

МАЛ ШАРУАШЫЛЫҒЫ ЖӘНЕ ВЕТЕРИНАРИЯ
ЖИВОТНОВОДСТВО И ВЕТЕРИНАРИЯ
STOCK-RAISING AND VETERINARY

МРНТИ 68.41.53
УДК 619:616.921.5

DOI <https://doi.org/10.37884/4-2021/01>

Ш.Д. Өрқара, Н.Т. Сандыбаев, К.К. Табынов*

*Казахский национальный аграрный исследовательский университет,
(г.Алматы, Казахстан), 507698@kaznaru.edu.kz*, nurlan.s@kaznaru.edu.kz;
kairat.tabynov@kaznaru.edu.kz*

ТИПИЗАЦИЯ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ МЕТОДОМ ОТ-ПЦР

Аннотация.

Вспышки птичьего гриппа среди диких и домашних птиц все больше являются частым явлением во всем мире. За последние 15 лет вспышки гриппа птиц, в частности вызванные вирусами H5, происходящими из линии A/Goose/Guangdong/1/1996, возникшей в Юго-Восточной Азии в 1996 г., все чаще происходили в Европе и Азии. В период с 2005 по 2020 год в мире было выявлено не менее десяти глобальных вспышек ВПГ H5, что привело к массовой гибели домашних и диких птиц. В последние годы применение молекулярных методов для обнаружения вирусных нуклеиновых кислот стало важным инструментом для выявления вируса гриппа птиц и идентификации подтипов гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (НА). К числу таких методов относится ОТ-ПЦР. Обратная транскриптазная - полимеразная цепная реакция – реакция синтеза ДНК-копии (кДНК) на матрице РНК с использованием специального фермента – обратной транскриптазы, также называемой ревертазой. Затем кДНК амплифицируется с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). В данной статье представлены результаты типирования вируса гриппа птиц методом ПЦР. В 2020 году в одном из частных подворий на территории Алматинской области был отмечен падеж домашней птицы, с симптомами похожими на вирус птичьего гриппа. В результате проведенных лабораторных исследований был типирован вирус гриппа птиц подтипа H5 методом ОТ-ПЦР.

Ключевые слова: *вирус, грипп птиц, H5, типизация, гемагглютинин, подтипы гриппа, домашняя птица, ОТ-ПЦР.*

Введение.

Птицеводство является одной из важнейших составляющих агропромышленного комплекса Казахстана. По данным на 1 ноября 2020 года численность птиц в стране составила 45,7 млн. голов, из них 65,5% поголовья птицы сосредоточено в сельхозпредприятиях, 33,1% - в хозяйствах населения и 1,4% - в крестьянских или фермерских хозяйствах и у индивидуальных предпринимателей [1]. Главными направлениями птицеводства являются производство яиц и мяса. В Казахстане функционируют порядка 60 птицефабрик, занимающихся производством продукции птицеводства. Большая плотность птиц сопряжена с возможностью взаимного перезаражения, возникают идеальные условия для циркуляции возбудителей среди поголовья [2]. Для интенсивного ведения птицеводства с большим количеством птицепоголовья всегда были актуальными проблемы связанные с инфекционными заболеваниями.

Птичий грипп – очень заразное острое инфекционное заболевание дыхательной системы птиц, которое наносит серьезный экономический ущерб птицеводству. Вирус птичьего гриппа относится к семейству Orthomyxoviridae [3], его геном представляет собой

