

## 산란계 밀집지역에서 혈구응집억제반응과 효소면역측정법을 이용한 가금인플루엔자 혈중항체가 비교 조사

이정원<sup>1</sup>, 엄성심, 이성재, 서이원, 서석열, 정동석, 송희종\*

전라북도축산진흥연구소, 전북대학교 생체안전성연구소\*

(접수 2004. 1. 8, 게재승인 2004. 3. 15)

## Comparative study on avian influenza virus antibody titer by hemagglutination inhibition test and enzyme-linked immunosorbent assay in the mass zone layer

Jeoung-Won Lee<sup>1</sup>, Sung-Shim Eun, Sung-Jae Lee, Lee-Won Seo, Surk-Yul Seo, Dong-Suk Joung, Hee-Jong Song\*

<sup>1</sup>Jeonbuk Livestock Development & Research Institute, Jeonju, 560-243. Korea  
\*Bio-Safety Research Institute, Chonbuk National University, Jeonju, 561-756. Korea  
(Received 8 January 2004, accepted in revised from 15 March 2004)

### Abstract

This study was conducted to investigate the similarity between hemagglutination inhibition (HI) test and enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), the HI titer and mean ratio S/P ratio) of avian influenza virus. To perform this study, the 1,457 sera of layers 21 farms in May, July and September, respectively. As a result of HI test, positive rates were 480 to 422 (92.1%) in May, 494 to 394(79.8%) in July and 483 to 402(83.2%) in September, and the mean antibody titer were 4.6, 4.3, 4.0 to 0.3 decreased, respectively. The positive rates by ELISA, 480 to 475(99.0%) in May, 494 to 485(98.2%) in July, 483 to 472(97.7%) in September, and the mean S/P ratio were 2.319, 2.557 and 2.380, respectively. The result of HI test and ELISA positive 480 to 422(92.1%), 475(99.0%), 494 to 394(79.8%), 485(98.2%) and 483 to 402(83.2%), 472(97.7%). Therefore, ELISA was shown more sensitive compare the HI titers.

Key words : Avian influenza virus, Layer, HI test, ELISA

---

<sup>1</sup>Corresponding author

Phone : +82-63-220-6500, Fax : +82-63-220-6511

E-mail : leejeoungwon@hanmail.net

## 서 론

인플루엔자는 사람, 돼지 등 포유류 및 가금류에 감염되어 동물에서의 경제적 손실뿐만 아니라 공중보건위생에도 중요한 영향을 미치고 있으며, 사람에서 발생은 스페인에서 1918-1919년에 H1N1형, 1957년 Asian에서 H2N2형, 1968년 홍콩에서 H3N2형, 1977년 러시아에서 H1N1형이 대유행 하였다<sup>1,2)</sup>.

인플루엔자 바이러스 형은 nucleoprotein (NP)과 바이러스입자의 35-45%를 차지하는 matrix(M1) protein의 항원성에 따라 A, B, C형으로 구분되며 사람에서는 A, B, C 형 모두 병원성이 있으나 동물에서는 A형만이 질병을 일으킨다<sup>2-5)</sup>.

가금 인플루엔자 바이러스(avian influenza virus, AIV)는 8개의 RNA 분절로 구성되어 있으며 15종의 HA와 9종의 NA가 있어 135종의 혈청형으로 나누어지고 사람에서는 H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H9N2 혈청형이 감염을 일으킨다<sup>5-10)</sup>.

사람에서 발생된 H1N1형은 1979년 오리에서 돼지로, H3N2형은 사람에서 돼지로 감염된 예도 있으며, H7N7형도 오리를 취급하는 사람에서 결막염을 일으켰다<sup>2)</sup>.

