한국가축위생학회지 제32권 제2호(2009)
Korean J Vet Serv 32(2) : 103~109 (2009)

비구조 단백질 유전자 primer를 사용한 RT-PCR에 의한 인플루엔자 A형 바이러스의 검출

문형선 · 배윤영 · 김길동 · 강정무 · 한태욱*
강원대학교 수의학부(대학)

(접수 2009. 6. 3, 게재승인 2009. 6. 23)

Detection of influenza A viruses by RT-PCR with single primer of nonstructural gene

Hyeong-Sun Moon, Yoon-Yeong Bae, Ji Dong Jin, Zheng Wu Kang, Tae-Wook Hahn*

School of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

(Received 3 June 2009, accepted in revised from 23 June 2009)

Abstract

Influeza type A virus have been worldwide problematic in animals as well as in humans. In this study, the use of reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was described for detecting influenza virus type A. The primer of RT-PCR was designed from an nonstructural (NS) gene of Influenza A virus. By RT-PCR, a product with the size of 189 bp was detected only when influenza virus type A was used as template. No products could be detected with Influenza virus type B as well as other respiratory pathogens. The detection limit of the RT-PCR was up to $10^{0.3}TCID_{50}$ which is comparable to the sensitivity of cell culture method. The RT-PCR could detect the influenza A virus from nasal turbinates of the ferrets infected with influenza virus type A not type B.

Key words : Influenza A viruses, RT-PCR, NS gene

서 론

*Orthomyxoviridae*과에 속하는 인플루엔자 바이러스(influenza virus)는 독감을 일으키는 원인체로서(Hay 등, 1991; Mäkelä 등, 1998; Nicholson 등, 1997), negative, sense single-stranded RNA viruses에 속하며 바이러스 유전자가 7~8개의 분절로 이루어져 있는 특징을 지니고 있다(Lamb과 Krug, 2001). 인플루엔자 바이러스는 nucleoprotein (NP)과 matrix (M) protein 항원의 차이에 의해 A, B, C의 3가지 혈청형(serotype)으로 구분된다(Murphy와 Webster, 1996; Shu 등, 1994). 이 세 가지 혈청형 중 인플루엔자 C형 바이러스(influenza C viruses)는 사람에 국한되어 감염이 일어나고, 임상적으로도 매우 가벼운 호흡기 증상만을 일으키며, A, B 형과는 달리 neuraminidase가 없는 것이 특징이다(Lamb과 Krug, 2001; Poddar, 2002; Wright와 Webster, 2001). 인플루엔자 B형 바이러스(influenza B virus) 또한 사람에서만 감염되어 발병을 일으키나 다른 동물에서는 별다른 문제가 되지 않는다. B형과 C형 인플루엔자 바이러스는 인플루엔자 A형과 같이 여러 혈청아형(subtype)으로 분류되지 않는다(Bao-Lan 등, 1983; Brammer 등, 1997).

*Corresponding author: Tae-Wook Hahn, Tel. +82-33-250-8671, Fax. +82-33-244-2367, E-mail. twhahn@kangwon.ac.kr

인플루엔자 A형 바이러스(influenza A viruses)는 사람을 비롯한 다양한 포유류와 조류에 감염된다(Ito 등, 1998; Rota 등, 1989). 인플루엔자 A형 바이러스는 15개의 hemagglutinin (H)과 9개의 neuraminidase (N)을 기준으로 여러 혈청아형으로 분류된다(Röhm 등, 1996; Stalknecht와 Shane, 1988). 인플루엔자 A형 바이러스의 사람과 동물간의 전파는 역학적인 측면에서 볼 때, 조류, 돼지, 사람의 3개 숙주영역이 관련되어 있었다. 조류 인플루엔자 바이러스(avian influenza virus)가 돼지로 감염되고, 사람 인플루엔자 바이러스 또한 돼지로 감염된다. 돼지는 이 두 가지 형태의 바이러스가 공존하여 새로운 인플루엔자 바이러스를 만들어 사람 또는 조류에게 전파시키는 절구통(mixing vessel) 역할을 하는 중간숙주의 역할을 하였다. 그러나 이러한 역학적 이론은 1998년 홍콩에서 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스가 조류에서 사람으로 직접 전파 감염되어 사망까지 나타나는 사례가 발표됨에 따라(Subbarao 등, 1998), 조류 인플루엔자바이러스는 전세계적으로 위협적인 인수공통전염병의 병원체로 주목을 받고 있으며 국내에서도 조류 인플루엔자의 발생으로 인해 양계 산업이 치명적인 경제적 손실이 발생되었다(Seo와 Kim, 2004).

