

Глава 5

Процедуры взятия проб

Косвенные доказательства дают основания полагать, что дикие птицы могут играть роль в передаче и распространении вируса ВППГ H5N1. Однако несмотря на то, что в ходе реализации программ по надзору за циркуляцией вируса в Европе, Азии, Африке и Америке (2004–2007) пробы были отобраны у нескольких сотен тысяч диких, предположительно здоровых птиц, неоспоримых доказательств того, что дикие птицы могут служить резервуарами вируса ВППГ H5N1 и способны преодолевать большие расстояния, распространяя вирус, до сих пор нет. Вирус H5N1 изолировался преимущественно от больных, умирающих и павших птиц.

Поскольку вирус ВППГ H5N1 продолжает время от времени появляться на птицефермах, программы активного надзора за его циркуляцией приобретают особую важность для поиска ответов на вопросы о возможной роли диких птиц в качестве носителей вируса, механизмах его передачи и географическом распространении. К счастью, отбор проб для диагностики H5N1 у диких птиц предполагает применение довольно щадящих методов, освоить которые можно после обучения основным приемам и процедурам. Они относительно просты, и пробы можно отобрать буквально в течение нескольких минут, сведя отрицательные воздействия на птицу до минимума. Это означает, что активный надзор за циркуляцией заболевания можно проводить в рамках большинства исследований, предполагающих отлов и обработку птиц. В дополнение к этому, относительно простым и дешевым способом наладить отбор проб на птичий грипп является сбор свежего помета синантропных и диких видов, особенно в условиях, когда отлов диких птиц невозможен.

Правильный отбор образцов обеспечивает возможность достоверного выделения из проб и точной идентификации любых присутствующих в них возбудителей. В данной главе приводится краткое описание наиболее распространенных методов отбора проб, используемых для выявления ПГ H5N1 у свободноживущих диких птиц. Несмотря на то, что применение этих методов рассчитано на работу с живыми, свободноживущими и предположительно здоровыми птицами, следует иметь в виду, что использование средств индивидуальной защиты (СИЗ), соответствующих степени риска, рекомендуется в любом случае. Помните, что внешне здоровые птицы могут быть носителями заболевания без проявления клинических признаков инфекции H5N1. На каждом новом месте работы следует использовать новый комплект СИЗ, что позволит предотвратить распространение заболевания среди диких птиц, а также минимизировать риск его проникновения от диких к домашним птицам и наоборот. Необходимо четко соблюдать правила био-безопасности и не использовать одни и те же средства индивидуальной защиты многократно: при отборе проб от диких и домашних птиц, на разных местах работы в поле или на птицеводческих предприятиях.

В странах, где вспышки заболевания не были зафиксированы, минимальный

комплект средств индивидуальной защиты (СИЗ) может включать перчатки и маску. Необходимо также соблюдать правила гигиены по завершении работы. Однако в случае работы с больными и мертвыми птицами и при подозрении на вспышку заболевания необходимо применять полный комплект СИЗ (в том числе латексные или виниловые перчатки, маску, защитные очки и защитную спецодежду или медицинские халаты). Следует соблюдать специальный порядок обращения с птицами и отбора проб, установленный ФАО (2006). Если свободноживущие птицы, пойманные в процессе проведения исследований по изучению циркуляции заболевания, проявляют перечисленные клинические признаки какого-либо инфекционного заболевания (например, инфекции H5N1), следует немедленно остановить все работы с птицами и связаться со соответствующими государственными или ветеринарными структурами или службой по охране животных в этой стране.

Возможная клиника инфекции ВППГ H5N1 включает (но не ограничивается) следующими признаками: диарея; отрыжка; чихание; язвы, истечения изо рта, носовых отверстий, ушей, или анального отверстия; опухание или обесцвечивание тканей головы, в том числе конъюнктивы; поведенческие/неврологические аномалии (падение, наклонное положение головы, скрученное положение головы и шеи, припадки, круговые движения, паралич); перьевые аномалии у кур. Некоторые восприимчивые к заболеванию виды диких птиц также могут проявлять часть из этих симптомов, но их выраженность или характер проявления могут сильно варьироваться. Эти клинические признаки не являются специфичными для инфекции H5N1, но дают основания предполагать течение серьезной клинической болезни, требующей своевременного исследования и диагноза.

