

Detection of the Avian Influenza Viruses Nonstructural Protein 1 for Distinction between Vaccinated and Infected Chickens Using Synthetic Peptide-Based ELISA

Hyung Tae Lee¹, Kyoung Hwa Jung¹, Ji Hyun Park¹, Gun-Woo Ha², Jin-Sik Oh²,
Youn-Kyoung Oh² and Young Gyu Chai^{1*}

¹Division of Molecular and Life Sciences, Hanyang University, Ansan, Korea, ²Bionote, Inc., Suwon, Korea

Avian influenza (AI) virus infects both animal and human. Low pathogenic AI virus infections (some H7 and H9 subtypes) have been reported all over the world and pose a potential threat to the poultry industry. Vaccination is the most effective way to prevent virus infection. However, vaccination makes it difficult to differentiate between vaccinated chickens and infected chickens. In order to differentiate vaccinated chickens from naturally infected chickens, we adopted synthetic peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the peptide sequences from nonstructural protein 1 (NS1) of H9N2. Five synthetic peptides were designed using Protein Variability Server (<http://imed.med.ucm.es/PVS/>) and synthesized. NS1-1 ~ NS1-4 peptides failed to detect serum antibodies from both vaccinated and naturally infected chickens. NS1-5 peptide from the C-terminal NS1 protein detected serum antibody from naturally infected chickens but not vaccinated chickens. These results imply that NS1-5 peptide may be a useful tool to differentiate naturally infected chicken from vaccinated chicken as being used in the synthetic peptide-based ELISA.

Key Words: Avian influenza, H9 subtype, Nonstructural protein 1 (NS1), Synthetic peptide-based ELISA

서 론

독감 바이러스 (influenza virus)는 사람이나 동물에게 감염되어 매우 치명적인 피해를 주는 병원체 중의 하나로 현재 전 세계적으로 널리 퍼져있으며, 특히 독감 바이러스 A와 B가 급성 바이러스성 호흡기 질환의 주된 원 인체이다.

조류 독감 (avian influenza, AI) 바이러스는 아형에 따라 고병원성과 저병원성으로 분류할 수 있다. 고병원성 AI 바이러스 (H5 또는 H7 아형)는 감염 확률이 매우 높고 그로 인한 치사율도 높기 때문에 사람을 포함해서 많

은 동물들에게 치명적이다 (1~3). 1997년부터 아시아, 유럽국가에서 고병원성 AI 바이러스에 감염되었다는 보고가 있다. 2003~2004년에는 한국을 포함하여 많은 아시아 국가에서 가금류에 H5N1 고병원성 AI 바이러스에 의한 감염이 보고되었다 (4~6).

저병원성 AI 바이러스 (H7 또는 H9 아형)는 고병원성 AI 바이러스와는 달리 사람이나 동물에게 치명적이지는 않지만 이 바이러스에 감염된 가금류는 가벼운 호흡기 질환을 앓게 되며, 달걀의 생산이 줄어들게 됨으로써 경제적인 피해를 입힌다 (7). 1998년부터 우리나라를 포함하여 중앙 아시아 여러 국가에서 저병원성 AI 바이러스에 감염되었다는 보고가 증가하고 있는데, 그 중에 이란과 파키스탄에서는 상업용으로 판매하는 닭이 저병원성 AI 바이러스를 전염시키는 원인이라는 보고가 있다 (8, 9). 또한 저병원성 AI 바이러스에 포함되는 H9N2 바이러스는 아시아 지역의 풍토병으로 알려져 있으며, 홍콩과 중국에서 사람에게 감염되었다는 것이 보고되었으며 (10, 11),

Received: July 12, 2010/ Revised: September 28, 2010

Accepted: September 29, 2010

*Corresponding author: Young Gyu Chai Ph.D. Division of Molecular and Life Sciences, Hanyang University, Ansan, 425-791, Korea.
Phone: +82-31-400-5513, Fax: +82-31-406-6316
e-mail: ygchai@hanyang.ac.kr

시간이 지날수록 H9N2 바이러스가 감염할 수 있는 숙주 범위가 넓어지고 사람을 포함하는 다른 종에게 보다 쉽게 전파될 수 있는 가능성을 갖고 있다 (12).

