

제주지역 돼지에서 Influenza 바이러스 항원 및 혈중 항체 조사

전용철 · 양형석 · 양나연 · 김대용¹ · 김재훈 · 배종희*

제주대학교 수의학과

¹서울대학교 수의과대학

(게재승인: 2004년 5월 23일)

The prevalence of swine influenza viral antigens and serum antibodies in Piglets in Jeju

Yong-chul Jun, Hyoung-seok Yang, Na-yeoun Yang, Dae-yong Kim¹,
Jae-hoon Kim and Jong-hee Bae*

Department of Veterinary Medicine, Cheju National University, Jeju, 690-756, Korea

¹College of Veterinary Medicine and School of Agricultural Biotechnology, Seoul National University,
Seoul 151-742, Korea

(Accepted: May 23, 2004)

Abstract : Ninety pigs under the age of 120-day-old requested at the diagnostic laboratory of animal diseases in Cheju National University were evaluated for the prevalence of tissue antigen and serum antibody to swine influenza virus (SIV). For histopathologic examination there was sampled at the consolidated area in cranioventral or dorsocaudal lobes of lungs. Lung tissues from all pigs were tested for the antigen of SIV type A by immunohistochemistry (IHC). Sera from 56 pigs were used for the antibody detection to SIV type A (subtype H1N1 and H3N2) by haemagglutinin inhibition test. Pneumonic lesions were observed in 72 cases (80%) of 90 pigs. Broncho-interstitial or interstitial pneumonia were more prevalent than suppurative or fibrinous bronchopneumonia. According to HI test, 46.4% of the tested sera showed seropositive. Positive sera were consisted with 5.3% for SIV H1N1, 28.6% for SIV H3N2, and 12.5% for both subtype to be tested, respectively. SIV antigens were detected in 51 cases(56.6%) of 90 pigs. Most SIV antigens were presented in the epithelium of the bronchi and bronchiole. Necrotizing bronchitis or bronchiolitis were observed in 28(31.1%) cases of all inspected pigs. These results suggested that SIV might be an important role to induce swine pneumonia in Jeju. Also IHC was very useful for the detection of SIV in the lung.

Key words : swine influenza virus, pneumonia, immunohistochemistry, haemagglutinin inhibition test

서 론

Swine influenza virus(SIV)는 *Orthomyxoviridae*에 속하는 단일 stranded RNA 바이러스이며 계놈은 분절형이고 RNA는 핵에서 합성된다. SIV는 다양한 형태를 나타내며 크기는 직경 80~120 nm이고 때로 사상형을 나타내기도 한다. 인플루엔자 바이러스는 nucleoprotein과 기질단백질의 항원성 차이에 따라 A, B, C 3가지 형으로 구분되고, A형은 혈구응집소와 뉴라미니다아제의 특성

에 따라 여러 아형으로 나뉜다. 인플루엔자 A형 바이러스는 간상의 혈구응집소와 버섯모양의 뉴라미니다아제인 2종류의 돌기가 있으며, 이것들은 소수성 아미노산 서열을 이용하여 바이러스지질외막에 부착되어 있다. 외막 내에는 기질단백질이 있고 그 안에는 8개의 분절형 단일 stranded RNA 분자가 있다 [19].

현재까지 돼지에서 유행된 swine influenza(SI)는 주로 항원형 A의 아형인 H1N1과 H3N2이 많으며, H1N1은 주로 미국에서, H3N2는 유럽에서 유행하고 있다. 돼지는 고

This research was funded by Problem Oriented Technology Development Project for Agricultural and Forestry in the Republic of Korea

*Corresponding author: Jong-hee Bae

Department of Veterinary Medicine, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea
[Tel: +82-64-754-3364, Fax: +82-64-725-3380, E-mail: jhbae@cheju.ac.kr]

전형 H1N1 인플루엔자 바이러스를 비롯 항원성이 조류와 유사한 H1N1 바이러스, 그리고 사람 분리주와 유사한 H1N1 및 H3N2 바이러스 등에 감수성이 있다 [5, 12, 23].