Методы отбора проб для диагностики болезни приводятся здесь с расчетом на то, что:

- все исследования будут проводиться соответствующим образом обученным персоналом;
- видовая принадлежность каждой птицы, у которой отбираются пробы, будет правильно определена обученным специалистом, а все сведения о ней (вид и по возможности пол и возраст) будут правильно задокументированы; в сомнительных случаях рекомендуется сфотографировать птицу (см. рекомендации по правильному фотографированию птиц в Приложении А);
- будут соблюдаться все меры предосторожности в отношении здоровья людей и био-безопасности (см. ФАО 2006);
- по правильному фотографированию птиц в Приложении А);
- получены соответствующие разрешения от уполномоченных местных, государственных и федеральных ветеринарных структур и службы охраны дикой природы;
- исследования в очагах заболевания должны проводиться совместно с уполномоченными государственными структурами, а где это необходимо, и с представителями ФАО и МЭБ.

ТРАХЕАЛЬНЫЕ И КЛОАКАЛЬНЫЕ МАЗКИ

Мазки, взятые из клоаки (анального отверстия) или трахеи можно использовать для выращивания вирусных культур или исследования методом полимеразной цепной реакции обратной транскрипции (РТ-ПЦР) на предмет наличия возбудителей многих вирусных заболеваний, включая вирусы ПГ. В то время как непатогенные вирусы ПГ размножаются в основном в кишечном тракте птиц, штаммы вирусов ВППГ H5N1 были выявлены как в клоакальных, так и в трахеальных/глоточных пробах. Исследование показало, что в отличие от других вирусов ПГ репликация вирусов подтипа ВППГ H5N1 происходит дольше и более эффективно именно в респираторном тракте (Sturm-Ramirez et al. 2004, Hulse-Post et al. 2005). Более того, после экспериментального заражения птиц именно в трахеальных пробах всегда отмечалась более высокая концентрация вируса по сравнению с клоакальными. Поэтому для исследования H5N1 у диких птиц лучше всего подходят клоакальные и трахеальные мазки.

Для взятия мазков необходимы аппликаторы славсановыми или вискозными наконечниками (Рис 5.1). Следует избегать использования аппликаторов с ватным наконечником или деревянным стержнем, т.к. их свойства могут помешать выявлению вируса генетическими методами или его развитию в культуре (из-за свойственной целлюлозе хлопка и дерева повышенной активности рибонуклеазы). Для очень мелких птиц можно использовать аппликаторы с проволочным стержнем. Для хранения и транспортировки проб понадобятся криопробирки, наполненные специальной средой для транспортировки вируса (СТВ). Необходимо выбрать криопробирки, а также этикетки к ним соответственно значениям предполагаемых температур

СПИСОК ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ ВЗЯТИЯ ТРАХЕАЛЬНЫХ И КЛОАКАЛЬНЫХ МАЗКОВ

1. Средства индивидуальной защиты (СИЗ)
2. Аппликаторы с вискозным или лавсановым наконечником
3. 2–2.5 мл криопробирки с откручивающимся колпачком
4. Вирусная транспортная среда (ВТС)
5. Ножницы/кусачки
6. 70%-ный спиртовой раствор
7. Термоконтейнер и лед и/или жидкий азот для хранения проб
8. Наклейки для криопробирок и карандаши или несмываемые маркеры для криопробирок
9. Формы для внесения данных
10. Налобные фонари или фонари карандашного типа



хранения. Некоторые из них сертифицированы только для использования в сухом льду и не подходят для хранения проб в жидким азоте.

СТВ можно приготовить самостоятельно в лаборатории (см. инструкции на сайте ВОЗ⁷) или приобрести у коммерческих поставщиков (например, TBD Universal Viral Transport Media or Cellmatics Viral Transport Pack⁸). Перед использованием в полевых условиях СТВ следует хранить при низких температурах (<4 °C).

Существуют методы экспресс-диагностики вируса типа А (в случае с ПГ это может быть любая из 144 возможных комбинаций подтипов) с использованием трахеальных мазков. Однако нужно отметить, что они обладают достаточно низкой чувствительностью и требуют высоких титров вируса, чтобы получить позитивный результат. Достоверность негативных результатов таких тестов невелика, поскольку инфекция может иметь место, однако чувствительность метода не позволяет её выявить. Однако позитивный результат экспресс-тестирования в сочетании с клинической картиной похожей на инфекцию H5N1 ПГ должен служить основанием для немедленного уведомления соответствующих органов, хотя точный диагноз H5N1 может быть поставлен только после лабораторного подтверждения.