조류 인플루엔자 바이러스를 포함한 인플루엔자 A형 바이러스를 예방하기 위해서는 산업 동물 측면에서는 차단 방역이 가장 중요하지만 백신 접종 등을 통해 임상증상을 완화시키거나 또는 발생을 최소화 시킬 수 있다. 사람에 있어서는 감염 후 임상증상을 완화시키기 위해 항바이러스 제제를 사용하고 있다(Hayden 등, 1999). 이러한 예방적 방법에 앞서 무엇보다 신속하고 정확한 인플루엔자 A형 바이러스 검출법이 필요하다(Cheng 등, 2004). 가장 보편적으로 사용하는 인플루엔자 바이러스 검출방법은 세포배양법과 혈구응집반응, 혈구응집억제반응 등이 있으며, 항원의 특성을 이용한 면역염색 방법을 사용하기도 한다(Ogilvie, 2001; Storch, 2003; Uyeki, 2003). 그러나, 이러한 전통적인 방법들은 오랜 시간이 소요됨과 동시에 정확도 면에서 몇 가지 문제가 제기되고 있다(Landry와 Ferguson, 2003; Ruest 등, 2003). 따라서, 보다 빠르고 정확하게 검출하기 위한 방법으로서 microarray(Kessler 등, 2004)와 RT-PCR과 같이 염기서열에 기반을 둔 방법들이 사용되기 시작하여 최근에는 RT-PCR을 많이 사용하고 있다. 인플루엔자 A형 바이러스를 검출하기 위한 RT-PCR은 이미 많은 연구가 이루어져 있으나 대부분의 RT-PCR의 경우 인플루엔자 A형 바이러스의 H 유전자를 증폭하고 증폭된 염기서열을 분석하여 혈청아형을 결정하는데 초점을 두고 있다(Phipps 등, 2004; Yamada 등, 2004; Zhu 등, 2005). 따라서 이러한 목적의 RT-PCR은 여러 쌍의 primer를 사용하는 multiplex-PCR의 형태로 이루어져 있고 간혹 인플루엔자 A형 바이러스 전부를 검출하는데 제한적일 수가 있다. 국내의 경우 사람의 인플루엔자, 조류 인플루엔자 및 돼지 인플루엔자 발생으로 복잡한 양상을 나타내고 있다. 특히 조류 인플루엔자의 경우 고병원성과 저병원성 인플루엔자의 발생이 모두 나타나고 있고, 특히 임상증상이 유사한 뉴캣슬병(Newcastle disease)이 상재하고 있기 때문에 더욱 신속 정확한 감별진단 방법이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 다양한 숙주에 감염되는 인플루엔자 A형 바이러스를 신속하게 검출할 수 있는 RT-PCR을 확립하여 하고자 하였다.

재료 및 방법

바이러스

본 연구에서 사용된 인플루엔자 A형 바이러스 중 A/Wyoming/3/'03(H3N2)과 A/Newcaledonia/20/'99 (H1N1)은 국립보건원에서 분양을 받았고, 2주의 인플루엔자 A형 백신주 A/X-31과 A/A-101은 (주) CJ 종합연구소에서 분양을 받았으며, 닭에서 분리된 저병원성 조류 인플루엔자 바이러스 A/H9N2는 국립수의과학검역원에서 분양을 받았다. 인플루엔자 B형 바이러스인 B/Beijing/243/'97, B/Sanghai/301/'02과 B/Hongkong/330/'01은 국립보건원에서 분양받아 사용하였다. 조류에서 분리되는 Newcastle disease virus (NDV)와 Infectious bursal disease virus (IBDV)는 각각 국립수의과학검역원에서 분양을 받았다. 기타 감별진단을 위해 3종의 *Mycoplasma*균주, *Mycoplasma gallisepticum, M. synoviae, M. anatis*를 사용하였다.