SIV는 돼지에서 직접 폐렴을 일으키거나 다른 병원체와 혼합 감염되어 폐렴을 증폭시키는 것으로 알려져 있다 [6, 20]. 비육돈에서 성장률 저하 [14]와 모돈에 감염시 허약자돈의 출산 및 유·사산을 일으킨다는 보고도 있다 [7]. SIV는 최근 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스, 오제스키병 바이러스, 돼지 호흡기 코로나 바이러스 등과 함께 문제되고 있는 돼지 호흡기 질병 복합체의 한 원인으로 여겨지고 있으며, 흔히 *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Actinobacillosis pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Hemophilus parasuis*, *Salmonella choleraesuis* 등의 세균들과도 혼합 감염을 일으킨다 [8].

SIV의 주 감염 경로는 비인후두를 통해 돼지에서 돼지로 감염되는 직접전파로 알려져 있다. 감염은 호흡기에도 국한되어 발생하며, 바이러스혈증은 드물게 나타난다 [4]. 바이러스의 복제는 비강 점막, 편도, 기관, 기관기관지림프절 및 폐장에서 이루어지며 [15], 특히 이 바이러스는 기관지 및 세기관지 상피세포에 높은 친화성을 지니는 것으로 밝혀져 있다. SIV를 인공 감염시킨 돼지에서 매우 민감한 ELISA를 이용할 경우 혈청과 비강 점막내 면봉 채취가검물에서 각각 접종 3일 및 4일부터 특이 항체를 검출할 수 있다 [16]. 항체 검사 방법으로는 혈구응집억제 반응과 ELISA [17] 등이 알려져 있고, 항원 검사로는 바이러스의 분리, 면역조직화학염색 [21], 직·간접형광항체법 [3] 및 중합효소연쇄반응 [22] 등이 이용되고 있다.

SI의 병리조직학적 소견으로는 기관지 및 세기관지 상피의 광범위한 변성과 괴사가 일어나고, 호흡기 내에는 탈락된 상피세포와 호중구 등의 삼출물이 관찰되며, 기관지 및 혈관주위에 단핵세포의 침윤을 보인다 [11]. 또한 모세혈관의 확장 및 출혈, 림프구, 조직구 및 형질세포가 폐포벽에 침윤되는 간질성 폐렴의 특징을 나타낸다 [4]. 한편 최근에는 과거 병변과는 다소 상이한 심한 증식성 괴사성 폐렴을 일으키는 새로운 SIV 변이주에 대한 보고도 있는 실정이다 [9, 18].

이 연구는 제주지역에서 질병진단 의뢰된 돼지 중 호흡기 질병에 이환된 개체에서 항체 검사를 비롯하여 폐장 내 발생한 폐렴의 병리조직학적 형태와 폐장에서 SIV 항원의 검출을 병행하여 제주도에서 SI의 발생 양상과 그 특성을 조사하고자 실시하였다.

재료 및 방법

실험동물

1997년부터 1999년 사이 질병진단 의뢰된 120일령 이

하의 돼지 90두(1~120일령)를 대상으로 폐장에 대한 병리학적 검사와 SIV A형에 대한 면역조직화학적 항원 검사를 실시하였다. 또한 이 중 혈청이 보관되어 있는 56두에 대하여 A형 SIV의 아형 H1N1 및 H3N2에 대한 항체 검사를 수행하였다.

병리조직학적 검사

폐장에 대한 조직학적 검사는 전복측엽(첨엽, 심엽, 부엽)과 후배측엽(횡격막엽)의 경화소를 채취하여 10% 중성 포르말린에 고정한 후 일반적인 조직 처리 과정을 거쳐 파라핀 블록을 제작하였다. 3~5 µm 두께로 조직을 절편하고, hematoxylin-eosin(H&E) 염색 후 Jubb 등 [13]의 분류에 따라 기관지간질성 폐렴, 간질성 폐렴, 화농성 기관지 폐렴 및 섬유소성 기관지 폐렴 등으로 구분하여 검사하였다.