⁷ http://www.who.int/csr/resources/publications/surveillance/WHO_CDS_EPR_ARO_2006_1/en/index.html

⁸ <http://www.bd.com/support/locations.asp>

Способы взятия мазков

При взятия трахеальных и клоакальных мазков применяется сходное оборудование и подходы, а отличия связаны только с локализацией самого мазка. Трахеальные мазки невозможно взять у маленьких птиц (воробьиные) с узким трахеальным проходом. В таких случаях следует отбирать ротоглоточные мазки. Размер аппликатора должен соответствовать размерам птицы.

- Открывайте упаковку с аппликаторами со стороны стержней и не касайтесь их наконечников ни до, ни после взятия пробы;
- Трахеальные мазки следует брать из дыхательного прохода (трахеи) в задней части ротовой полости птицы. Чтобы добиться его раскрытия можно слегка вытянуть язык птицы вперед, что сделает трахею в задней части языка более доступной. Подождите, пока птица не сделает вздох, и хрящ, защищающий трахею, не откроется. Введите в нее наконечник аппликатора и осторожно проведите им по стенкам и задней части трахеи (Рисунок 5.2);
- Ротоглоточные мазки берутся путем мягкого вращения кончика аппликатора по внутренней поверхности ротовой полости птицы и за языком (Рис 5.3);
- Клоакальные мазки берутся путем введения всего наконечника аппликатора внутрь клоаки и поворачивания его там двумя или четырьмя круговыми движениями. При этом необходимо аккуратно придерживать поверхность слизистой (Рис 5.4). Прежде чем поместить мазок в криопробирку, осторожно стряхните с наконечника аппликатора крупные частицы помета;
- Осторожно выньте аппликатор из клоаки, откройте криопробирку и поместите мазок в СТВ, опустив аппликатор на $\frac{3}{4}$ глубины пробирки. Не

РИСУНОК 5.2
Место взятия трахеального мазка



Место взятия трахеального мазка. Стрелка указывает в трахею

ССЫЛКА: ТАЕЖ МУНДКУР

РИСУНОК 5.3
Правильная процедура взятия ротоглоточного мазка



Ссылка: Дж. Кристиан Франсон

РИСУНОК 5.4
Правильная процедура взятия клоакального мазка



Ссылка: Тэйж Мундкур

переполняйте пробирки транспортной средой, так как их содержимое может расширяться под воздействием холода и вытечь в процессе замораживания.;

- Отрежьте или отломите стержень таким образом, чтобы кончик аппликатора остался в СТВ, и закройте пробирку (Рис 5.5). Если используются аппликаторы с проволочным стержнем, то его можно откусить кусачками для проволоки;
- Если для обрезания стержней аппликаторов используются ножницы или кусачки, их лезвия необходимо дезинфицировать

РИСУНОК 5.5

Правильное помещение образца мазка в вирусную транспортную среду



ССЫЛКА: ДЖ. КРИСТИАН ФРАНСОН

РИСУНОК 5.6

Подписанная криопробирка с указанием даты, вида, типа пробы и идентификационным номером, уникальным для каждой исследованной птицы и связанным с базой данных, содержащей все сведения об этой птице