одноцепочечную рибонуклеиновую кислоту (РНК), сегментированную, циркулярную и полиморфную, с отрицательной цепью. Геном вируса гриппа кодирует 10 типов белков. Восемь типов этих белков, включая гемагглютинин (НА), М1, М2, NP, PA, NA, PB1 и PB2, являются структурными белками вируса, и два типа, а именно NS1 и NS2, являются неструктурными. Основываясь на антигенных характеристиках поверхностных гликопротеинов (т. е. от H1 до H18) и нейраминидазы (т. е. от N1 до N11) [3], вирусы гриппа типа А делятся на различные подтипы. Вирус птичьего гриппа делится на две основные категории высоко- и слабо патогенных вирусов птичьего гриппа. Как правило, большинство идентифицированных вирусов H5 у домашней птицы и диких птиц во всем мире являются слабопатогенными [5,6] однако вирус может генерировать антигенный дрейф или сдвиг через мутации или реассортации, соответственно, в пределах НА и NA, которые приводит к появлению новых или высокопатогенных вирусов птичьего гриппа [7]. Поверхностный гликопротеин вирусов гриппа играет важную и фундаментальную роль в инфекционных процессах вируса. Он отвечает за связывание вируса с рецепторными клетками сиаловой кислоты находящихся на поверхности клетки хозяина и облегчает проникновение вируса в клетку путем слияния эндосомальных мембран [8].

Целью данной работы являлось типизация вируса гриппа, выделенного от домашней птицы с частных подворий Алматинской области в 2020 г.

Материалы и методы исследований.

Реагенты:

- High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit
- SuperScript III One-Step RT-PCR Kit
- Набор для экстракции РНК Uni-Medica
- 50X TAE буфер;
- агароза основная;
- GeneRuler смесь ДНК-маркер;
- праймеры.

Оборудование:

- Ламинарный бокс Airstream AC2-4E8;
- ПЦР Бокс;
- Гельдокументирующая система INFINITY-VX2-3026;
- Микроспектрофотометр Nanodrop – 2000;
- Амплификатор SimpliAmp, Applied Biosystems
- Твердотельный термостат Гном ДНК-Технология;
- Одноканальные пипетки-дозаторы Eppendorf Research (0,5-10, 10-100, 100-1000 мкл);
- Горизонтальная камера для электрофореза

Методика исследований.

В работе использовали биологический материал (паталогический материал, клоачные и трахеальные смывы) от домашних птиц, взятых с частных подворий Алматинской области.

Пробы для исследований.

Для проведения молекулярной диагностики были исследованы следующие пробы:

- 1 – трахеальные смывы (здоровая птица)
- 2 – клоакальные смывы (здоровая птица)
- 3 – трахеальные смывы
- 4 – клоакальные смывы
- 5 – легкие
- 6 – селезенка
- 7 – трахея
- 8 – илеоцекальные железы

Выделение РНК вируса.

Экстракцию РНК вируса производили с помощью набора Uni-Medica, в соответствии с инструкцией производителя. А именно в 200 мкл пробы добавляли 60 мкл магнитных частиц

и 600 мкл NVDRE буфера затем смесь вортексировали в течение 1 минуты. Далее пробирки помещали на 10 мин. при 68⁰ С в термостат, после инкубации вортексировали смесь в течение 5 минут. Помещали образцы на магнитный штатив, удаляли супернатант, добавляли 600 мкл отмывочного буфера №1 и вортексировали 1 минуту. Удаляли супернатант и добавляли отмывочный буфер №2, далее высушивали образец в термостате при 60⁰ С 5 минут. В пробирку вносили 50 мкл элюционного буфера и помещали в термостат при 60⁰ С на 5 минут, затем ставили на магнитный штатив, супернатант с выделенной РНК переносили в чистые пробирки. Концентрацию и чистоту экстрагированной общей РНК определяли путем измерения коэффициента поглощения при длине волны 260 нм на 280 нм с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США).

Синтез кДНК.

Для синтеза кДНК использовали коммерческий набор High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Состав реакционной смеси для синтеза кДНК вируса гриппа был следующим: буфер для синтеза кДНК, 10×буфер – 2 мкл; 10 mM dNTP – 0,8 мкл; random праймер для кДНК – 2 мкл; фермент обратная транскриптаза – 1 мкл; деионизированная стерильная вода – 4,2 мкл; РНК – 10 мкл. Реакционную смесь обратной транскрипции инкубировали 10 мин при температуре 25⁰С, затем при температуре 37⁰С инкубировали в течение 120 мин. Далее инкубировали 5 минут при температуре 85⁰С. Впоследствии кДНК хранилась при -20 °С.