최초의 AIV는 1878년 이탈리아에서 발생되었으며 고병원성 가금인플루엔자는 1959년 스코틀랜드를 시작으로 H5N1, H7N3, H5N9, H7N7, H5N2, H5N8, H7N1, H7N4형이 닭 및 칠면조 등에서 발생되었다<sup>2,5,11)</sup>. 1983년 미국 펜실베이니아와 버지니아주에서 H5N2형이 발생되어 천5백-천7백만 마리가 살처분되었으며 근절사업에 5-6천만 달러가 투자되었다고 한다<sup>12,13)</sup>. 1997년 홍콩에서는 70%이상의 폐사율을 보인 3개 닭 농장에서 AIV가 발생되었으며 동일한 혈청형(H5N1)이 사람에게 감염되어 6명이 사망하였다는 보고<sup>14-19)</sup>와 H9N2형은 홍콩, 중국남부, 유라시아에서도 조류와 사람에도 분리되었다<sup>20-25)</sup>. 이후 AIV에 중요성이 강조되면서 더 많은 연구가 진행되고 있으며<sup>26-29)</sup> 최근 언론에서는 네덜란

드(H7N7)에서 조류독감으로 수의사가 사망하였다고 보도되었다.

가금에서의 주요 임상증상은 산란저하, 0-100%의 폐사 등 다양하게 나타나며 동일한 혈청형이라도 감염숙주인 닭, 칠면조, 오리, 메추리 등에서 임상증상이 각각 다르게 나타난다<sup>5,30-32)</sup>. AIV의 감염경로는 현재까지 난계대를 통하여 전파되지 않는 것으로 알려져 있으나 일반 바이러스와 같이 비말, 공기, 물 등에 의해 전파될 수 있으며, 가장 중요한 것은 분변의 직접접촉 즉, 농장출입자의 신발, 사료운반차량, 기구, 계란표면의 분변 등이며, 분변 1g에 약  $10^6$  EID<sub>50</sub>의 바이러스가 존재하기 때문에 농장내의 소독 및 차단방역이 매우 중요하다.

본 실험 산란계 밀집지역에서 1999년에 최초로 발생되어 20%의 폐사와 34%의 산란율 감소를 보인 후 2000년에도 2개 농가에서 발생되어 양계농가에 커다란 피해를 주었으며 이제는 상재성 질병으로 대부분의 양계농가에서 발생하는 것으로 판단되어 가금인플루엔자 바이러스에 대한 혈청 항체가 변동 추이를 HI 및 ELISA로 비교 조사하여 질병방역 및 예방을 위한 기초자료로 제시하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 공시재료

전북 축산진흥연구소 관내의 산란계 밀집 지역에서 농장 간 20-50m의 거리에 위치한 21농가를 선정한 후 2003년 5월, 7월, 9월에 3회에 걸쳐 계군별로 20-30여수를 채혈하여 실온에서 혈액을 응고시킨 다음, 원심분리(2,000rpm, 10 min)하여 혈청을 분리한 후 56℃, 30분간 비동화시켜 공시 재료로 사용하였다.

### 혈청학적 검사

혈구응집억제반응(hemagglutination inhibition, HI test) : 혈구응집반응을 실시하

## 결 과

여 항원의 역가를 판독하고 가검혈청의 항체가  
는 U-bottomed microplate (96well)을 사용하  
여 혈구응집억제 반응법으로 검사하였으며, 항  
원농도는 4 HA units, 닭적혈구는 1% 부유액,  
항원과 혈청의 희석은 PBS로 실시하였으며 HI  
역가는 log<sub>2</sub> 값으로 산출한 다음 2이상을 양성  
으로 판정하였다<sup>7)</sup>.

**효소면역측정법(ELISA) :** ELISA 진단키트  
는 IDEXX (USA)사의 제품을 사용하였다.  
요약하면 우선 가검혈청을 혈청희석액에 1:  
500으로 희석한 다음 코팅된 Plate에 가검혈  
청, 음성 및 양성 대조군을 100 $\mu$ l씩 각 Well  
에 분주하고 30분 동안 실온에 정치한 후  
350 $\mu$ l의 세척액으로 4회 세척하고 100 $\mu$ l의  
HRPO conjugate을 각 Well에 분주한 다음  
실온에 30분간 방치한다. 이후 350 $\mu$ l의 세척  
액으로 4회 다시 세척하고 100 $\mu$ l의 TMB  
substrate를 각 well에 분주한 다음 15분간  
실온에 방치한 후 100 $\mu$ l의 Stop 용액을 넣어  
흡광도 650nm에서 ELISA reader로 측정하였  
으며 가검혈청에 대한 S/P Ratio는 [가검혈  
청-음성대조 평균흡광도] / [양성대조 평균  
흡광도-음성대조 평균흡광도]로 하였으며 음  
성은 S/P Ratio 값이 0.5이하, 0.5이상을 양  
성으로 판정하였다.