면역조직화학염색

병변이 관찰된 폐장을 3~5 µm 두께로 절편하여 0.01% poly-L-lysine 처리된 슬라이드에 부착하고 파라핀을 제거한 후, 3% H₂O₂가 첨가된 메탄올에 30분 간 반응시켰으며, proteinase K로 37°C에서 30분간 처리하였다. 10% 염소혈청으로 실온에서 30분간 반응시키고, avidin-biotin blocking kit(Vector Lab., USA)로 15분간 실온에서 처리한 후, SIV에 대한 단클론 항체(hybridoma 65, ATCC)를 1:2000으로 희석하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 이차항체는 biotinylated anti-mouse IgG(1:200)를 실온에서 45분 간 반응 후 avidin-biotin complex(Vector Lab., USA)로 37°C에서 30분 간 반응시켰으며, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride 용액으로 발색한 다음 Harris hematoxylin으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. SIV 항원 및 항체가 없는 돼지의 폐장을 음성대조군으로 하였고 양성대조군은 수의과학검역원으로부터 제공받은 슬라이드를 사용하였다.

혈청항체 검사

SIV 항체 검사를 위하여 혈구응집억제반응을 실시하였다. 모든 혈청은 56°C에서 30분 간 비동화 시킨 후, 혈청 내에 존재할 수 있는 비특이 흡착 물질들을 제거하기 위하여 0.01M KIO₄를 0.3 ml 씩 0.1 ml 혈청에 넣고, 15분간 실온에 정치시킨 후 1% glycerol-saline 용액 0.3 ml, PBS 0.3 ml 및 50% chicken RBC 0.1 ml를 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 반응을 실시하였으며, 닭 적혈구는 원심분리로 제거하였다. 이 시험은 96 구멍 U자형 마이크로 플레이트에서 0.5% 닭 적혈구를 사용하여 실시하였다. 25 µl PBS를 플레이트에 첨가한 후, 첫 구멍에 전 처리된 50 µl의 혈청을 넣어 2배 희석을 한 후

25 μ의 바이러스를 8 혈구응집단위로 역가를 조절하여 플레이트에 첨가하였다. 혈청과 바이러스 희석액을 잘 섞은 후 플레이트를 30분 동안 실온에서 반응시키고, 0.5% 닭 적혈구를 첨가하였다. 바이러스나 혈청 및 바이러스 혼합액이 전혀 가해지지 않은 대조군의 닭 적혈구가 완전히 가라앉았을 때를 기준으로 결과를 판독하였다.

결 과

폐렴의 병리조직학적 분류

돼지 폐장에 대한 병리조직학적 검사 결과, 90두 중 72두에서 폐렴이 관찰되어 80%의 발생률을 나타내었다. 폐렴의 유형별로는 기관지간질성 폐렴이 34두 (37.8%)로 가장 많았고, 간질성 폐렴은 27두, 화농성 기관지 폐렴은 8두, 섬유소성 폐렴은 3두로 분류하였다.

폐장의 SIV 항원 분포

면역조직화학적 검사에 의한 폐장내 SIV 항원은 90두 중 51두에서 검출되어 56.6%의 양성률을 나타내었다. SIV 항원은 대부분 기관지와 세기관지 상피세포의 세포질에서 광범위하게 분포하였다(Fig. 1). 일부 예에서는 폐포벽, 폐포강 및 세기관지 강내에 침윤된 큰포식세포에서도 과립상의 항원을 검출할 수 있었다.

SIV의 항체 분포

혈청 검사 결과 56두 중 26두가 양성을 나타내어 46.4%의 항체 양성율을 나타내고 있었다. 바이러스의 아형별로 H1N1에 대한 항체만 검출된 경우는 5.3%(3두), H3N2에 대한 항체만 검출된 경우가 28.6%(16두) 및 두 가지 모두 검출된 경우는 12.5%(7두)로 확인되었다.

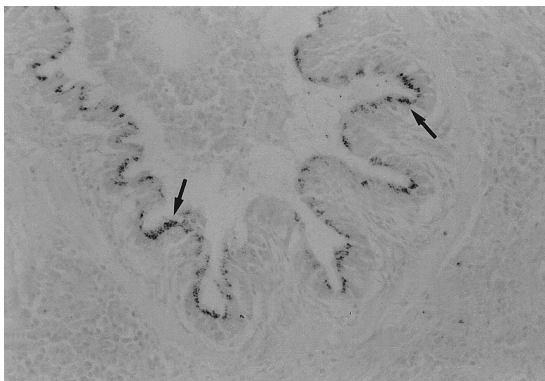


Fig. 1. Pig's lung. Swine influenza viral antigens (arrows) were lined in the cytoplasm of bronchial epithelial cells. Avidin-Biotin Complex, ×200.