최근 한국을 비롯한 동아시아 국가에서는 AI 바이러스 감염에 의한 보고가 증가되어 피해가 확산되고 있으므로 국제수역사무국 (Office International des Epizooties; OIE)에서는 AI 바이러스에 의한 감염을 List A 질병으로 분류하였고, 국내에서는 제1종 가축 전염병으로 분류하고 있다. 병원성 조류 독감이 발생한 경우에는 우리나라를 포함하여 전 세계의 대부분 국가들이 살처분을 하고 있으며, 발생한 국가에서는 양계산물을 수출할 수 없게 된다. 이러한 피해를 막기 위해 한국을 포함하는 제한된 숫자의 국가에서는 백신접종을 하고 있다. 하지만, 조류 독감이 발생하는 경우 현존하는 혈청 검사를 통하여 백신을 접종한 개체와 자연적으로 감염된 개체를 구분할 수 없기 때문에 모든 닭을 살처분할 수 밖에 없는 문제점을 가지고 있다 (7, 13, 14).

독감 A 바이러스 표면의 당단백질인 헤마글루티닌 (hemagglutinin: HA), 뉴라미니다제 (neuraminidase: NA) 단백질에 대한 항원성 (antigenicity)에 따라 다양한 아형 (subtype)으로 구분되며, 현재 H1-H16과 N1-N9이 알려져 있다 (15).

독감 A 바이러스는 RNA 게놈을 가지고 있으며, HA, NA, nucleoprotein (NP), matrix protein 1 (M1), matrix protein 2 (M2), nonstructural protein 1 (NS1), nonstructural protein 2 (NS2), nuclear export protein (NEP), polymerase acid (PA), polymerase basic 1 (PB1), polymerase basic 1 - F2 (PB1-F2) 그리고 polymerase basic 2 (PB2)라는 단백질을 발현한다 (16). 이들 중 NS1은 바이러스가 숙주에 감염되었을 시 발현되어 RNA에 결합을 하는 부분과 다른 단백질들과 상호작용을 하는 부분을 가지고 있는 단백질이다 (17). 즉, 바이러스가 숙주에 감염되었을 때 숙주의 여러 많은 RNA, 단백질들과 상호작용하여 바이러스가 복제하는데 중요한 역할을 하고 숙주의 면역반응을 억제하는 등 여러 기능을 한다 (15, 18). NS1은 바이러스가 숙주세포에 감염되고 증식되는 경우에만 감염된 개체에서 발현되기 때문에 NS1 단백질의 존재 유무는 백신을 접종한 개체와 바이러스에 감염된 개체를 구별할 수 있는 표지자로 사용될 수 있다 (7, 19).

본 연구에서는 AI 바이러스에 감염된 닭과 백신을 접종한 닭을 구별하기 위해 감염된 개체에서 높은 발현양

을 보이는 NS1을 이용해 한국에서 발생한 AI 바이러스인 H9N2의 NS1 단백질의 에피토프를 MultAlin과 PVS 프로그램으로 계산하여 예상하였고, 예상된 에피토프의 펩타이드를 합성하여 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)방법을 이용하여 AI 바이러스에 감염된 닭과 백신을 접종한 닭의 혈청과의 반응을 관찰하였다.

재료 및 방법

닭 혈청

총 61개 (감염되지 않은 26개, 백신을 접종한 26개, 감염된 9개)의 닭 혈청을 Bionote 사 (Suwon, Korea)로부터 얻었다. 특정질병부재 (specific pathogen free: SPF) 닭의 혈청은 5주령부터 70주령까지의 닭에서 혈액을 추출하여 분리하였다. 백신을 접종한 닭 혈청은 18주령, 40주령의 닭에 백신을 접종한 후 혈액을 추출하였다. 감염된 닭의 혈청은 6~7주령 닭에게 H9N2 바이러스를 접종한 후에 혈액을 추출하였다. 얻은 혈청을 $15,000 \times g$ 에서 10분 동안 원심 분리하여 불순물을 제거한 후 사용 전까지 4℃에서 보관하였다.