ПЦР амплификация.

Постановку ОТ-ПЦР проводили с использованием коммерческого набора SuperScript III One-Step RT-PCR Kit согласно инструкции. Состав ПЦР смеси был следующим: 10x Taq Buffer with (NH₄)SO₄ – 2.5 мкл; 25 mM MgCl₂ – 1.5 мкл; dNTP Mix – 2.5 мкл; прямой праймер XiH5-F – 1 мкл; обратный XiH5-R – 1 мкл; Taq полимеразы – 0.25 мкл; деионизированная вода – 14.2 мкл; кДНК – 2 мкл; В качестве положительного контроля были использованы штаммы с генотипом H5N6 и H5N1. В качестве отрицательного контроля использована дистиллированная вода.

Электрофоретический анализ продуктов амплификации. Электрофорез продуктов амплификации проводили в аппарате для горизонтального электрофореза при напряжении 8 В/см. Для электрофореза использовали 2% (в/о) суспензию агарозы в TAE-буфере.

В качестве маркера молекулярных масс использовали "DNA Ladder 100", фирмы "Sigma". Результаты электрофореза учитывали в УФ-свете, с длиной волны 254 нм в трансиллюминаторе.

Результаты исследований и обсуждение.

Первые сообщения о птичьем гриппе в 2020 году были отмечены в Северо-Казахстанской области, где в период с 9 по 16 сентября в семи районах был отмечен падеж домашней птицы разных видов. Северо-Казахстанская область представляет собой территорию, через которую в весеннее время проходит значительный поток мигрирующих на север гусей и казарок [9,10] В целом в 2020 году на территории Казахстана падеж птицы из-за птичьего гриппа был зарегистрирован в 47 населенных пунктах 26-ти районов в пяти областях. Суммарное количество падежа на личных подворьях составило 12 926 птиц. Кроме того, зарегистрирован падеж 41 тысячи голов птиц на птицефабрике в СКО [11]. Проведенные лабораторные исследования выявили наличие высокопатогенного вируса птичьего гриппа. В селах и районах был наложен карантин и проведены противоэпидемиологические мероприятия.

Эпизоотическое обследование показало, что падеж начался с падежа дикой птицы, которая мигрирует с севера на юг. Через территорию Казахстана проходят Центрально-Азиатский и Восточно-Европейский миграционные пути, и массовый перелет представителей гусеобразных и других отрядов птиц приходится на период с июля по октябрь, что подтверждает наличие источника инфекции в популяциях диких птиц. Предположительно, инфицирование домашних птиц могло произойти при контакте с перелетными птицами на озерах, расположенных недалеко от населенных пунктов.

В 2020 году в одном из частных подворий на территории Алматинской области был отмечен падеж домашней птицы, с симптомами похожими на вирус птичьего гриппа. С целью типирования предполагаемого возбудителя вируса птичьего гриппа были отобраны биологические материалы от здоровых птиц и птиц с клиническим проявлением болезни, также были получены образцы патологического материала от павших птиц. 8 проб были проверены на наличие вируса птичьего гриппа подтипа H5 методом ПЦР.

Для выделения РНК из образцов использовали коммерческий набор для экстракции ДНК/РНК Uni-Medica (Китай). Чистоту РНК определяли при помощи микроспектрофотометра NanoDrop-2000. Норма для чистоты нуклеиновых кислот A260/280 составляет около 2. Чистота выделенных РНК показана на рисунке 1.