RNA 준비

본 연구에서 사용한 인플루엔자 바이러스는 9~11일령의 SPF (specific-pathogen-free)계란의 요막강내에 접종하여 증식 시킨 후 요막액을 채취함으로써 증식된 바이러스를 얻었다. 또한, 바이러스를 포함한 요막액을 원심분리한 후 상층액을 채취하여 Rnaid-kit(Q-BIO-

gene)를 사용하여 RNA를 순수 분리하였다.

Primer 제작

실험에 사용한 primer쌍은 기존의 논문에서 발표된 것과 같이 인플루엔자 A형 바이러스의 NS 유전자의 conserved region의 염기서열의 일부를 다음과 같이 선발하였다; forward primer (Pc DNA), 5′-AAGGGCTTT-CACCGAAGAGG-3′(nt 467-486) reverse primer (REV), 5′-CCCATTCTCATTACTGCTTC-3′(nt 637-656) (Zhu 등, 2005). Primer는 Bioneer(주)에 의뢰하여 합성하였다.

cDNA 합성

2단계의 reverse transcription (RT)의 과정을 통해 single stranded cDNA를 얻어내었다. 우선, forward (PcDNA) primers 50pmol과 TNE (10mM Tris-Cl, 300mM NaCl, 1mM EDTA, pH 8.0)이 포함된 DEPC treated water에 추출된 RNA 4μl를 넣어 최종적으로 10μl가 되게 하였다. 이 혼합물은 PC708 programmable thermal controller (ASTEC)을 이용하여 reverse transcription (RT) 반응을 실시하였으며, 첫 단계는 denaturation과 prehybridization을 위한 단계로 95℃, 3분간 가열하고 50℃, 25분간 처리하였다.

다음 2번째 단계로는 앞서의 처리된 혼합물에 5X first strand buffer (50mM Tris-Cl, pH8.3, 75mM KCl, 3mM $MgCl_2$, Invitrogen)를 첨가한 후, 10mM DDT (Invitrogen), 200U reverse transcriptase (Superscript™-II, Invitrogen), 20U ribonuclease inhibitor, 1.5mM dNTPs (Invitrogen)를 첨가하고 마지막으로 DEPC treated water를 넣어 최종적으로 40μl의 용량으로 맞춰주었다. 새로운 혼합물은 42℃, 60분간 처리하고, 이어서 92℃, 5분간 처리하여 최종적으로 cDNA를 얻어내었으며, 얻어낸 cDNA는 −70℃에서 저장하였다.

Polymerase chain reaction (PCR)

PCR 역시 PC708 programmable thermal controller를 이용하였다. 우선, 얻어진 cDNA 중 10μl를 10X PCR buffer (20mM Tris-Cl, pH8.4, 50mM KCl, 1.5mM $MgCl_2$, Go Taq)에 첨가한 뒤, 50pmol primer pair (Bioneer), 2.5U *Taq* DNA polymerase (Go Taq), 0.2mM dNTPs (Invitrogen)와 최종적으로 DEPC treated water를 이용하여 최종 용량 100μl의 혼합물을 만들었다.

증폭은 94℃, 5분간의 predenaturation과정을 거친 후 94℃ 90초, 50℃ 2분간, 72℃ 1분간 처리한 후 총 35번의 반복과정을 거쳐 증폭시키고 마지막으로 72℃에서 5분간 반응 시켰다.

전기영동은 1.5% agarose gel (immersed in 0.5×TBE buffer)를 이용하여 100V 50분간 실시하고, 0.5μg/ml ethidium bromide를 이용하여 염색한 후 증폭산물을 확인하였다.