펩타이드 합성

한국에서 발생한 AI 바이러스인 H9N2의 NS1 단백질 서열을 확보하여 MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/>)

Table 1. GenBank accession number of NS1 proteins in Korea avian influenza

NS1 protein of Korea	GenBank accession number
A/Chicken/Korea/25232-006/96 (H9N2)	AAD52955
A/Chicken/Korea/S21/2004 (H9N2)	ACD37776
A/Korea/KBNP-0028/2000 (H9N2)	ABQ57383
A/Chicken/Korea/AI-96004/1996 (H9N2)	ACZ47501
A/Chicken/Korea/MS96-CE6/1996 (H9N2)	ACZ47499
A/Chicken/Korea/38349-p96323/96 (H9N2)	AAD52953
A/Chicken/Korea/99029/99 (H9N2)	AAQ05002
A/Chicken/Korea/S21/2004 (H9N2)	ACD37766
A/Chicken/Korea/S1/2003 (H9N2)	AAV65821
A/Chicken/Korea/S27/04 (H9N2)	ABC48833
A/Chicken/Korea/S25/04 (H9N2)	ABC48823
A/Chicken/Korea/S24/04 (H9N2)	ABC48813

multalin/multalin.html)으로 정렬하였고, 예상 에피토프는 PVS 프로그램 (<http://imed.med.ucm.es/PVS/>, Protein Variability Sever)으로 계산하였다. 즉, 1996년부터 2004년까지 한국에서 발생한 H9N2의 NS1서열 12개를 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>)를 통해서 얻었으며 (Table 1), MultAlin을 이용하여 모든 서열을 정렬하였다 (20). PVS를 사용하여 분석한 NS1 서열에서 먼

역 항체들이 결합할 수 있는 에피토프 부분을 선별하였다. 얻은 4 펩타이드 (9 mer)와 Dundon 등 (5, 21)의 연구에서 사용하였던 NS1 서열 중에 C 말단 부분 (12 mer)을 참조하여 한국에서 발견된 서열에서 다섯 부분 (RLRRDQKSL, AIMDKNITL, TLKANFSVI, EDVKNAIGV, KRKMARTIESEV)을 고안하였다 (Table 2). 고안하여 선별한 총 5부분의 펩타이드를 합성하였다 (Cosmo Co., Seoul, Korea).

Table 2. List of synthesized peptide of NS1protein

	Synthesized peptide sequence	Location in NS1 protein
NS1-1	RLRRDQKSL	35~43
NS1-2	AIMDKNITL	122~130
NS1-3	TLKANFSVI	129~137
NS1-4	EDVKNAIGV	172~180
NS1-5	KRKMARTIESEV	219~230

NS1-1 ~ NS1-4 peptides were predicted by PVS (Protein Variability Sever, <http://imed.med.ucm.es/PVS/>). NS1-5 peptide was referred from reports of Dundon et al (5, 21)

ELISA

Table 2의 펩타이드를 coating buffer (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, 0.2 g/L NaN₃, pH 9.6)에 1 µg/100 µl 농도로 희석시킨 후, 96 well maxisorp immuno plate (Nunc, Roskilde, Denmark)에 각 웰당 100 µl씩 분주하여 하룻밤 동안 4°C에서 coating하였다. Coating buffer를 제거한 후 인산염 완충 생리식염수 (PBS)/0.5% Tween 20/5% 소 혈청 알부민 (BSA)으로 37°C에서 1시간 동안 blocking하였다. Blocking buffer를 PBS/0.5% Tween 20으로 4회 씻어서 제거한 후