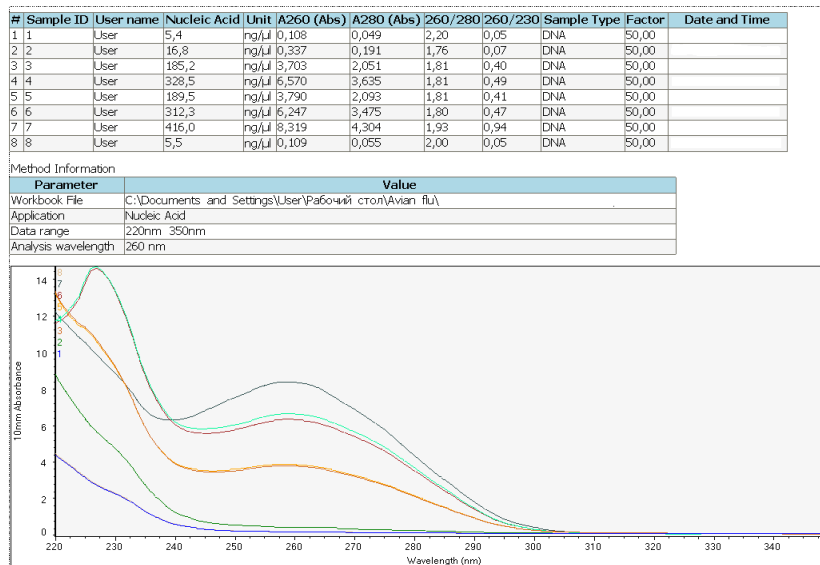


Рисунок 1 - Чистота и концентрация РНК

Результаты исследования показали, что при выделении концентрация РНК в образцах варьировала от 5,4 нг/мкл до 416,0 нг/мкл, чистота A260/280 от 1,80 до 2,20 (рис. 1). Как видно по рисунку 1, чистота выделенных образцов находилась в пределах нормы, концентрация РНК в образцах №1,2,8 значительно меньше по сравнению с остальными образцами, большая концентрация в образцах №3-7 говорит о достаточно высоком титре вируса.

Наработку ПЦР фрагментов проводили при помощи специфических пар праймеров XiH5-F GTACCACCATAGCAATGAGCAG, XiH5-R AGTCCAGACATCTAGGAATCCGT Xiao et al. (2019) [12]. Постановку реакции проводили на амплификаторе SimpliAmp Applied Biosystems. Параметры термоциклирования были следующими: 5 мин при 95 °С, 40 циклов при 95°С в течение 30 с, 54°С в течение 30 с и 72° С в течение 1 минуты, затем 72°С в течение 10 минут в конце.

В результате исследований ОТ-ПЦР в пробах был выявлен геном вируса гриппа птиц и идентифицирован подтип H5 (рис. 2)

Как видно из данных представленных на рисунке 2, в пробах № 3-7 наблюдается ПЦР продукт размером 210 п.н аналогичный ПЦР продукт обнаружен в исследованиях Xiao et al. (2019) и в положительных контролях, что говорит о наличии в образцах вируса гриппа подтипа H5. Пробы №1,2 (смывы от здоровой птицы) и проба №8 (илеоцекальные железы) показали отрицательный результат. Таким образом, результаты исследований показали, что вирус птичьего гриппа выделенный в 2020 году в частных подворьях содержит гемагглютинин H5.

