

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 hemaglutinina reveló que codifica para pocos aminoácidos básicos en el sitio de corte y quizás 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 períodos 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: 2015-09-02
 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



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 pasajes 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; Escoria *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).

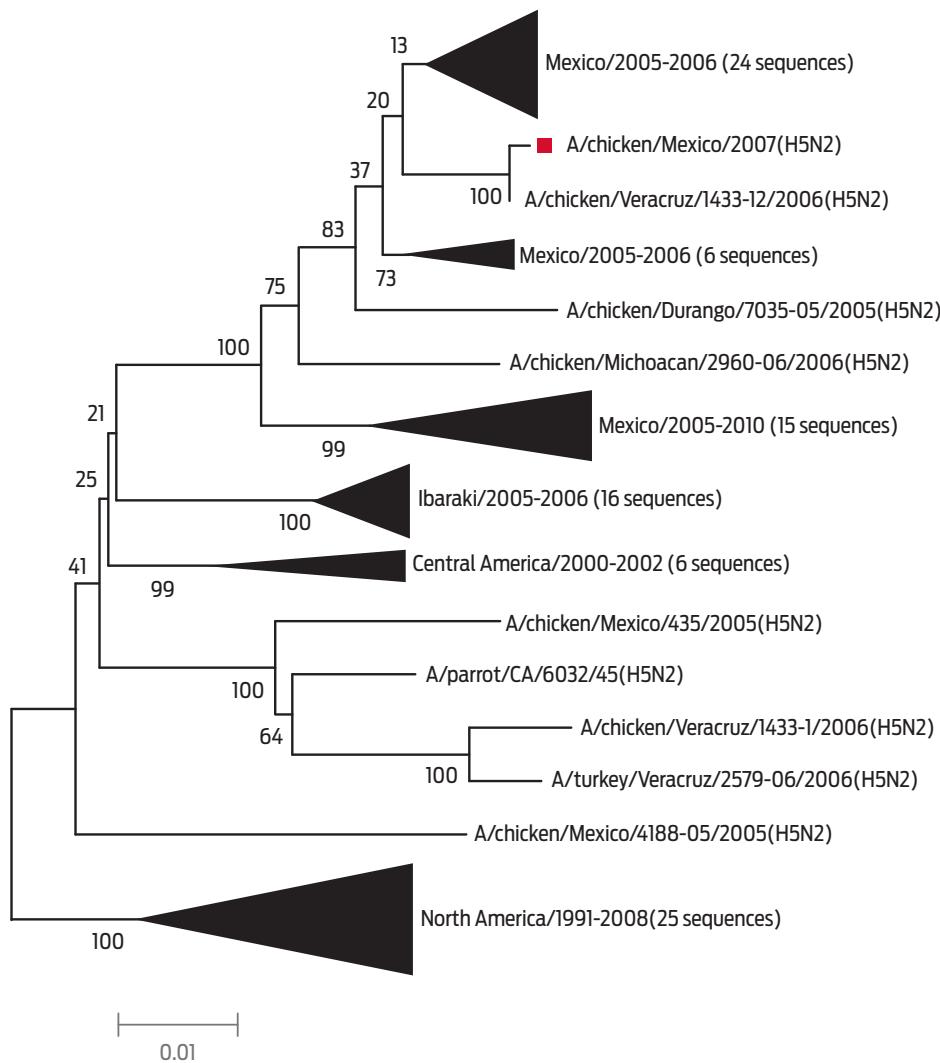


Figura 1. Árbol filogenético del gen HA del virus de influenza A/pollo/Méjico/2007 (H5N2) [■]. El árbol filogenético se construyó a través del método de Neighbor-joining. Los porcentajes de cada rama donde están representados los grupos taxonómicos con 1000 replicas se expresan cerca de las ramas. Las 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/Méjico/2007 (H5N2) y el A/pollo/Veracruz//1433-1/2006 (H5N2), así como el análisis de los genes de la HA del A/pollo/Méjico/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/Méjico/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/Méjico/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/Méjico/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/Méjico/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/Méjico/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/Méjico/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.