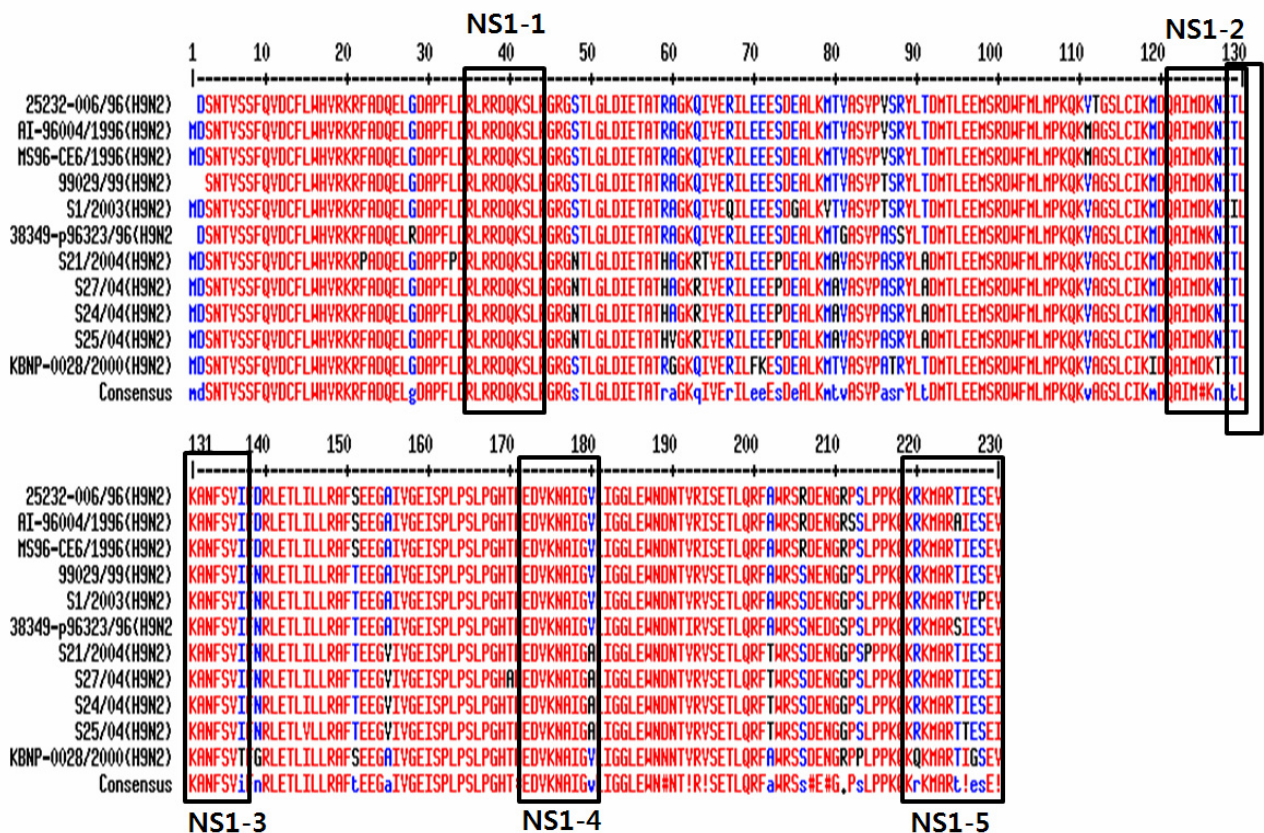


Figure 1. Multiple sequence alignment of NS1 proteins from avian influenza virus reported in Korea using Multalin. The NS1 protein sequences were obtained from GenBank. Multiple sequence alignment analysis of NS1 proteins using Multalin displayed 84% homology.

1차 항체로는 닭 혈청을 희석해서 1시간 동안 상온에서 반응하였다. 반응 후 4회 세척하고 HRP (horseradish peroxidase)가 결합되어 있는 goat-anti-chicken IgG (H+L) (BioFX laboratories, Owings Mills, MD, USA)를 사용하여 1시간 동안 상온에서 반응하였다. 펩타이드를 이용한 ELISA 실험에 가장 적합한 혈청과 2차 항체의 비율을 결정하기 위해서 혈청과 2차 항체의 희석 비율 (혈청: 1/100, 1/1000, 1/3000, 1/5000, 1/10000, 2차 항체: 1/5000, 1/10000)을 각각 다르게 해서 실험을 하였다. NS1-5 펩타이드를 사용하여 얻은 결과를 통해서 혈청은 1/100, 2차 항체는 1/5000의 비율로 PBS/0.5% Tween 20/5% BSA buffer에 희석하는 최적 조건을 결정하였다. 2차 항체를 제거 후에 TMB (3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine)-ELISA (Thermo scientific, Rockford, IL, USA) 용액을 첨가하고 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 측정 결과값으로 평균 흡광도 + 2 X (표준편차) 공식을 이용하여 cut-off 값을 계

산하였다. 만약 흡광도 값이 cut-off 값보다 높을 경우 그 혈청은 바이러스에 감염된 것으로 결정하였다 (7).