ССЫЛКА: СКОТТ НЬЮМАН

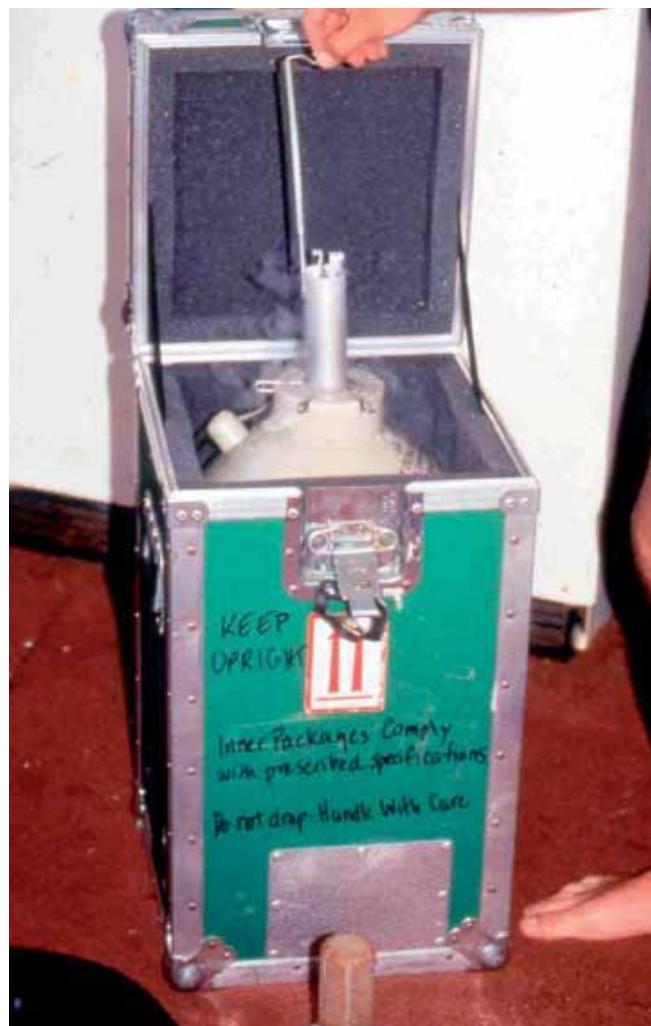
70%-ным спиртовым раствором после каждого применения;

- Каждую пробирку с пробой нужно подписывать, указывая дату, вид птицы, тип пробы (трахеальная или клоакальная) и идентификационный номер, который нужно присваивать каждой исследованной особи. Эти уникальные номера нужно включить в структуру базы данных, в которой будут храниться все сведения об обработанных птицах (Рис 5.6). Пробирки следует подписывать маркером, устойчивым к воздействию влаги, спирта и низких температур при хранении в жидким азоте (Рис 5.7) или холодильнике (до -70 °C).

Необходимо уточнить у поставщиков СТВ правильные способы её хранения. При использовании СТВ, требующей охлаждения или замораживания, следует хранить пробы либо в герметичных пластиковых пакетах на льду при 4 °C или ниже, либо в жидком азоте. Важно обеспечить постоянство низких температур при хранении и транспортировке проб. В противном случае они окажутся непригодными для

РИСУНОК 5.7

Контейнер с жидким азотом, используемый для замораживания и хранения образцов при работе в удаленных районах



ССЫЛКА: СКОТТ НЬЮМАН

дальнейшей диагностики. В продаже имеются препараты, которые инактивируют вирусы и сохраняют стабильность при комнатной температуре. Их можно использовать как запасной вариант для полевой работы в отдаленных районах, где невозможно обеспечить хранение транспортной среды в условиях низких температур. Если пробы невозможно доставить до лаборатории в течение 24–48 часов, и их нужно хранить в течение более длительного периода, следует воспользоваться жидким азотом или морозильной камерой, обеспечивающей температуру от -70 °C и ниже.

ОТБОР ОБРАЗЦОВ КРОВИ

Основная задача серологического анализа образцов крови состоит в том, чтобы обнаружить в ней антитела, свидетельствующие о перенесенном птицей заболевании, в отличие от обнаружения вирусных антигенов или специфических генетических последовательностей. В зависимости от размера птицы можно применять разные способы забора крови. У мелких птиц (например, воробьиных и мелких куликов) кровь следует брать из яремной вены (правая сторона шеи; Рис 5.8), используя инсулиновый шприц объемом 0,3–0,5 мл и иглу для подкожных инъекций длиной 0,33 мм (размер 22–30) в зависимости от размера птицы. У более крупных птиц (например, уток, лысух, чаек и цапель) кровь можно брать из яремной вены или медиальной метатарзальной (ножной) вены (Рис 5.9), используя шприц объемом 1–2 мл и иглу для подкожных инъекций (размер 23–27). У некоторых крупных птиц кровь можно брать из плечевой вены (на крыле).

Обычно достаточно отобрать 0,3–0,6 кубических сантиметра крови на каждые 100 грамм живого веса птицы (общий объем взятой крови не должен превышать одного процента живого веса), хотя стоит стремиться к тому, чтобы взять ровно столько крови, сколько будет достаточно для проведения теста.