SIV 감염 예의 특성

(1) SIV 항원 양성 예의 병리조직학적 소견

항원 양성 돼지 51두에서 병리조직학적 폐렴 병변은 주로 전복측엽에서 관찰되었다. 폐포벽은 제 2형 폐포 상피세포의 증식, 림프구 및 단핵세포의 침윤으로 비후되어 있었으며, 일부 폐포강내에는 염증세포와 탈락상피들이 침윤되어 있었다. 기관지와 세기관지의 강내에는 미만성으로 림프구, 단핵세포, 다형핵 백혈구 및 탈락된 상피세포로 구성된 삼출물로 채워져 있었으며 세기관지 상피세포는 변성, 괴사 및 탈락되어 입방화 또는 편평화되어 있었다(Fig. 2).

괴사성 기관지염 또는 세기관지염은 총 28두(31.1%)에서 관찰되었다. 병리조직학적으로 괴사성 기관지염의 발생과 SIV 항원의 발현 빈도를 살펴 본 결과 괴사성 기관지염과 항원이 모두 양성인 예는 22두(24.4%), 괴사성 기관지염은 있으나 항원이 음성인 예는 6두(6.7%), 항원은 양성이나 기관지염이 없는 예는 29두(32.2%)로 나타났다(Table 1).

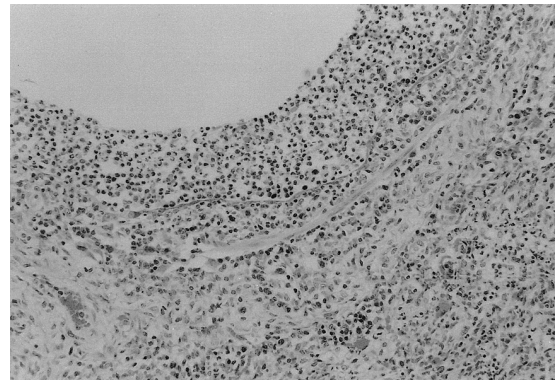


Fig. 2. Pig's lung. There were necrotic bronchitis characterized by degeneration, necrosis, and exfoliation of epithelial cells with lots of inflammatory cell infiltration in endo- and peribronchial area. H&E. ×200.

Table 1. Incidence of necrotizing bronchitis/bronchiolitis and swine influenza viral antigens in the lungs of pigs

NEB ^{a)}	IHC ^{b)}	No. of pigs examined
-	-	33 (36.7) ^{c)}
+	-	6 (6.7)
-	+	29 (32.2)
+	+	22 (24.4)
Total		90

^{a)}NEB : Necrotizing bronchitis/bronchiolitis.

^{b)}IHC : Immunohistochemistry.

^{c)}No. of pigs (%).

Table 2. Relation between the incidence of swine influenza viral antigens in pulmonary lesions and seropositivities to swine influenza virus in pigs

HI ^{a)}	IHC ^{b)}	No. of pigs with different age groups		
		<30 days	30-120 days	Total
-	-	3 (11.1) ^{c)}	7 (24.1)	10 (17.9)
-	+	13 (48.1)	7 (24.1)	20 (35.7)
+	-	4 (14.8)	4 (13.8)	8 (14.3)
+	+	7 (26.0)	11 (38.0)	18 (32.1)
Total		27	29	56

^{a)}HI : Haemagglutination inhibition test.

^{b)}IHC : Immunohistochemistry.

^{c)}No. of pigs (%).

(2) SIV 항원과 항체의 분포 비교

돼지 개체별로 항원 및 항체의 양성 여부를 조사한 결과, 전체 56두 중 항원과 항체 모두 양성인 예는 18두(32.1%), 항체만 양성인 예는 8두(14.3%), 항원만 양성인 예는 20두(35.7%), 항원 및 항체 모두 음성인 예는 10두(17.9%)에서 관찰되었다(Table 2).