### 혈구응집억제 항체가

가검혈청을 혈구응집억제 반응으로 21농가  
23계군 1,457수에 대한 5월 검사 결과 480수  
중 양성이 422(92.1%)수, 평균 HI titer는 4.6이  
었으며 7월에는 494수 양성이 394(79.8%) HI  
titer는 평균 4.3, 9월은 483수 중 402(85%)수가  
양성이었으며 HI titer는 4.0의 결과를 보였다.  
총 검사결과 1,457수 중 1,238수(85%)에서 양  
성이었고 평균 HI titer는 4.3으로 나타났다  
(Table 1).

### ELISA 항체가

21농가 23계군에 대한 5월 검사 결과는 480  
수 중 양성이 475(99.0%)수, 평균 S/P ratio는  
2.319 7월에는 494수 중 양성이 485 (98.2%)수,  
평균 S/P ratio는 2.557, 9월은 483수 중  
472(97.7%)수, 평균 S/P ratio는 2.380를 보였  
으며 총 검사결과는 1,457수 중 1,432수(98.3%)  
에서 양성이었으며, 평균 S/P ratio는 2.419로  
나타났다(Table 2).

### HI 및 ELISA 대한 월별 항체가 비교

5월의 HI 및 ELISA 검사 결과는 480수 중

Table 1. The results of HI test to avian influenza virus

Month	No of tested	No of positive	No of negative	Mean HI titer
May	480	442 (92.1%)	38 ( 7.9%)	4.6
July	494	394 (79.8%)	100 (20.2%)	4.3
September	483	402 (83.2%)	81 (16.8%)	4.0
Total	1,457	1,238 (85,0%)	219 (15,0%)	4.3

Table 2. The results of ELISA to avian influenza virus

Month	No of tested	No of positive	No of negative	Mean S/P ratio
May	480	475 (99.0%)	5 (1.0%)	2.319
July	494	485 (98.2%)	9 (1.8%)	2.557
September	483	472 (97.7%)	11 (2.3%)	2.380
Total	1,457	1,432(98.3%)	25(1.7%)	2.419

Table 3. The results of HI titer and ELISA to avian influenza virus

Month	No of tested	No of positive		Mean HI titer	Mean S/P ratio
		HI	ELISA		
May	480	442(92.1%)	475(99.0%)	4.6	2.319
July	494	394(79.8%)	485(98.2%)	4.3	2.557
September	483	402(83.2%)	472(97.7%)	4.0	2.380
Total	1,457	1,238(85.0%)	1,432(98.3%)	4.3	2.419

양성수는 각각 422 (92.1%), 475 (99.0%), 7월은 494수 중 각각 394 (79.8%), 485 (98.2%), 9월은 483수 중 402 (83.2%), 472 (99.7%)의 결과를 보였으며 총검사수 1,457수 중 HI는 1,238 (85%), ELISA는 1,432 (98.3%)의 결과를 보였다 (Table 3).

### 고 찰

IMF 이후 경제침체로 양계관련 생산물의 소비가 둔화되어 양계농가의 어려움이 지속되고 있는 가운데 육계 및 계란 값의 회복이 늦어지고 고질적인 질병으로 인한 피해는 늘어만 가고 실정이다.

국내에서는 1996년 처음으로 저병원성 AIV가 경기도 화성, 전북 정읍, 경북 영천의 종계장에서 발생되어 살처분 되었으며 1997년 국내 분리주 (H9N2)에 대한 연구 결과를 국제가금인플루엔자 심포지움에 발표하였고<sup>25,30</sup>, 국내 분리주에 대한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다<sup>7,34</sup>. 그 후 2년 동안 발생이 감소하였으나 1999년에 재발되어 전국적으로 확산되는 추세에 있으며 대부분 종계 및 산란계에서 약간의 폐사, 산란율저하, 난각의 이상으로 계란의 품질에 영향을 미치고 있는 것으로 확인되고 있으나 언제든지 변이주의 출현으로 양계농가에 커다란 피해를 줄 수 있을 뿐만 아니라 국제무역의 걸림돌이 될지 모른다.