결 과

NS1 서열 분석 및 에피토프 예측

NS1 서열 중에서 면역 항체가 결합할 수 있는 에피토프를 예측하기 위해 한국에서 발생한 H9N2 바이러스 NS1 서열을 분석하였다 (Fig. 1). NCBI에서 얻은 NS1 서열 12개를 이용해 정렬한 결과 모든 서열간에 84%의 상동성을 가진다는 것을 확인하였다. 이들 서열을 이용하여 면역 항체가 결합할 수 있는 4개 (NS1-1, NS1-2, NS1-3, NS1-4)의 에피토프를 예측해 내었다. Dundon 등 (5, 21)의 연구에서 사용하였던 NS1 단백질의 C 말단 부분을 참조하여 한국에서 발견되었던 NS1의 C 말단 부분의 펩타이드 (NS1-5) 서열을 선별하여 합성하였다 (Table 2).

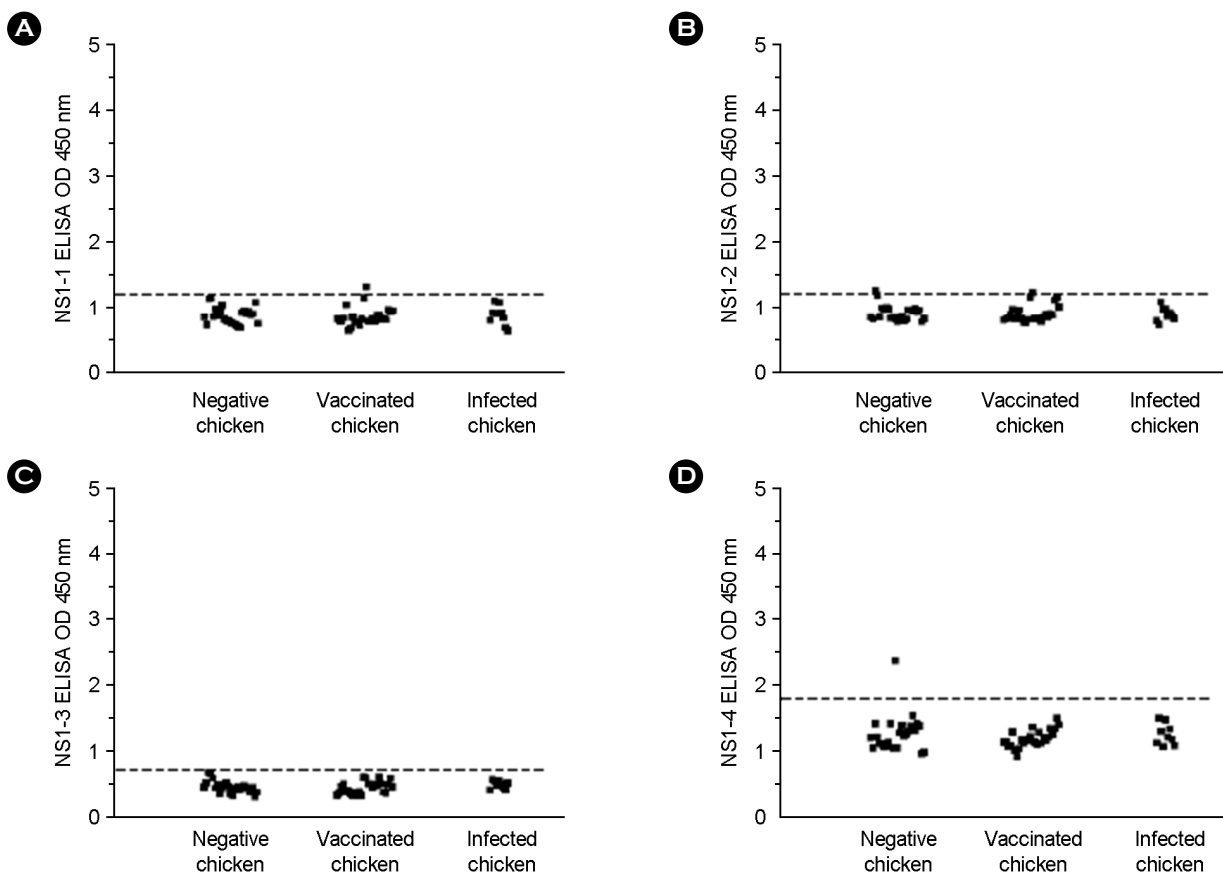


Figure 2. Detection of anti-NS1 antibodies by synthetic peptide-based ELISA in chicken sera. (A) NS1-1, (B) NS1-2, (C) NS1-3, and (D) NS1-4. Dashed horizontal line represents the cut-off value calculated by adding an OD 450 nm mean value and two standard deviations (SD). The cut-off values for the test are (A) 1.122, (B) 1.127, (C) 0.601, and (D) 1.787. Serum sample is positive when OD value is greater than the line.

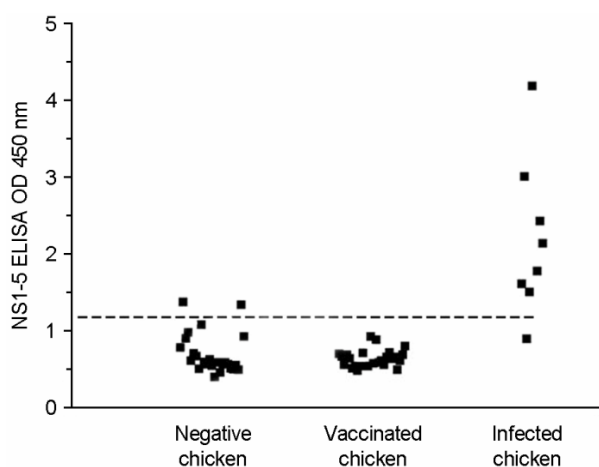


Figure 3. Detection of anti-NS1 antibodies by synthetic NS1-5 peptide-based ELISA in chicken sera. Dashed horizontal line represents the cut-off value calculated by adding an OD 450 nm mean value and two standard deviations (SD). The cut-off value for the test is 1.257. Serum sample is positive when OD value is above line.