고 찰

돼지가 SIV에 감염되면 1% 미만의 폐사율을 나타내지만, 100%에 가까운 이환율을 보인다 [10]. 임상증상은 모든 일령의 돼지에서 거의 동시에 나타나며, 경과가 매우 짧은 것이 특징이다. 세균이나 다른 바이러스가 혼합 감염되지 않은 경우 2~6일 동안 다양한 임상경과를 보이다가 빠르게 회복된다. 그러나 폐렴으로 진행되면 임상경과는 더욱 길어지고, 기타 2차적인 세균 감염이 용이해져서 때로 폐사에 이르기까지도 한다[10].

본 연구에서 질병진단 의뢰된 돼지에서 폐렴 발생 정도와 폐렴의 병리조직학적 유형을 검사한 결과 총 90두 중 72두(80%)에서 폐렴 소견을 나타내고 있었으며, 기관지간질성 폐렴 및 간질성 폐렴의 비율이 68% 정도를 차지하고 있어 화농성 기관지 폐렴 또는 섬유소성 폐렴에 비하여 월등히 많았다. 따라서 제주도에서는 포유기에서 육성기까지의 돼지에서 간질성 폐렴을 유발할 수 있는 병원체가 돼지 호흡기 질병에 많은 영향을 주고 있음을 시사하고 있었다.

돼지에서 SIV 감염 시 특징적인 병리조직학적 병변은 괴사성 또는 증식성 괴사성 기관지염 및 세기관지염을 나타내는 것으로 알려져 있다 [9, 11, 18]. 이 연구에서 폐렴 소견이 있는 돼지에서 괴사성 기관지염의 발생 정도를 살펴본 바 28두(39%)에서 관찰되어 SIV 감염과의 상관성이 있음을 강하게 추정할 수 있었다. 또한 편

역조직화학염색 기법을 이용하여 전 두수의 폐장에서 SIV 항원의 출현 정도를 검사한 결과 51두(56.6%)가 양성 반응을 나타내어 매우 높은 SIV 감염을 확인하였다. 특히 30일령 이하의 포유기 자돈 27두 중 20두(74.0%)가 양성 반응을 보였으며, 이는 SIV가 제주도에서 포유 시기에 가장 흔하게 감염되는 병원체로 작용하고 있었다. 괴사성 기관지염이 관찰된 예 중 22두는 SIV 항원을 가지고 있었으나 6두에서는 항원이 검출되지 않았다. 따라서 제주도에서는 SIV 감염으로 기관지 또는 세기관지의 상피세포의 괴사를 유발하고 점액분비 세포와 섬모의 손상이 동반되어 다른 바이러스 또는 이차적인 세균 감염을 용이하게 하며 궁극적으로 돼지호흡기복합증후군과 같은 호흡기 질병을 증폭시키는 인자로 작용할 가능성이 크다고 판단되었다 [4]. 기타 항원 양성 예 중 괴사성 기관지염이 관찰되지 않은 경우는 병변이 형성되기 이전의 초기 감염 상태로 추정되었다. 그러나 SIV 항원이 없으나 괴사성 기관지염을 나타내는 예도 있으므로 기타 다른 병원체에 대한 종합적인 검사가 있어야 할 것으로 사료된다.

본 연구에서 SIV 항원 양성으로 나타난 폐장의 병리조직학적 소견은 주로 기관지와 세기관지 강 내에 림프구, 단핵세포, 다핵핵 백혈구 및 탈락된 상피세포로 구성된 삼출물이 침윤되어 있었으며, 세기관지 상피세포는 변성 및 괴사되는 양상을 나타내어 Gian과 Norman [11]의 보고와 대체로 일치하였다.