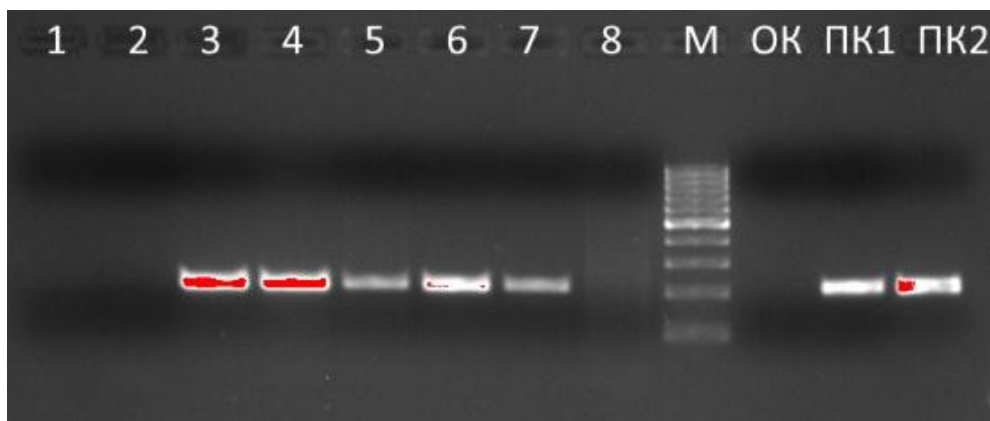


Рисунок 2 – Электрофоретический анализ ПЦР-продуктов на подтип Н5:
1-8 пробы, М – маркер молекулярных масс, ОК – отрицательный контроль, ПК1 – положительный контроль H5N6, ПК2- положительный контроль H5N1

Выводы.

В результате молекулярно-генетического исследования образцов полученных от птиц с частных подворий в Алматинской области, пробы показали положительный результат, наличие вируса гриппа подтипа Н5 было выявлено в клоакальных и трахеальных смывах от домашней птицы, а также в легких, селезенке и трахее от павшей птицы. Интенсивность окраса полученных ПЦР-продуктов говорит о достаточно высоком титре вируса. Однако, в илеоцекальных образцах вирус не обнаружен. Смывы от клинически здоровых птиц показали отрицательный результат. Стремительное распространение ВПГ среди птиц приводит к большим экономическим затратам, следовательно, незамедлительное и точное диагностирование болезни является неотъемлемой частью проведения эффективных противоэпизоотических мероприятий которое обеспечивает благополучие и здоровье животных и людей.

Благодарность.

«Авторы выражает благодарность Строчкову Виталию Михайловичу, старшему научному сотруднику лаборатории «Зеленая биотехнология и клеточная инженерия», Казахстанско-Японского инновационного центра, НАО «КазНАИУ», за значимые замечания и важнейшие советы при проведении исследований».

Список литературы

1. Аналитический обзор ситуации на рынке птицеводческой продукции на 17 ноября 2020 года 2020 [Электронный ресурс] (<http://ptica.kz/news/analiticheskij-obzor-situacii-na-rynke-pticevodcheskoj-produkcii-na-17-nojabrja-2020-goda>).
2. Бияшев К.Б., Ермагамбетова С.Е., Сарыбаева Д.А., Жолдасбекова А.Е., Булегенова М.Д. Распространенность возбудителей кишечных инфекций у сельскохозяйственных птиц в различных регионах Казахстана. Изденістер, нәтижелер – Исследование, результаты №3(87) ISSN 2304-3334 – С. 25.
3. Engelhardt, O.; Fodor, E. Functional association between viral and cellular transcription during influenza virus infection. *Rev. Med. Virol.* 2006, 16, 329–345, doi:10.1002/rmv.512.
4. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, et al New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003657.
5. Medina, R.A.; Garcia-Sastre, A. Influenza A viruses: New research developments. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011, 9, 590–603, doi:10.1038/nrmicro2613.
6. de Graaf, M.; Fouchier, R.A. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *EMBO J.* 2014, 33, 823–841, doi:10.1002/embj.201387442.,]
7. Fouchier, R.A.M., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G.F., Olsen, B. and Osterhaus, A.D.M.E., 2005. Characterization of a novel

influenza a virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 79, 2814-22.

8. Stallknecht E.D. Ecology and epidemiology of avian influenza viruses in wild bird populations: waterfowl, shorebirds, pelicans, cormorants, etc., Proc. 4th International Symp. on Avian Influenza, May 29-31, 1997, Athens, USA, 61-67 p.

9. J. Cuthbert, T. Aarvak, E. Boros, T. Eskelin, V. Fedorenko, R. Karvonen et al. // *Wildfowl*. — 2018. — No. 68. — P. 44-69.