Tissue culture infectious dose 측정

실험에 사용한 인플루엔자 A형 바이러스의 tissue culture infectious dose 50% ($TCID_{50}$)의 측정은 이전에 보고된 방법을 사용하였다(Claas 등, 1992). 우선 인플루엔자 A형 바이러스 샘플을 10진 희석하여 MDCK cell에 접종하여 증식시키고, 4일 후에 각각의 샘플을 접종한 MDCK cell에서 세포변성효과(cytopathic effect, CPE)를 확인함으로써 바이러스 역가를 $TCID_{50}$로 구하였다. 이 실험을 통하여 얻은 바이러스 역가는 본 연구에서 실시한 RT-PCR과 비교함으로써, 간접적으로 RT-PCR의 민감도를 평가해 보았다.

결 과

RT-PCR

인플루엔자 A형 바이러스의 NS유전자에서 디자인된 primer를 사용한 RT-PCR이 인플루엔자 A형 바이러스를 정확히 검출할 수 있는지 확인해 보기 위한 실험을 실시하였다. 실험에 사용한 바이러스는 인플루엔자 A형 바이러스 5주를 사용하였다. 전기영동 결과, 예상크기인 189bp의 증폭산물이 5주 모두에서 검출되었다(Fig. 1).

Specificity(특이도)

인플루엔자 A형 바이러스의 NS 유전자의 conserved region을 증폭할 수 있는 RT-PCR이 잘못된 양성결과가 나오는지 확인해 보기 위하여 특이도 실험을 실시하였다. 실험에 사용한 바이러스는 인플루엔자 B형 바이러스 3주, NDV 1주, Infectious bursal disease virus (IBDV) 1주, 3종의 Mycoplasma 균주를 사용하였다. 실험 결과를 통해 확인할 수 있는 것은 NS 유전자의 conserved region을 증폭한 RT-PCR은 인플루엔자 A

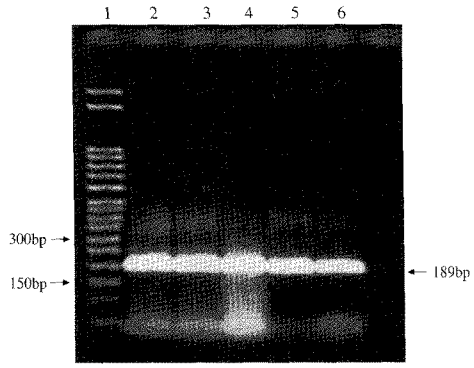

Fig. 1. RT-PCR of Influenza viruses type A using single primer pair PcDNA and REV. Lanes 1, DNA ladder; 2, A/X-31; 3, A/A-101; 4, A/H9N2; 5, A/Wyoming/3/'03(H3N2); 5, A/Newcaledonia/20/'99(H1N1). A PCR product with expected size of 189 bp was shown in all influenza viruses type A.

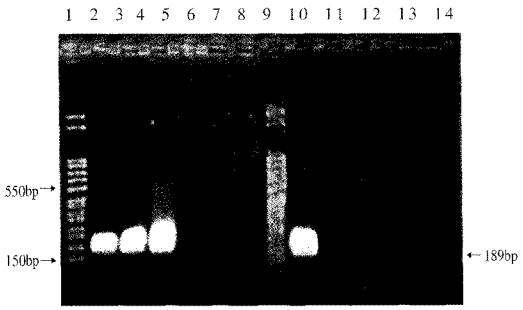

Fig. 2. RT-PCR of Influenza A and B viruses and other pathogens using single primer pair PcDNA and REV. Lanes 1 and 8, DNA ladder; 2 & 9, A/Wyoming/3/'03(H3N2); 3, A/H9N2; 4, A/Newcaledonia/20/'99(H1N1); 5, B/Beijing/243/'97, 6, B/Sanghai/301/'02; 7, B/Hongkong/330/'01; 10, *Mycoplasma gallisepticum*; 11, *M. synoviae*; 12, *M. anatis*; 13: Newcastle disease virus; 14, Infectious bursal disease virus.