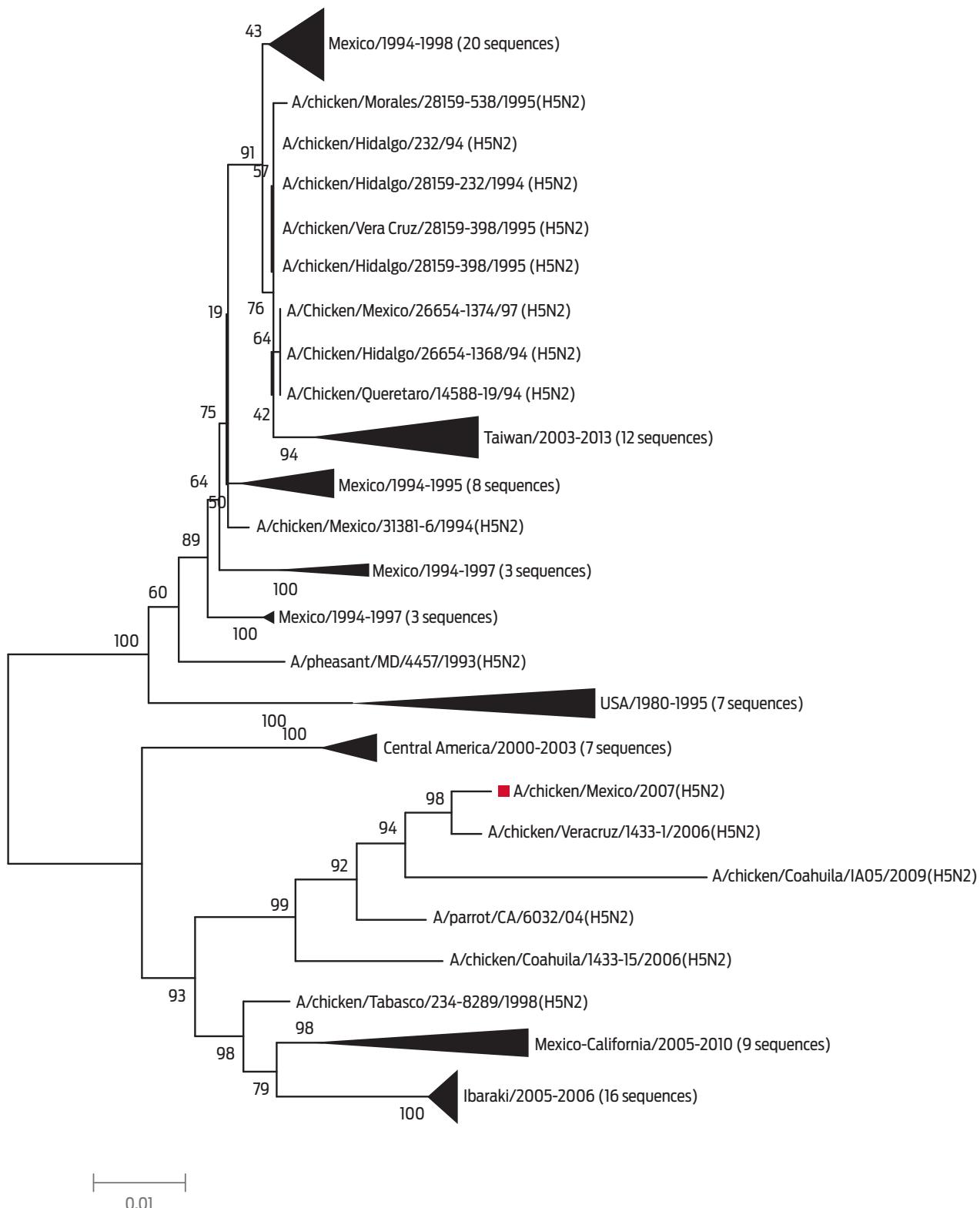


Figura 2. Árbol filogenético del gen NA del virus de influenza A/pollo/Méjico/2007 (H5N2) [■]. El árbol filogenético se construyó a través del método de Neighbor-joining. Los porcentajes de cada rama donde están representados los grupos taxonómicos con 1000 replicas se expresan cerca de las ramas. Las 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) Escoria 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 ad immune responses. *Journal of Virology*, 89(12):6442-6452. <http://dx.doi: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: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, Efstratiou 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>