Enzyme-linked immunosorbent assay

합성한 펩타이드를 이용한 ELISA 실험에 가장 적합한 혈청과 2차 항체의 비율을 결정하기 위해서 혈청과 2차 항체의 희석 비율을 각각 다르게 해서 실험을 하였다. NS1-5의 펩타이드를 사용하여 얻은 결과를 통해서 혈청은 1/100, 2차 항체는 1/5000의 비율로 희석하는 최적 조건을 결정하였다 (실험 결과 미제시). 펩타이드 서열 분석을 통해서 얻은 5개의 펩타이드 (1 µg/well)를 이용하여 ELISA를 수행한 후에 감염되지 않은 닭 혈청을 이용한 결과값으로 cut-off 값을 계산하였다 (NS1-1 : 1.122, NS1-2 : 1.127, NS1-3 : 0.601, NS1-4 : 1.787, NS1-5 : 1.257). ELISA 결과값이 cut-off 값보다 높으면 바이러스에 감염이 되었다는 것으로 확인할 수 있는데, 4개의 NS1-1 ~ 4 펩타이드를 이용하여 얻은 값으로 평균 값을 구해서 비교한 결과 SPF 닭 (NS1-1 : 0.8601, NS1-2 : 0.8882, NS1-3 : 0.4219, NS1-4 : 1.2263)과 백신을 접종한 닭 (NS1-1 : 0.8353, NS1-2 : 0.8687, NS1-3 : 0.4084, NS1-4 : 1.1408), 감염된 닭의 혈청 (NS1-1 : 0.9454, NS1-2 : 0.8838, NS1-3 : 0.4765, NS1-4 : 1.2512)에서 cut-off 값보다 낮은 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2). 하지만 NS1-5 펩타이드 서열을 이용한 실험 결과에서는 SPF 닭 (NS1-5 : 0.7409)과 백신을 접종한 닭 (NS1-5 : 0.6735)에서는 cut-off 값보다 낮지만 감염된 닭 (NS1-5 : 2.2686)에서는 얻은 결과값이 cut-off 값보다 높은 것을 확인하였다 (Fig. 3).