형 바이러스를 제외한 다른 병원체에서는 어떠한 증폭산물도 검출되지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

Sensitivity(민감도)

인플루엔자 A형 바이러스의 NS 유전자의 conserved region을 증폭할 수 있는 RT-PCR이 인플루엔자 바이러스를 검출하기 위해 가장 보편적으로 사용하고 있는 세포배양법과 민감도를 비교하였다.

민감도 실험에 사용한 바이러스는 A/X-31이며, 4일 동안 MDCK 세포에 배양한 후 역가를 측정한 결과

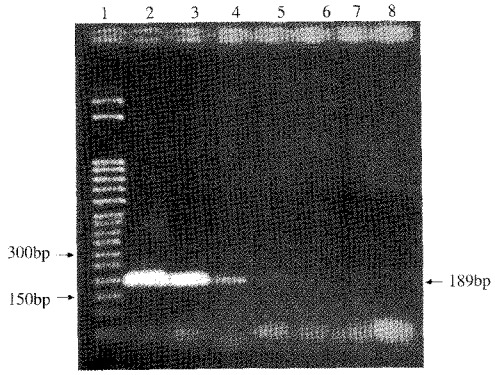

Fig. 3. Sensitivity of RT-PCR for detection of Influenza virus type A. The virus titer (A/X-31) was $10^{4.3}$ $TCID_{50}$/ml and then the virus was serially 10-fold diluted and RNA was extracted for RT-PCR. Lanes 1, DNA ladder, 2-8, 10^{-1}-10^{-7} dilutions.

$10^{4.25}TCID_{50}$/ml를 나타냈다. 이 바이러스 샘플을 10진 희석하여 희석된 샘플은 각각 RT-PCR과 세포 배양법으로 민감도를 측정하였다. RT-PCR한 결과는 바이러스 샘플을 10^{-4}까지 희석하였을 때까지 인플루엔자 바이러스 특이적인 189bp 크기의 증폭산물이 검출되었다(Fig. 3). 또한, 동일한 조건으로 희석된 샘플을 이용하여 세포배양법을 실시한 결과, RT-PCR과 결과와 동일하게 10^{-4}까지 희석한 바이러스 샘플까지 CPE가 관찰되었다(Table 1). 따라서 RT-PCR과 세포배양법이 동일한 민감도인 $10^{0.3}TCID_{50}$/0.1ml까지의 바이러스를 검출하는 것으로 나타났다.

임상적 적용

인플루엔자 A형 바이러스의 NS 유전자의 conserved resion을 증폭할 수 있는 RT-PCR이 인플루엔자 바이러스 감염여부를 정확히 검출할 수 있는지를 임상적 적용을 통해 확인해 보고자 하였다. 임상적 적용시험은 약독화 인플루엔자 바이러스를 페렛(ferret)에 감염시킨 후 가검물을 채취하여 RT-PCR을 실시하였다. 실험에 사용한 인플루엔자 A 바이러스는 reassortant 백신주 바이러스 A/X-31과 A/A-101이었으며, 이를 2군으로 나누어 각각 2마리의 페렛에 감염시켰다. 백신주 바이러스에 감염된 페렛에서 샘플의 채취는 nasal washing을 통한 것과 부검을 통하여 호흡기 장기를 비갑개(turbinate)에서부터 폐(lung)까지 채취하고 viremia 여부 확인을 위한 비장(spleen)을 채취하였다.