10. Вилков В.С. Перспективные ключевые орнитологические территории Северо-Казакстанской области / В.С. Вилков, И. А. Зубань // Проблемы управления речными бассейнами при освоении Сибири и Арктики в контексте глобального изменения климата планеты в XXI веке: сб. докл. XIX Междунар. науч.-практ. конф. — 2017. — С. 41–45.

11. Птичий грипп в Казахстане: причины, компенсации и меры по нераспространению бря, 2020 [Электронный ресурс] strategy2050.kz: <https://strategy2050.kz/ru/news/ptichiy-gripp-v-kazakhstane-prichiny-kompensatsii-i-mery-po-nerasprostraneniyu/>

12. Xiao et al. *BMC Veterinary Research* (2019) 15:253 <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1985-7>

References

1. Analiticheskij obzor situacii na rynke pticevodcheskoj produkcii na 17 noyabrja 2020 goda 2020 [Elektronnyj resurs] (<http://ptica.kz/news/analiticheskij-obzor-situacii-na-rynke-pticevodcheskoj-produkcii-na-17-nojabrja-2020-goda>).

2. Biyashev K.B., Ermagambetova S.E., Sarybaeva D.A., ZHoldasbekova A.E., Bulegenova M.D. Rasprostranennost' vozбудitelej kishhechnyh infekcij u sel'skohozyajstvennyh ptic v razlichnyh regionah Kazahstana. *Izdenister, nәtizheler – Issledovanie, rezul'taty №3(87) ISSN 2304-3334 – S. 25.*

3. Engelhardt, O.; Fodor, E. Functional association between viral and cellular transcription during influenza virus infection. *Rev. Med. Virol.* 2006, 16, 329–345, doi:10.1002/rmv.512.

4. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, et al New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 2013;9(10):e1003657.

5. Medina, R.A.; Garcia-Sastre, A. Influenza A viruses: New research developments. *Nat. Rev. Microbiol.* 2011, 9, 590–603, doi:10.1038/nrmicro2613.

6. de Graaf, M.; Fouchier, R.A. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *EMBO J.* 2014, 33, 823–841, doi:10.1002/embj.201387442.,]

7. Fouchier, R.A.M., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G.F., Olsen, B. and Osterhaus, A.D.M.E., 2005. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 79, 2814-22.

8. Stallknecht E.D. Ecology and epidemiology of avian influenza viruses in wild bird populations: waterfowl, shorebirds, pelicans, cormorants, etc., Proc. 4th International Symp. on Avian Influenza, May 29-31, 1997, Athens, USA, 61-67 r.

9. J. Cuthbert, T. Aarvak, E. Boros, T. Eskelin, V. Fedorenko, R. Karvonen et al. // *Wildfowl*. — 2018. — No. 68. — P. 44-69.

10. Vilkov V.S. Perspektivnye klyuchevye ornitologicheskie territorii Severo-Kazahstanskoj oblasti / V.S. Vilkov, I. A. Zuban' // Problemy upravleniya rechnymi bassejnami pri osvoenii Sibiri i Arktiki v kontekste global'nogo izmeneniya klimata planety v XXI veke: сб. dokl. XIX Mezhdunar. науч.-практ. конф. — 2017. — С. 41–45.

11. Ptichij gripp v Kazahstane: prichiny, kompensacii i mery po nerасprostraneniю brya, 2020 [Elektronnyj resurs] strategy2050.kz: <https://strategy2050.kz/ru/news/ptichiy-gripp-v-kazakhstane-prichiny-kompensatsii-i-mery-po-nerasprostraneniyu/>

12. Xiao et al. *BMC Veterinary Research* (2019) 15:253 <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1985-7>

Ш.Д. Өрқара, Н.Т. Сандыбаев, К.К. Табынов*

*Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті,
(Алматы қ., Қазақстан), 507698@kaznaru.edu.kz*, nurlan.s@kaznaru.edu.kz;
kairat.tabynov@kaznaru.edu.kz*

КТ-ПТР ӘДІСІМЕН ҚҰС ТҰМАУЫ ВИРУСЫН ТИПТЕУ

Аңдатпа.