미국에서도 1983년 봄 펜실바니아주에서 동일혈청형 (H5N2)이 산란계농장에서 발생하였으나 병원성이 높지 않은 것으로 판정되어 살처분을 실시하지 않고 감시만하다가 10월에 갑

자기 30%의 폐사와 급격한 산란율 감소로 병원성이 높아져 양성계군에 대해서 살처분한 예가 있다<sup>12,13</sup>.

AIV의 신속한 진단법에는 원인체의 분리 동정과 혈청학적 검사방법이 이용되고 있으며 혈청학적 검사 방법에는 한천겔침강법(AGP)과, 혈구응집억제(HI)반응 그리고 간접효소면역측정법(ELISA) 등이 있다<sup>35-37</sup>. AGP반응은 공통항원인 NP와 M단백질 항체가 검출 되고, HI는 하나의 특정항체만 검출이 이루어지며, ELISA는 어떤 항원을 사용하느냐에 따라 다르게 검출될 수 있는데 시판되는 Idexx(USA) 진단키트는 16종의 혈청형을 검출할 수 있으나 Fatunmbi 등의 보고<sup>38</sup>)에 의하면 ELISA 검사에서 혈청형 중 가장 많은 교차반응을 보인 혈청형이 H9이라고 하였다.

본 실험에 있어서 HI 및 ELISA 검사 결과 5월에는 총 검사수 480수 중 442(92.1%), ELISA는 475 (99.0%)수로 ELISA 결과가 6.9% 높았고 7월에 채혈한 총 494수 중 HI에서는 394(79.8%)수, ELISA는 485(98.2%)수로 18.4%가 높았으며 9월은 483수 중 HI는 402(83.2%)수, ELISA에서는 472(97.7%)수로 14.5% 높게 나타났다. 또한, HI검사 결과 21농가 23계군 중 5월과 7월에는 음성계군이 1농가 1계군으로 확인되었으나 9월에는 19수 검사 중 3수가 양성으로 확인되었다. 그러나 ELISA검사에서는 5월 7월 모두 양성계군으로 확인되어 HI검사와는 상이한 결과를 보이기도 했다.

이 결과로 미루어 HI검사에서는 H9N2형 단일항체만 측정할 수 있고, ELISA에서는 16종 혈청형(H7N2, H1N7, H7N3, H13N6, H5N9,

H11N6, H3N8, H9N2, H5N2, H4N8, H10N7, H2N9, H8N4, H14N5, H6N5, H12N5)이 검출되도록 다양한 혈청형이 포함되어 HI보다 높은 결과를 보인 것인지, H9혈청형이 ELISA에서 교차반응을 높게 일으켜 나타난 것인지, 아니면 H9N2형의 변이가 이루어지고 있는지에 대해서는 더 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

본 실험에 있어서 대상농가 대부분의 경우 AIV 감염시기는 주로 초가을부터 이듬해 봄까지이었으며, 임상증상은 대부분 약간의 폐사를 동반한 산란율감소와 난각의 이상을 가져오는 것으로 조사되었다. 또한, 양성계군에 대한 바이러스 검출을 위해서 국립수의과학검역원에 분변, 조직 등을 의뢰하였으나 검출 되지 않았는데 이는 국내분리주의 감염접종 시험결과 기관과 분변에서 3일부터 바이러스가 검출되었으나 기관에서는 7일, 분변에서는 9일 후에는 검출 되지 않았다는 점을 감안하면 야외에서 바이러스 검출을 위해서는 감염초기(3-9일)의 샘플을 채취하여야 할 것으로 사료되며, AIV의 변이에 대한 지속적인 모니터링과 국가적인 방역체계가 확립되어야 할 것으로 사료된다.

## 결 론

산란계 밀집지역에서 가금인플루엔자 항체가 변동 사항을 알아보고자 5, 7, 9월 중에 3회 채혈하여 HI 및 ELISA검사한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

HI 검사 결과는 각각 480수 중 422(92.1%), 494수 중 394(79.8%), 483수 중 402(83.2%)수가 양성이었으며 HI titer는 각각 4.6, 4.3, 4.0으로 0.3씩 감소되는 경향이었으며, 동일 시료에 대한 ELISA 검사 결과는 각각 480수 중 475(99.0%), 494수 중 485(98.2%), 483수 중 472(97.7%)수가 양성이었으며 평균 S/P ratio는 각각 2.319, 2.557, 2.380의 결과를 보였다.