고 찰

전 세계적으로 광범위한 지역에 퍼져 많은 피해를 주고 있는 병원체 중에 하나인 독감 바이러스는 바이러스 표면을 이루고 있는 HA, NA 단백질에 따라 고병원성 (H5 또는 H7 아형)과 저병원성 (H7 또는 H9 아형)으로 분류한다 (7). 특히 한국에서는 저병원성 H9N2 바이러스에 의해 가금류 사업에 많은 피해를 입기 때문에 최근 AI 바이러스 감염에 의한 피해를 줄이고자 사육하는 닭에게 백신을 처리하고 있다. 하지만, 현존하는 기술로는 AI 바이러스에 감염된 조류와 AI 백신을 접종한 조류를 구분하지 못하기 때문에 조류 독감이 발생하는 경우 백신을 접종한 개체와 자연적으로 감염된 개체의 모든 닭을 살처분하고 있다.

AI 바이러스가 조류에 감염되면 NS1 단백질이 발현되어 숙주의 여러 많은 RNA, 단백질들과 상호작용하여 바이러스가 복제하는데 도움을 주며 숙주의 면역반응을 억제하여 AI 바이러스의 증식을 돕게 된다. 이러한 NS1 단백질의 유무를 점검하여 AI 바이러스의 감염여부를 구별하고자 하였다 (7). NS1 단백질을 이용한 Dundon 등 (5, 21)의 이전 연구에서 보고한 바에 따르면, NS1 전체 단백질을 사용하거나 혹은 부분 펩타이드로서 KRYMARRVESEV 혹은 KRKMARTIESEV를 사용하였다. 본 연구에서는 한국 AI 바이러스의 NS1 서열 12개를 GenBank에서 얻은 후 MultAlin을 이용해 정렬하여 모든 서열간에 84%의 상동성을 가진다는 것을 확인하였다.

한국 AI 바이러스 NS1의 상동성이 있는 부분에서 에피토프 4부분 (NS1-1, NS1-2, NS1-3, NS1-4)과 Dundon 등 (5, 21)의 연구에서 사용하였던 NS1의 C 말단 끝부분 (KRKMARTIESEV)을 포함하는 총 5개의 펩타이드 서열을 선별하여 합성하였다. 합성된 각각의 펩타이드를 이용하여 ELISA를 수행한 결과 NS1-1 ~ NS1-4 펩타이드에서는 SPF 닭 혈청을 이용하여 계산한 cut-off 값보다 낮은 값을 보여 SPF 닭과 백신을 접종한 닭, 그리고 바이러스에 감염된 닭 사이를 구별할 수 없었다. 그러나 C 말단 끝부분인 NS1-5 펩타이드는 오직 바이러스에 감염된 닭에서 얻은 결과값에서 cut-off 값보다 높은 값을 보여 SPF 닭과 백신을 접종한 닭, 그리고 바이러스에 감염된 닭 사이를 구별할 수 있었다.

결과적으로 한국산 AI 바이러스의 에피토프 예상지역

을 포함하는 NS1 단백질 펩타이드 5개의 서열을 가지고 ELISA 실험을 수행한 본 연구에서는 에피토프를 예상하여 합성한 4개의 펩타이드 서열을 이용하여 H9N2 바이러스에 의한 감염여부를 판단하는 것은 적합하지 않은 것을 확인하였다. 본 연구는 한국에서 발견되었던 NS1 단백질의 펩타이드 서열을 가지고 연구를 수행하였다는 것과 이전에 사용되지 않았던 펩타이드 서열을 사용한 것에 의미가 있고, NS1-5 펩타이드의 서열을 통해 완벽하지는 않지만 백신 처리한 닭과 감염된 닭을 구별하는데 이용할 수 있다는 것을 확인하였다. 따라서 본 연구의 결과는 NS1 단백질을 이용한 새로운 에피토프 펩타이드를 고안하여 AI 바이러스에 감염된 닭과 백신처리 닭을 특이적으로 판단할 수 있는 방법을 찾아내는데 기초자료가 되리라 생각한다.