Жабайы және үй құстарының арасында құс тұмауының өршуі бүкіл әлемде жиі кездеседі. Соңғы 15 жыл ішінде құс тұмауының өршуі, атап айтқанда, 1996 жылы Оңтүстік-Шығыс Азияда пайда болған A/Goose/Guangdong/1/1996 сызығынан шыққан H5 вирустары Еуропа мен Азияда көбірек орын алды. 2005 жылдан 2020 жылға дейін әлемде ҚТВ H5 кем дегенде он жаһандық өршуі анықталды, бұл үй және жабайы құстардың жаппай қырылуына әкелді. Соңғы жылдары вирустық нуклеин қышқылдарын анықтаудың молекулалық әдістерін қолдану құс тұмауының вирусын анықтауға және гемагглютинин (НА) және нейраминидаза (НА) тип түрлерін анықтауда маңызды құралға айналды. Мұндай әдістердің қатарына КТ-ПТР жатады. Кері транскриптаза - полимеразды тізбекті реакция - арнайы ферментті – кері транскриптазаны қолдана отырып, РНҚ матрицасында ДНҚ көшірмесінің (кДНҚ) синтез реакциясы, және оны ревертаза деп те атайды. Содан кейін кДНҚ полимеразды тізбекті реакция (ПТР) арқылы амплификация жүргізіледі. Бұл мақалада ПТР әдісімен құс тұмауы вирусын типтеу нәтижелері көрсетілген. 2020 жылы Алматы облысы аумағындағы жеке аулалардың бірінде құс тұмауы вирусына ұқсас белгілері бар үй құсының өлімі тіркелді. Зертханалық зерттеулер нәтижесінде ОТ-ПТР әдісімен H5 типті құс тұмауы вирусы анықталды.

Кілт сөздер: вирус, құс тұмауы, H5, типтеу, гемагглютинин, тұмау типтері, үй құсы, КТ-ПТР.

Sh.D. Orkara, N.T. Sandybaev, K.K. Tabynov*

*¹ Kazakh National Agrarian Research University,
(Almaty s., Kazakhstan), 507698@kaznaru.edu.kz*, nurlan.s@kaznaru.edu.kz;
kairat.tabynov@kaznaru.edu.kz*

TYPIFICATION OF AVIAN INFLUENZA VIRUS BY RT-PCR

Abstract.

Outbreaks of avian influenza among wild and domestic birds are increasingly common worldwide. Over the past 15 years, outbreaks of avian influenza, in particular caused by H5 viruses originating from the A/Goose/Guangdong/1/1996 that originated in Southeast Asia in 1996, have increasingly occurred in Europe and Asia. In the period from 2005 to 2020, at least ten global outbreaks of AIV H5 were detected in the world, which led to the mass death of domestic and wild birds. In recent years, the use of molecular methods for the detection of viral nucleic acids has become an important tool for the detection of avian influenza virus and the identification of hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) subtypes. These methods include RT-PCR. Reverse transcriptase - polymerase chain reaction is a reaction of DNA copy synthesis (cDNA) on an RNA matrix using a special enzyme - reverse transcriptase, also called revertase. The cDNA is then amplified by polymerase chain reaction (PCR). This article presents the results of typing avian influenza virus by PCR. In 2020, in one of the private farmsteads on the territory of the Almaty region, a case of poultry was noted with symptoms similar to the avian

influenza virus. As a result of laboratory studies, the avian influenza virus of the H5 subtype was typed by RT-PCR.

Key words: virus, avian influenza, H5, typification, hemagglutinin, influenza subtypes, domestic poultry, RT-PCR.