Table 1. Comparison of sensitivity between RT-PCR and cell culture to detect Influenza virus type A

Method	Dilution range					
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Titer ($TCID_{50}$/0.1ml)	$10^{3.3}$	$10^{2.3}$	$10^{1.3}$	$10^{0.3}$	$10^{-0.3}$	$10^{-1.3}$
RT-PCR	+	+	+	+	−	−
Cell culture	+	+	+	+	−	−

Table 2. RT-PCR for detection of Influenza A virus from clinical specimens of ferrets infected with live Influenza vaccine viruses

Viruses	Tissue samples					detection rate
	turbinate	trachea	lung	spleen	nasal washing	
A/X-31	+	−	−	−	−	2/2
	+	−	−	−	−	
A/A-101	+	−	−	−	−	1/2
	−	−	−	−	−	

이렇게 채취한 장기는 2×MEM (Eagle's minimum essential medium)을 첨가한 후 homogenization한 후 원심분리를 하여 상층액 만을 분리하여 바이러스 함유 샘플을 채취하였다. 상층액은 두 가지로 나누어 일부는 바로 세포배양 접종용으로 사용하였고 나머지는 RNA를 분리하였으며 앞서의 실험방법과 동일하게 RT-PCR을 실시하였다.

결과는 Table 2와 같다. 인플루엔자 A형 바이러스 백신주에 감염된 페렛은 비갑개에서 감염여부를 확인할 수 있었으며, 감염이 확인된 페렛은 4마리 중 3마리이었다. 또한, 이를 인플루엔자 바이러스 감염 여부를 확인하기 위하여 널리 쓰이는 세포배양법으로 확인한 결과 동일한 결과를 얻어 내어 본 연구의 RT-PCR 역시 임상적으로 사용할 수 있는 유용성이 있다고 판단되었다.

고 찰

인플루엔자 A형 바이러스는 전세계적으로 문제가 되고 있는 인수공통 전염병으로, 높은 유병율과 폐사율을 나타내는 호흡기 질병 바이러스이다(Hay 등, 1991; Mäkelä 등, 1998; Nicholson 등, 1997). 더욱이, 조류 인플루엔자의 경우 국내외 적으로 경제적으로 치명적인 타격을 주었다(Seo와 Kim, 2004). 따라서, 이런 인플루엔자 A형 바이러스를 사전에 예방하고 방역하기 위해서는 신속하고 정확한 검출방법이 필요하다. 때문에, 본 연구에서 인플루엔자 A형 바이러스를 검출하기 위하여 RT-PCR을 선택하였으며, 기존의 다른 연구와는 다르게 subtype만을 검출하는 것이 아니라 (Phipps 등, 2004), 이번 연구에 사용한 인플루엔자 A형 바이러스의 NS gene으로 부터의 염기서열로 제작된 primer쌍을 이용한 RT-PCR은 앞서의 결과를 통해 모든 인플루엔자 A형 바이러스를 검출함에 있어 유용성이 입증되었다. 뛰어난 특이도 결과를 나타냄과 동시에 기존에 널리 사용하는 세포배양법과 간접적으로 비교함으로써 민감도 부분에서도 전혀 뒤떨어지지 않음을 증명할 수 있었다. 또한, 준 임상적 실험을 통하여 본 연구의 RT-PCR은 임상적 적용에 있어서도 유용함을 나타내 주었다.

그러나, 본 실험은 한정된 바이러스와 마이코플라즈마 등을 사용하였다. 따라서, 이러한 부분에 있어 더욱 많은 연구가 필요할 것이며, 국내에 임상적으로 적용하기 위해서는 문제가 되는 다른 기타 바이러스를 대상으로 특이도 연구를 보완해야 할 뿐만이 아니라, 더 많은 인플루엔자 A형 바이러스를 사용하여 본 RT-PCR의 효능을 더욱 평가할 필요가 있다.

국내의 경우 조류에서는 인플루엔자 바이러스와 함께 문제가 되는 것이 Newcastle disease virus (NDV)이다. 이 두가지 바이러스는 임상증상으로 감별이 어렵기 때문에 신속한 방법을 사용한 감별진단이 필요하다. 특히 심한 임상증상과 이로 인한 경제적인 피해를 크게 초래하는 것이 velogenic NDV이다(Kaleta와 Baldauf, 1988; Panigrahy 등, 1993; Yang 등, 1997;

Kwon 등, 2003). 따라서, 추후 NDV와 인플루엔자 A형 바이러스를 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 방법으로 본 연구의 RT-PCR을 더욱 개발하여 duplex RT-PCR을 개발할 필요가 있다고 판단된다.