РИСУНОК 5.8

Процедура взятия образцов крови из яремной вены



ССЫЛКА: ТАЕЖ МУНДКУР

РИСУНОК 5.9

Процедура взятия образцов крови из медиальной метатарзальной вены



Ссылка: ДИАНН ПРОССЕР

Оптимальное место венепункции (место, где подкожная игла прокалывает вену) зависит от вида птицы. При отсутствии опыта вначале легче отбирать кровь у крупных птиц с более толстыми венами, однако со временем, по мере его накопления, работать с мелкими видами станет так же просто, как и с крупными. После того как необходимое количество крови взято, приложите к месту венепункции кусочек марли и вытащите иглу. Марлевый тампон следует держать прижатым к месту укола в течение 30 секунд. Это предотвратит появление у птицы болезненной гематомы (сгустка крови) под кожей, наличие которой может отрицательно сказаться на движениях крыла или ноги.

Чтобы снизить риск гемолиза, рекомендуется снять иголку со шприца (если это позволяет его конструкция) и осторожно выдавить кровь на внутреннюю стенку пробирки.

- При отборе крови из яремной или плечевой вены смочите место венепункции спиртом, а затем пальцами раздвиньте перья;
- Отбор проб из плечевой или медиальной метатарзальной вены лучше всего проводить путем их блокирования (надавливая на вену) проксимально по отношению к месту венепункции, чтобы на время остановить поток крови и сделать вену более заметной.;
- Чтобы было удобнее взять кровь из яремной вены, лучше всего надавить на нее с правой стороны шеи на уровне ключицы;
- Перед тем как ввести иголку в вену птицы, потяните поршень назад для образования вакуума внутри шприца, а затем нажмите на поршень до конца, чтобы в шприце не осталось воздуха;
- Осторожно введите иглу для подкожных инъекций под кожу и в вену

СПИСОК ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ ВЗЯТИЯ ОБРАЗЦОВ КРОВИ

1. Средства индивидуальной защиты (СИЗ)
2. Иглы для подкожных инъекций или иглы-бабочки различного размера (22–30)
3. Шприцы разных размеров (1–12 см³)
4. Пробирки-сепараторы для сыворотки и плазмы
5. Переносная центрифуга (если таковая имеется)
6. 70%-ный спиртовой раствор и хлопковая марля
7. Криопробирки
8. Стерильные пипетки
9. Несмываемый маркер и наклейки для криопробирок и пробирок-сепараторов
10. Холодильник, лед и/или жидкий азот для хранения криопробирок
11. Предварительно разработанные формы для внесения данных
12. Контейнер для острых инструментов

так, чтобы отверстие было направлено вверх и смотрело в вену, а не упиралось в её стенку. Для отбора крови из яремной вены иглу можно предварительно слегка изогнуть, чтобы облегчить её введение.;

- Как только вы убедитесь в том, что игла вошла внутрь вены, осторожно потяните поршень на себя, чтобы набрать кровь в шприц;
- Любая птица, вне зависимости от её размеров, может страдать от стресса, холода или других факторов, которые могут вызвать сужение кровеносных сосудов и затруднять кровоток. В случаях, когда кровь течет плохо, взятию крови поможет аккуратное массирование места венепункции пальцами;
- После того как отбор крови завершен, необходимо накрыть место венепункции марлевым тампоном и придавить его пальцами до полной остановки кровотечения, для чего обычно достаточно 30–60 секунд.
- Поместите использованные инструменты и другие отходы в предназначенные для мусора контейнеры;
- Немедленно выпустите кровь из шприца в пробирку-сепаратор **сыворотки** (красный верх) или **плазмы** (зеленый верх) для приготовления образцов для дальнейшего центрифугирования.
- **Пробирки для плазмы** следует немедленно охладить или держать в холодной ванночке, перед тем как они попадут в центрифугу;
- **Пробирки для сыворотки** необходимо оставить при комнатной температуре (22–25 °C), для того чтобы кровь свернулась перед охлаждением. Процесс свертывания можно ускорить путем легкого потряхивания пробирок;
- После сбора образцов прокрутите образцы крови в центрифуге, чтобы разделить фракции для дальнейших лабораторных анализов. Образцы **сыворотки** можно выделить путем охлаждения проб в течение нескольких часов и осторожных круговых движений с помощью стерильной круглой палочки для отделения сгустка от пробирки;