HI 및 ELISA 검사 결과는 각각 480수중 422(92.1%), 475(99.0%), 494수중 394(79.8%), 485(98.2%), 483수중 402(83.2%), 472(97.7%) 수가 양성으로 ELISA에 의한 검출율이 각각 6.9%, 18.4%, 14.5% 높게 나타났다.

이상의 결과에서 가금인플루엔자의 HI 항체가 가는 시간의 흐름에 따라 약간 감소하는 경향이었으나 ELISA에서는 커다란 변화가 없으며, ELISA 검사결과가 높게 나타난 것은 판매되는 진단키트의 경우 다양한 혈청형을 검출할 수 있기 때문으로 사료된다. 한편, H9N2형 이외의 고병원성 바이러스주의 검색에 대한 지속적인 모니터링과 감시가 철저히 이루어져야 할 것이며 장기적인 국가차원의 근절 대책을 확립하여야 할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Gorman OT, Bean WJ, Kawaoka Y, et al. 1991. Evolution of influenza A virus nucleoprotein genes: Implications for the origins of H1N1 human and classical swine viruses. *J Virol* 65: 3704~3714.
2. Horimoto T, Kaswaoka Y. 2001. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. *Clin Microbiol Rev* 14(1) : 129~149.
3. Rohm C, Zhou N, Suss J, et al. 1996. Characterization of a novel influenza hamegglutinin, H15 : Criteria for determination of influenza A subtypes. *Virology* 217: 508~516.
4. Schild GC, Oxford JS, Newman RW. 1981. Evidence for antigenic variation in influenza A nucleoprotein. *Virology* 93: 569~573.
5. Easterday BC, Hinshaw SV, Halvorson DA. 1997. Influenza. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, et al. ed. *Diseases of poultry*, 10th ed, Iowa State University Press, Ames, Iowa: 583~605.
6. Alexander DJ. 2000. A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol* 74: 3~13.
7. 한명국, 박경윤, 권용국 등. 2002. 가금인플루엔자 바이러스 항체검출을 위한 혈청학적 진단 비교법. *대한수의학회지* 42(1): 7

- 3~80.
8. Zhou NN, Shortridge KF, Class ECJ. et al. 1999. Rapid evolution of H5N1 influenza viruses in chickens in Hong Kong. *J Virol* 73(4): 3366~3374.
  9. Tumpey TM, Suarez DL, Perkins LEL. et al. 2002. Characterization of a highly pathogenic H5N1. A virus isolated from duck meat. *J Virol* 76(12): 6344~6355.
  10. Dybing JK, Schultz-Cherry S, Swayne DE. et al. 2000. Distinct pathogenesis of Hong Kong-origin H5N1 viruses in mice compared to that of other highly pathogenic H5 avian influenza viruses. *J Virol* 74(3): 1443~1450.
  11. Donaelli I, Campitelli L, Trani LD. et al. 2001. Characterization of H5N2 influenza viruses from Italian poultry. *J Gen Virol* 82(3): 623~630.
  12. Kawaoka Y, Naweww CW, Webster RG. 1984. Is virulence of H5N2 influenza viruses in chickens associated with loss of carbohydrate from the hemagglutinin? *Virology* 139: 303~316.
  13. Bean WJ, Kawaoka Y, Wood JM, et al. 1985. Characterization of virulent and avirulent A/chicken/Pennsylvania/83 influenza A viruses: Potential role of defective interfering RNAs in nature. *J Virol* 54: 151~160.
  14. Govorkova EA, Leneva IA, Goloubeva OG, et al. 2001. Comparisons of efficacies of RWJ270201, Zanamivir, and Oseltamivir against H5N1, H9N2, and other avian influenza viruses. *Antimicrobial Chemother* 45(10): 2723~2732.
  15. Guan Y, Shortridge KF, Krauss S. et al. 1999. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: Were they the donors of the "internal" genes of H5N1 viruses in Hong Kong?. *Microbiology* 96(16): 363~9367.
  16. Xiuhua Lu, Mary Renshaw, Terrence M. Tumpey et al. 2001. Immunity to influenza A H9N2 viruses induced by infection and vaccination. *J Virol* 75(10): 4896~4901.
  17. Hoffmann E, Stech J, Leneva I. et al. 2000. Characterization of the influenza A virus gene pool in avian species in Southern China: Was H5N1 a derivative or a precursor of H5N1?. *J Virol* 74(14): 6309~6315.
  18. Suarez DL, Perdue ML, Cox N. et al. 1998. Comparisons of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from Hong Kong. *J Virol* 72(8): 6678~6688.
  19. Angela N. Cauthen, DE. Swayne, SSC, et al. 2000. Continued circulation in China of highly pathogenic avian influenza viruses encoding the hemagglutinin gene associated with the 1997 H5N1 outbreak in poultry and humans. *J Virol* 74(14): 6592~6599.
  20. Gue YJ, Li JG, Cheng XW et al. 1999. Discovery of men infected by avian influenza A(H9N2) virus. *J Exp Clin Virol* 13: 105~108.
  21. Mase M, Imada T, Sanada Y, et al. 2001. Imported parakeets harbor H9N2 influenza A viruses that are genetically closely related to those transmitted to humans in Hong Kong. *J Virol* 75(7): 3490~3494.
  22. Lin YP, Shaw M, Gregory V, et al. 2000. Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: Relationship between H9N2 and H5N1 human isolates. *PNAS* 97(17): 9654~9658.
  23. Suarez DL, Garcia M, Latimer J. et al. 1999. Phylogenetic analysis of H7 avian influenza viruses isolated from the live bird markets of the northeast United States. *J Virol* 73(5) : 3567~3573.