결 론

인플루엔자 A형 바이러스의 NS유전자 염기서열로 제작된 primer를 이용한 RT-PCR은 189bp 크기의 product를 증폭하는 것으로 나타났고, 본 RT-PCR은 인플루엔자 A형 바이러스만 검출할 뿐 인플루엔자 B 바이러스는 물론 다른 호흡기 병원체에서는 어떠한 증폭산물도 검출되지 않는 것으로 나타났다. RT-PCR의 민감도는 $10^{0.3}$ $TCID_{50}$로서 전통적으로 인플루엔자 바이러스를 검출하는 세포배양법과 동일하게 나타나 예민성이 좋은 것으로 나타났다.

사 사

본 연구는 강원대학교 동물의학종합연구소의 시설 지원에 의해 이루어졌음.

참 고 문 헌

Bao-Lan L, Webster RG, Brown LE, Nerome K. 1983. Heterogeneity of influenza B viruses. *Bull WHO* 61: 681-687.

Brammer L, Fukuda K, Arden N. 1997. Influenza surveillance-United states, 1992~93 and 1993~94. *Mor-bid Mortal Wkly Rep CDC Surveill Summ* 46: 1-12.

Cheng SM, Vainionpaa R, Zhao P, Li F, Hu A, Forrest B, Rappaport R. 2004. Detection of influenza B in clinical specimens: comparison of high throughout RT-PCR and culture confirmation. *Virus Res* 103: 85-90.

Claas EC, Sprenger MJ, Kleter GE, van Beck R, Quint WG, Masurel N. 1992. Type-specific identification of influenza viruses A, B and C by PCR. *J Virol Methods* 39: 1-13.

Hay AJ, Belshe RB, Anderson EL, Gorse GJ, Westblom TU. 1991. Influenza viruses. In: Belshe RB (Ed). *Textbook of human virology*, 2nd ed. Mosby, St. Louis, Missouri. 307-331.

Hayden FG, Atmar RL, Schilling M, Johnson C, Poretz D, Paar D, Huson L, Ward P, Mills RG. 1999. Use of the selective oral neuraminidase inhibitor oseltamivir to prevent influenza. *N Engl J Med* 341: 1336-1343.

Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, Donatelli I, Kida H, Paulson JC, Webster RG, Kawaoka Y. 1998. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* 72: 7367-7373.

Kaleta EF, Baldauf C. 1988. Newcastle disease in free-living and pet birds. In: Alexander DJ(Ed). *Newcastle disease*. Kluwer Academic, Boston, Massacheusette. 197-256.

Kessler N, Ferraris O, Palmer K, Marsh W, Steel A. 2004. Use of the DNA flow-thru chip, a three-dimensional biochip, for typing and subtyping of influenza viruses. *J Clin Microbiol* 42: 2173-2185.

Kwon HJ, Cho SH, Ahn YJ, Seo SH, Choi KS, Kim SJ. 2003. Molecular epidemiology of Newcastle disease in Republic of Korea. *Vet Microbiol* 95: 39-48.

Lamb RA, Krug RM. 2001. *Orthomyxoviridae*: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM (Eds). *Fields virology, 4th ed.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 1487-1532.

Landry ML, Ferguson D. 2003. Suboptimal detection of influenza virus in adults by the Directigen Flu A+B enzyme immunoassy and correlation of results with the number of antigen-positive cells detected by cytospin immunofluorescence. *J Clin Microbiol* 41: 3407-3409.

Leland DS, French MLV. 1998. Virus isolation and identification. In: Lennette EH, Halonen P, Murphy FA, (eds) *Laboratory diagnosis of infectious disease, Principles and Practice. Vol II, Viral, Rickettsial and Chlamydial diseases*. Springer-Verlag, New York. 49-51.

Mäkelä MJ, Puhakka T, Ruuskanen O, Leinonen M, Saikku P, Kimpimäki M, Blomqvist S, Hyypiä T, Arstila P. 1998. Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. *J Clin Microbiol* 36(2): 539-542.