국내에서 류와 김 [1]은 다양한 연령의 돼지를 대상으로 제주도 지역을 제외한 전국적인 규모로 SIV에 대한 혈청검사를 수행하여 평균 59%의 항체 양성율을 보였으며, H1N1과 H3N2 두 가지 아형에 대한 항체를 모두 가지고 있음을 보고하였다. 또한 제주도에 도축돼지를 대상으로 SIV항체 검사를 실시한 바 H1N1 및 H3N2 항체 양성율은 각각 47% 및 78.3%로 조사되었다 [2]. 이 연구에서 부검 의뢰된 120일령 이하의 돼지에 대하여 SIV 항체검사를 실시한 결과 양성율은 46.4%로 확인되었으며, 바이러스 아형별로는 H1N1이 5.3%, H3N2가 28.6%이었고, 두 가지 항체를 모두 가지고 있는 경우는 12.5%로 나타났다. 따라서 제주도에 SIV의 두 가지 아형이 모두 발생하고 있으며 H1N1에 비하여 H3N2의 감염이 더욱 빈발하고 있음을 간접적으로 확인할 수 있었다. 따라서 제주도의 다른 지역의 평균 항체 양성율과는 큰 차이가 없었다. 그러나 제주도에 도축된 돼지에 비하여 이 실험에서의 양성율이 다소 낮게 나타난 것은 검사한 개체의 연령이 120일 이하로 비교적 어리기 때문에 상대적으로 바이러스에 노출될 기회가 적었던 것으로 판단되었다.

본 연구를 통하여 SIV항원을 검출하기 위한 진단 기

법으로 면역조직화학염색 기법이 매우 유용함이 확인되었고, 제주도에서는 SIV가 돼지 호흡기 질병에 많이 관여하고 있을 뿐만 아니라 비교적 어린 연령에서부터 감염이 이루어지고 있음을 입증할 수 있었다. 따라서 돼지 농장에서 본 질병의 감염을 차단하기 위한 농장 내 차단 방역, 돈사 내 철저한 위생관리, all-in all-out 실시 등의 종합적인 방제 대책이 강화되어야 하리라 판단되었다.

결 론

제주 지역에서 1997~1999년 사이 제주대학교 병리학 교실에 질병 진단 의뢰된 120일령 이하의 돼지 90두를 대상으로 병리조직학적 검사, 면역조직화학염색 및 혈청 검사를 실시하였다.

병리조직학적 검사 결과 72두에서 폐렴이 관찰되어 79.8%의 발생률을 나타내었고 기관지간질성 폐렴이 가장 많이 관찰되었다. SIV 항원을 검출하기 위한 면역조직화학적 검사 시 56.6%의 높은 양성율을 나타내었으며, 항원은 기관지와 세기관지 상피세포의 세포질에서 주로 관찰되었다. 괴사성 기관지염 또는 세기관지염은 총 28두(31.1%)에서 관찰되었고 이 중 22두에서 SIV 항원을 검출할 수 있었다. SIV에 대한 혈청 검사 결과 양성율은 46.4%로 확인되었으며, 바이러스 아형별로는 H1N1이 5.3%, H3N2가 28.6%, 두 가지 항체를 모두 가지고 있는 경우는 12.5%로 나타났다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, 제주도에서 SIV가 돼지 폐렴의 중요한 원인으로 작용하고 있음을 알 수 있었다. 또한 돼지 폐장에서 면역조직화학염색 기법은 SIV 항원검출을 위한 유용한 진단 기법으로 사료된다.