참 고 문 헌

- 1) Yuen KY, Chan PK, Peiris M, Tsang DN, Que TL, Shortridge KF, *et al.* Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet* 1998;351:467-71.
- 2) Swayne DE, Suarez DL. Highly pathogenic avian influenza. *Rev Sci Tech* 2000;19:463-82.
- 3) Tumpey TM, Alvarez R, Swayne DE, Suarez DL. Diagnostic approach for differentiating infected from vaccinated poultry on the basis of antibodies to NS1, the nonstructural protein of influenza A virus. *J Clin Microbiol* 2005;43:676-83.
- 4) Capua I, Alexander DJ. Avian influenza: recent developments. *Avian Pathol* 2004;33:393-404.
- 5) Dundon WG, Milani A, Cattoli G, Capua I. Progressive truncation of the Non-Structural 1 gene of H7N1 avian influenza viruses following extensive circulation in poultry. *Virus Res* 2006;119:171-6.
- 6) Webster RG, Peiris M, Chen H, Guan Y. H5N1 outbreaks and enzootic influenza. *Emerg Infect Dis* 2006;12:3-8.
- 7) Zhao S, Jin M, Li H, Tan Y, Wang G, Zhang R, *et al.* Detection of antibodies to the nonstructural protein (NS1) of avian influenza viruses allows distinction between vaccinated and infected chickens. *Avian Dis* 2005;49:488-93.
- 8) Banks J, Speidel EC, Harris PA, Alexander DJ. Phylogenetic analysis of influenza A viruses of H9 haemagglutinin subtype. *Avian Pathol* 2000;29:353-9.
- 9) Alexander DJ. Report on avian influenza in the Eastern Hemisphere during 1997~2002. *Avian Dis* 2003;47:792-7.
- 10) Guo YJ, Krauss S, Senne DA, Mo IP, Lo KS, Xiong XP, *et al.* Characterization of the pathogenicity of members of the newly established H9N2 influenza virus lineages in Asia. *Virology* 2000;267:279-88.
- 11) Lin YP, Shaw M, Gregory V, Cameron K, Lim W, Klimov A, *et al.* Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: relationship between H9N2 and H5N1 human isolates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:9654-8.
- 12) Horimoto T, Kawaoka Y. Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:591-600.
- 13) Lambrecht B, Steensels M, Van Borm S, Meulemans G, van den Berg T. Development of an M2e-specific enzyme-linked immunosorbent assay for differentiating infected from vaccinated animals. *Avian Dis* 2007;51:221-6.
- 14) Jeong OM, Kim MC, Kang HM, Ha GW, Oh JS, Yoo JE, *et al.* Validation of egg yolk antibody based C-ELISA for avian influenza surveillance in breeder duck. *Vet Microbiol* 2010; 144:287-92.
- 15) Hale BG, Randall RE, Ortín J, Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J Gen Virol* 2008;89:2359-76.
- 16) Ghedin E, Sengamalay NA, Shumway M, Zaborsky J, Feldblyum T, Subbu V, *et al.* Large-scale sequencing of human influenza reveals the dynamic nature of viral genome evolution. *Nature* 2005;437:1162-6.
- 17) Wang W, Riedel K, Lynch P, Chien CY, Montelione GT, Krug RM. RNA binding by the novel helical domain of the influenza virus NS1 protein requires its dimer structure and a small number of specific basic amino acids. *RNA* 1999;5: 195-205.
- 18) Basler CF, Aguilar PV. Progress in identifying virulence determinants of the 1918 H1N1 and the Southeast Asian H5N1 influenza A viruses. *Antiviral Res* 2008;79:166-78.
- 19) Krug RM, Etkind PR. Cytoplasmic and nuclear virus-specific proteins in influenza virus-infected MDCK cells. *Virology* 1973;56:334-48.
- 20) Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 1988;16:10881-90.
- 21) Dundon WG, Maniero S, Toffan A, Capua I, Cattoli G. Appearance of serum antibodies against the avian influenza nonstructural 1 protein in experimentally infected chickens and turkeys. *Avian Dis* 2007;51:209-12.