Murphy BR, Webster RG. 1996. *Orthomyxoviruses*. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds). *Fields Virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia. 1397-1445.

Nicholson KG, Kent J, Hammersley V, Cancio E. 1997. Acute viral infections of upper respiratory tract in elderly people living in the community: Comparative, prospective population based study of disease burden. *BMJ* 315(7467): 1060-1064.

Ogilvie M. 2001. Molecular techniques should not now replace cell culture in diagnostic virology laboratories. *Rev Med Virol* 11: 351-354.

Panigrahy B, Senne DA, Pearson JE, Mixson MA, Cassidy DR. 1993. Occurrence of velogenic viscerotropic Newcastle disease in pet and exotic birds. *Avian Dis* 37: 254-258.

Phipps LP, Esse SC, Brown IH. 2004. Genetic subtyping of

Influenza A viruses using RT-PCR with a single set of primers based on conserved sequences within the HA2 coding region. *J Virol Methods* 122: 119-122.

Poddar SK. 2002. Influenza virus types and subtypes detection by single step single tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis. *J Virol Methods* 99: 63-70.

Röhm C, Zhou N, Süss J, Mackenzie J, Webster RG. 1996. Characterization of novel influenza haemagglutinin, H15: Criteria for determination of influenza A subtypes. *Virology* 217: 508-516.

Rota PA, Rocha EP, Harmon MW, Hinshaw VS, Sheerar MG, Kawaoka Y, Cox NJ, Smith TF. 1989. Laboratory characterization of a swine Influenza virus isolated from a fatal case of human Influenza. *J Clin Microbiol* 27: 1413-1416.

Ruest A, Michaud S, Deslandes S, Frost EH. 2003. Comparison of the Directigen flu A+B test, the QuickVue influenza test, and clinical case definition to viral culture and reverse transcription-PCR for rapid diagnosis of influenza virus infection. *J Clin Microbiol* 41: 3487-3493.

Seo SH, Kim SS. 2004. Epidemiology of influenza virus in Korean poultry. *Internal Congress Series* 1263: 758-761.

Shu LL, Lin YP, Wright SM, Shortridge KF, Webster RG. 1994. Evidence for interspecies transmission and reassortment of influenza A viruses in pigs in south China. *Virology* 202: 825-833.

Stalknecht D, Shane SM. 1988. Host range of avian influenza virus in free-living birds. *Vet Res Common* 12: 125-141.

Subbarao K, Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W, Hall H, Perdue M, Swayne D, Bender C, Huang J, Hemphill M, Rowe T, Shaw M, Xu X, Fukuda K, Cox N. 1998. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 279 (5349): 393-396.

Storch GA. 2003. Rapid diagnostic tests for influenza. *Curr Opin Pediatr* 15: 77-84.

Uyeki TM. 2003. Influenza diagnosis and treatment in children: A review of studies on clinically useful tests and antiviral treatment for influenza. *Pediatr Infect Dis J* 22: 164-177.

Wright PF, Webster RG. 2001. *Orthomyxoviridae*: In: Knipe DM, Howley PM (Eds), *Fields Virology, 4th ed.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 1533-1580.

Yamada A, Lam LY, Tam JS. 2004. Typing and subtyping of influenza viruses and respiratory syncytial viruses by multiplex RT-PCR. *International Congress Series* 1263: 381-385.

Yang CY, Chang PC, Hwang JM, Shieh HK. 1997. Nucleotide sequence and phylogenic analysis of Newcastle disease virus isolates from recent outbreaks in Taiwan. *Avian Dis* 41: 365-373.

Zhu RN, Xu H, Qian Y, Wang F, Deng J, Zhao LQ, Liao B, Huang RY. 2005. Sequence analysis of the HA1 regions of hemagglutinin gene from influenza viruses (H3N2) isolated from children in Beijing in 2004 indicated antigenic variation. *Zhonghua Er Ke Za Zhi Chinese* 43: 653-656.