128/JVI.78.15.8372-8381.2004. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.78.15.8372-8381.2004>
- 16) Li J, Dohna H, Cardona CJ, Miller J, Carpenter TE. 2011. Emergence and genetic variation of neuraminidase stalk deletions in avian influenza viruses. *PLoS One*, 6:e14722. DOI: 10.1371/journal.pone.0014722. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0014722>
- 17) Li Q, Wang X, Sun Z, Hu J, Gao Z, Hao X, Li J, Liu H, Wang X, Gu M, Xu X, Liu, X. 2015. Adaptive mutations in PB2 gene contribute to the high virulence of a natural reassortant H5N2 avian influenza in mice. *Virus Research*, 210:255-263. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2015.08.017>
- 18) MacAuley JL, Chipuk JE, Boyd KL, Van De Velde N, Green DR, McCullers JA. 2010. PB1-F2 proteins from H5N1 and 20th century pandemic influenza viruses cause immunopathology. *Plos Pathogen*, 6:e1001014. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001014>
- 19) Marjuki H, Scholtissek C, Franks J, Negovetich NJ, Aldridge JR et al. 2010. Three amino acid changes in PB1-F2 of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus affect pathogenicity in mallard ducks. *Archives of Virology*, 155:925-934.
- 20) Neumann G, Kawaoka Y. 2011. *Influenza Viruses: Molecular Virology. Encyclopedia of Life Sciences*. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001031.pub3. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470015902.a0001031.pub3>

- 21) Okamatsu M, Saito T, Yamamoto Y, Mase M, Tsuduku S, Nakamura K, Tsukamoto K, Yamaguchi S. 2007. Low pathogenicity H5N2 avian influenza outbreak in Japan during the 2005-2006. *Veterinary Microbiology*, 124:35-46.
- 22) Petrini A, Vallat B. 2009. Notification of avian influenza and newcastle disease to the Organization for Animal Health (OIE). In: Capua I, Alexander DJ. (eds). *Avian Influenza and Newcastle Disease*. Milan, Italy: Springer-Verlag.
- 23) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 74(12):5463-5467.
- 24) Soda K, Cheng MC, Yoshida H, Endo M, Lee SH, Okamatsu M, Sakoda Y, Wang CH, Kida H. 2011. A low pathogenic H5N2 influenza virus isolated in Taiwan acquired high pathogenicity by consecutive passages in chickens. *Journal of Veterinary Medical Science*, 73(6):767-772.
- 25) Swayne DE, Perdue ML, Garcia M, Rivera-Cruz E, Brugh M. 1997. Pathogenicity and diagnosis of H5N2 Mexican avian influenza viruses in chickens. *Avian Diseases*, 41(2):335-346.
- 26) Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. *MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Method*. <http://www.megasoftware.net/> [access: 07 apr 2014].
- 27) Villarreal-Chavez C, Rivera-Cruz E. 2003. An update on avian influenza in Mexico. *Avian Diseases*, 47(3):1002-1005.
- 28) Wood GW, Banks J, Strong I, Parsons G, Alexander DJ. 1996. An avian influenza virus of H10 subtype that is highly pathogenic for chickens, but lacks multiple basic amino acids at the haemagglutinin cleavage site. *Avian Pathology*, 25:799-806. DOI: 10.1080/03079459608419182. <http://dx.doi.org/10.1080/03079459608419182>
- 29) Zhao G, Gu X, Lu X, Pan J, Duan Z, Zhao K, Gu M, Liu Q, He L, Chen J, Ge S, Wang Y, Chen S, Wang X, Peng D, Wan H, Liu X. 2012. Novel Reassortant highly pathogenic H5N2 avian influenza viruses in poultry in China. *PLoS One*, 7(9):e46183. DOI: 10.1371/journal.pone.0046183. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0046183>