24. Guan Y, Shortridge KF, Krauss S, et al. 2000. H9N2 influenza viruses possessing H5N1-like internal genomes continue to circulate in poultry in southeastern China. *J Virol* 74(20): 9372~9380.
25. Mo IP, Song CS, Kim KS, et al. 1997. An occurrence of non-highly pathogenic avian influenza in Korea. in *Proceedings. 4th International Symposium on Avian Influenza* 379~383.
26. Abraham A, Sivanandan V, Newman JA, et al. 1984. Rapid purification of avian influenza virus for use in ELISA. *Am J Vet Res* 45: 959~962.
27. Beck JR, Swayne DE. 1997. Evaluation of ELISA for avian influenza serologic and diagnostic programs: Comparison with agar gel precipitin and hemagglutination inhibition tests. in *Proceedings. 4th Int Symp Avian Influenza* : 297~303.
28. Toshihiro I, Hideo G, Eiji Y, et al. 2001. Generation of a highly pathogenic avian influenza A virus from an avirulent field isolate by passaging in chickens. *J Virol* 75(9): 4439~4443.
30. 윤용덕, 강영배, 김종엽 등. 1998. 외래동물 질병도감. 동양문화인쇄, 서울: 70~76.
31. 김순재, 강문일, 권혁무 등. 1997. 조류질병학. 선진문화사, 서울 : 103~109
32. 최원필, 송희종, 김순재 등. 1994. 수의전염병학. 경북대학교 출판부, 대구: 428~432.
33. Thayer SG, Beard CW. Serologic procedures. In: Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MW, et al., ed. 1998. *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*, 4th ed, Rose Printing, Tallahassee, Florida: 255~266.
34. 성환우, 이재길, 이윤정 등. 2002. 국내유행 가금인플루엔자 바이러스의 특성 및 진단법 개선연구. 국립수의과학원, 건양인쇄사: 510~520.
35. Beard CW. 1970. Avian influenza antibody detection by immunodiffusion. *Avian Dis* 14: 337~341.
36. Alexander DJ, 1982. Allan WH. Avian influenza in turkeys : a survey of farms in eastern England 1979/80. *Br Vet J* 138: 473~479.
37. Abraham A, Sivanandan V, Halvorson DA, et al. 1986. Standardization of enzyme-linked immunosorbent assay for avian influenza virus antibodies in turkey. *Am J Vet Res* 47: 561~566.
38. Fatunmbi OO, Newman JA, Sivanandan V, et al. 1989. A broad spectrum avian influenza subtype antigen for indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis* 33: 264~269.