- После центрифугирования перенесите образцы **сыворотки и плазмы** в криопробирки (желательно с откручивающейся крышкой и резиновым уплотнительным кольцом) спомощью стерильной пипетки. Если пипеток в вашем распоряжении нет, то образцы можно осторожно перелить в криопробирки;
- Подпишите каждую пробирку с пробой, указав дату, вид, тип пробы (плазма или сыворотка) и индивидуальный идентификационный номер. Выбор пробирок-сепараторов для сыворотки и/или плазмы зависит от того, как и какие анализы будут проводиться в лаборатории. Эти детали нужно согласовать с лабораторией до начала полевых работ. При хранении и транспортировке криопробирки с отделенными фракциями сыворотки или плазмы можно поместить в герметично застегивающиеся пакеты. Пробы можно хранить на льду при температуре 4 °C при условии, что их доставят в лабораторию в течение ближайших 24–48 часов. В противном случае их следует хранить на сухом льду, в жидким азоте или в низкотемпературном морозильнике (-70 °C).

Если в полевых условиях у вас нет возможности пользоваться электрической центрифугой, в качестве альтернативы можно использовать центрифугу с питанием от батарей или ручную центрифугу. Нецентрифицированные образцы крови можно также отправить в лабораторию при условии, что они будут доставлены туда в течение 24–48 часов и будут все это время храниться при температуре 4 °C. Перевозите пробы на кусках льда, помещая пробирки в герметично закрывающиеся пакеты и обматывая их матерчатым полотенцем до того, как положить их в термо контейнер. Пробирки с неотделенной плазмой или сывороткой нельзя замораживать или давать им возможность вступать в непосредственный контакт со льдом, т.к. это может повредить эритроциты и вызвать гемолиз, что отрицательно скажется на результатах анализа.

ВЗЯТИЕ ОБРАЗЦОВ ФЕКАЛИЙ

Сбор свежего помета синантропных и диких видов птиц для выявления вирусов птичьего гриппа может оказаться относительно простым и недорогим способом обеспечить большое количество проб, особенно в случаях, когда отлов птиц невозможен. Пробы помета в некоторых странах, как например, США, также называют “пробами окружающей среды” (англ. *environmental samples*).

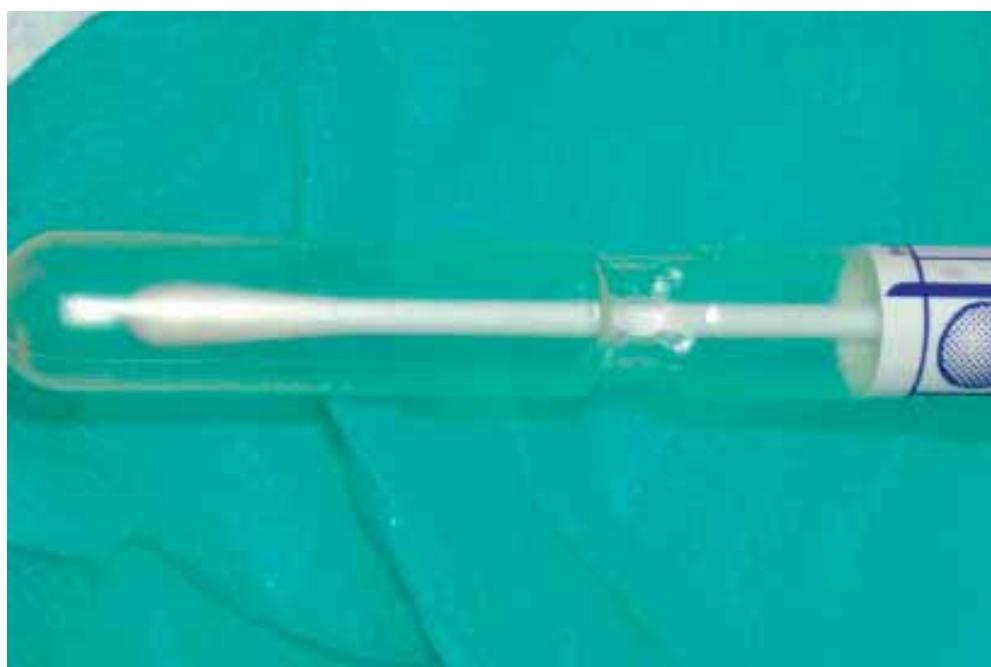
При сборе проб помета от одной особи или стаи птиц необходимо придерживаться следующих правил:

- Наблюдайте за птицей (птицами) и постарайтесь как можно более точно заметить, где она (они) находится (скапливаются) и испражняются. Птицы могут отдыхать на земле, на территории птицеферм, на полях или поблизости от водоно-болотных угодий, на проводах, столбах, на крышах или различных постройках;
- Определите видовую принадлежность птиц, от которых вы планируете взять пробы. Удостоверьтесь в том, что они держатся моновидовой стаей. Если же стая смешанная, должна существовать возможность отличить помет разных видов. Например, в смешанных стаях гусей разных видов это сделать практически невозможно. В тоже время в смешанной стае, состоящей из одного вида гусей и одного вида чаек, проблем не должно возникнуть, поскольку их фекалии можно легко отличить друг от друга по размерам, цвету и составу;

- Быстрое приближение к группе отдыхающих птиц обычно заставляет их убегать или улетать и, как правило, испражняться.
- Страйтесь свести к минимуму вероятность более чем однократного отбора проб от одной и той же особи. Достичь этого можно, ограничивая количество проб общей численностью птиц в стае. С этой же целью пробы помета следует собирать на всей территории, где наблюдалась моновидовая стая;
- Собирайте пробы только свежего помета, который в идеальном случае должен быть влажным. Не стоит собирать сухие и рыхлые фекалии, оставленные птицами давно. Такие пробы уже не представляют ценности для диагностики. Высокие температуры могут инактивировать вирусы в течение нескольких часов;
- Отбирайте пробы помета, используя стерильный аппликатор (Рис 5.10) и помещайте их в предварительно подписанную пробирку с транспортной средой. Если мазок планируется поместить в вирусную транспортную среду, то его нужно отбирать, используя аппликаторы с вискозным или лавсановым наконечником;
- Не идите на соблазн затолкать помет внутрь пробирки. Лучше перекатывать кончик аппликатора по фекалиям, а затем стряхнуть лишние кусочки помета;
- Если такая возможность существует, пострайтесь брать пробы в тени (т. к. прямые лучи солнца могут снизить жизнеспособность вируса);
- Создание перечня фотографий помета различных видов птиц может оказаться полезным для улучшения качества работы по сбору проб. При фотографировании помета следует позаботиться о том, чтобы можно было определить масштаб снимка.

РИСУНОК 5.10

Стерильный аппликатор, используемый для взятия проб помета



Ссылка: скотт ньюман

СПИСОК ОБОРУДОВАНИЯ ДЛЯ ВЗЯТИЯ ПРОБ ФЕКАЛИЙ

1. Средства индивидуальной защиты (СИЗ)
2. Стерильные аппликаторы с вискоznыми и лавсановыми наконечниками
3. Предварительно маркованные криопробирки с транспортной средой
4. Несмываемый маркер и наклейки для криопробирок
5. Холодильник, лед и/или жидкий азот для хранения криопробирок
6. Предварительно разработанные формы для внесения данных

ССЫЛКИ И ИСТОЧНИКИ ИНФОРМАЦИИ

European Commission, DG SANCO. 2006. Guidelines on the implementation of survey programmes for avian influenza in poultry and wild birds to be carried out in the Member States in 2007 (also available on http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/avian/surveillance4_en.pdf).

FAO. 2006. *Wild Bird HPAI Surveillance: Sample collection from healthy, sick and dead birds*, by K. Rose, S. Newman, M. Uhrt & J. Lubroth. FAO Animal Production and Health Manual, No 4. Rome.

Hulse-Post, D.J., Sturm-Ramirez, K.M., Humberd, J., Seiler, P., Govorkova, E.A., Krauss, S., Scholtissek, C., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T.D., Long, H.T., Naipospos, T.S., Chen, H., Ellis, T.M., Guan, Y., Peiris, J.S. & Webster, R.G. 2005. Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 102: 10682-10687.

Sturm-Ramirez, K.M., Ellis, T., Bousfield, B., Bissett, L., Dyrtting, K., Rehg, J.E., Poon, L., Guan, Y., Pieris, M. & Webster, R.G. 2004. Reemerging H5N1 influenza viruses in Hong Kong in 2002 are highly pathogenic to ducks. *Journal of Virology*, 78: 4892-4901.