참고문헌

1. 류영수, 김로미. 돼지 인플루엔자 바이러스의 혈청학적 역학조사 및 유전학적 분석. 대한수의학회지. 1998, **38**, 53-63.
2. 류영수, 박취규, 김로미, 이창희, 최상호, 김성일, 배종희. 제주지역에 대한 돼지 주요 전염병의 혈청학적 역학조사. 대한수의학회지. 1997, **37**, 756-772.
3. Barigazzi, G., Foni, E., Candotti, P. and Cataldi, M. Antigenic analysis of swine influenza viruses isolated in Italy from 1976 to 1995. p. 100, in Proceedings, The 14th IPVS Congress, Bologna, Italy. 1996.
4. Brown, I. H., Done, S. H., Spencer, Y. I., Cooley, W. A., Harris, P. A. and Alexander D. J. Pathogenicity of a swine influenza H1N1 virus antigenically distinguishable from classical and European strains. Vet. Record. 1993a, **132**, 598-602.
5. Brown, I. H., Harris, P. A. and Alexander, D. J. Serological studies of influenza viruses in pigs in Great Britain 1991-2. Epidemiol. Infect. 1995, **114**, 511-520.
6. Brown, I. H., Manvell, R. J., Alexander, D. J., Chakraverty, P., Hinshaw, V. S. and Webster, R. G. Swine influenza outbreaks in England due to a new H1N1 virus. Vet. Record. 1993b, **132**, 461-462.
7. Brown, T. T., Mengeling, W. L., Paul, P. S. and Pirtle, E. C. Porcine fetuses with pulmonary hypoplasia resulting from experimental swine influenza virus infection. Vet. Pathology. 1980, **17**, 455-468.
8. Christensen, G., Sorensen, V. and Mousing, J. (ed), Disease of swine. pp. 913-940, 8th ed. Iowa state university press. Ames, 1999.
9. Dea, S., Bilodeau, R., Sauvgeau, R., Montpetit, C. and Martineau, G. P. Antigenic variant of swine influenza virus causing proliferative and necrotizing pneumonia in pigs. J. Vet. Diagn. Invest. 1992, **4**, 380-392.
10. Easterday, B. C and Van Reeth, K. (ed), Disease of swine, 8th ed., Iowa state university press. Ames, 1999, pp. 277-290.
11. Gian, C. W. and Norman, F. C. Ultrastructural morphometric investigation of early lesions in the pulmonary alveolar region of pigs during experimental swine influenza infection. Am. J. Pathol. 1986, **122**, 541-552.
12. Ito, T., Kawaoka, Y., Vines, A., Ishikawa, H., Asai, T. and Kida, H. Continued circulation of reassortant H1N2 influenza viruses in pigs in Japan. Arch. Virol. 1998, **143**, 1773-1782.
13. Jubb, K. V. F., Kennedy, P. C. and Palmer, N. (ed), Pathology of domestic animals. 4th. ed., Vol. 2, Academic press, Inc. San Diego, 1997, 539-699.
14. Kay, R. M., Done, S. H. and Paton, D. J. Effect of sequential porcine reproductive and respiratory syndrome and swine influenza on the growth and performance of finishing pigs. Vet. Record. 1994, **135**, 199-204.
15. Lanza, I., Brown, I. H. and Paton, D. J. Pathogenicity of concurrent infection of pigs with porcine respiratory coronavirus and swine influenza virus. Res. Vet. Sci. 1992, **53**, 309-314.
16. Lee, B. W., Bey, R. F., Baarsch, M. J. and Larson, M. E. Class specific response to influenza A H1N1 infection in swine. Vet. Microbiology. 1995, **43**, 241-250.
17. Lee, B. W., Bey, R. F., Baarsch, M. J., Morrison, R.

- B. and Freese, W.** Determination of hemagglutination inhibition titers to influenza A virus in porcine sera by use of an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.* 1993, **54**, 1270-1276.
18. **Morin, M., Girad, C., Eiazhary, Y., Fajardo, R., Drolet, R. and Lagace, A.** Severe proliferative and necrotizing pneumonia in pigs: A newly recognized disease. *Can. Vet. J.* 1990, **31**, 837-839.
19. **Murphy, B. R and Webster, R. G.** (ed), Influenza viruses. In *Fields Virology*. 2nd ed. Raven Press, New York, 1990, 1091-1154.
20. **Pol, J. M. A., Van Leengoed, L. A. M. G., Stockhope, N., Kok, G. and Wensvoort, G.** Dual infections of PRRSV/influenza or PRRSV/*Actinobacillus pleuropneumoniae* in the respiratory tract. *Vet. Microbiology*. 1997, **55**, 259-264.
21. **Renee, L., Rene, S. and Ronald, M.** Immunohistochemical detection of swine influenza virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia cases from Quebec. *Can. Vet. J.* 1994, **35**, 513-515.
22. **Schorr, E., Wentworth, D. and Hinshaw, V. S.** Use of polymerase chain reaction to detect swine influenza virus in nasal swab specimens. *Am. J. Vet. Res.* 1994, **55**, 952-956.
23. **Stech, J., Xiong, X., Scholtissek, C. and Webster, R. G.** Independence of evolutionary and mutational rates after transmission of avian influenza viruses to swine. *J. Virology*. 1999, **73**, 1878-1884.
24. **Yewdell, J. W., Frank, E. and Gerhard, W.** Expression of influenza A virus internal antigens on the surface of infected P815 cells. *J. Immunology*. 1981, **126**, 1814-1819.