

بررسی سرواپیدمیولوژی ویروس آنفلوآنزای نوع A/H₉N₂ به روش‌های ممانعت از هماگلوتیناسیون و الیزا در کارکنان کشتارگاه‌های طیور و مرغداری‌های شهرستان اهواز در سال ۱۳۸۲

مجتبی فتحی عبدی زاده^۱ - دکتر منوچهر مکوندی^۲ - دکتر علیرضا سمریاف زاده^۳

^۱ کارشناس ارشد ویروس‌شناسی، کارشناس آزمایشگاه درمانگاه تأمین اجتماعی سبزوار

^۲ استاد گروه ویروس‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی اهواز

^۳ استادیار گروه ویروس‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی اهواز

نویسنده مسؤول: مجتبی فتحی عبدی‌زاده - سبزوار - خیابان امیرکبیر - چهارراه هواشناسی - آزمایشگاه درمانگاه تأمین اجتماعی سبزوار

E-mail: Fattahi-mo@yahoo.com

وصول: ۸۴/۷/۱۸، اصلاح: ۸۴/۹/۱۶، پذیرش: ۸۴/۹/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: ویروس آنفلوآنزای تیپ A باعث ایجاد بیماری در انسان، طیور و حیوانات پست می‌شود و اخیراً گزارش‌هایی مبنی بر انتقال تحت تیپ H₅N₁ و H₉N₂ از طیور به انسان به چاپ رسیده است. هدف از این تحقیق، بررسی وجود آنتی‌بادی H₉N₂ در افراد مرتبط با صنعت پرورش طیور است که به این وسیله احتمال انتقال و ابتلاء به این سویه مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشات سرولوژی بر روی ۱۰۰ نمونه خون افراد در تماس با طیور انجام گرفت و آنتی‌بادی ویژه آنفلوآنزای تحت تیپ H₉N₂ به روش ممانعت از هماگلوتیناسیون اندازه‌گیری شد. همچنین حساسیت و ویژگی کیت الیزا تهیه شده در مقایسه با روش ممانعت از هماگلوتیناسیون که روشی استاندارد می‌باشد، مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور از بین تعداد ۱۰۰ مورد آزمایش HI تعداد ۴۵ مورد به طور تصادفی انتخاب و به روش الیزا اندازه‌گیری شدند.

یافته‌ها: ۶۶ درصد از افراد مرتبط با طیور دارای تیتراژ آنتی‌بادی مثبت بودند. ویژگی تست الیزا در مقایسه با HI، ۲۰ درصد و حساسیت آن ۸۷/۵ درصد بود.

نتیجه‌گیری: وجود آنتی‌بادی H₉N₂ در سرم افراد مورد مطالعه حاکی از شیوع ویروس H₉N₂ در بین طیور و انتقال آن به افراد در تماس با طیور و احتمال ابتلای این افراد را نیز دارد. همچنین کیت الیزای تهیه شده (Whole virus) با این روش نمی‌تواند کاربرد اساسی در تشخیص آنتی‌بادی H₉N₂ داشته باشد. (مجله دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی سبزوار، دوره ۱۲/ شماره ۳/ ۲۸-۳۳)

واژه‌های کلیدی: آنفلوآنزا؛ آنتی‌بادی؛ الیزا؛ H₉N₂؛ HI

مقدمه

بیماری تنفسی بیش از نیمی از بیماری‌های حاد را تشکیل می‌دهد و ویروس‌های آنفلوانزا که از خانواده ارتومیکسو ویروس‌ها هستند، عامل عمده‌ای در ایجاد بیماری و مرگ ناشی از بیماری‌های تنفسی به شمار می‌روند (۱). ویروس آنفلوانزا عامل مرگ بیش از میلیون‌ها انسان در سراسر جهان در قرن گذشته بوده است. به علت خاصیت جهش‌زایی و بازآرایی ژنتیکی ارتومیکسو ویروس‌ها که موجب تغییرات عمده ژنتیکی می‌شود، اقدامات پیشگیری‌کننده بی‌ثمر می‌ماند (۳-۱). ویروس آنفلوانزا H₉N₂ از عوامل عفونت مشترک بین پرندگان و انسان به شمار می‌رود و با توجه به این که مخزن آن پرندگان می‌باشد، به‌طور معمول از طریق پرندگان آلوده به ویژه طیور به انسان سرایت می‌کند (۵، ۴).

در حال حاضر ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H₉N₂ به عنوان یک ویروس نوظهور از این گروه ویروس‌ها شناخته شده است که در ایران از سال ۱۳۷۷ به بعد گزارش‌هایی مبنی بر حضور این ویروس در مرغداری‌ها و شیوع آن در طیور ارائه شده است (۶). سرایت ویروس H₉N₂ از پرند به انسان اهمیت مسأله را دو چندان نموده است (۷). در سال ۱۹۹۹ دو کودک یک ساله و چهارساله به این ویروس آلوده شدند که اولین آلودگی‌های تأیید شده در انسان تا آن زمان در اثر ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H₉N₂ بود (۸، ۹). در سال ۱۹۹۹، گودیوانژی در کنفرانسی گزارش کرد که ۵ نفر دیگر به وسیله تحت تیپ H₉N₂ ویروس آنفلوانزا در گواندنگ چین آلوده شده‌اند (۱۰). اولین گزارش بیماری‌زایی H₉N₂ در آسیا در بین پرندگان اهلی در سال ۱۹۹۲ و ۱۹۹۴ بود و بعد از آن در سال ۱۹۹۷ گزارشی از اروپا و کره نیز دریافت شد که دلالت بر فعالیت ویروس به‌طور گسترده و جهانی داشت. بررسی‌ها در هنگ‌کنگ نیز نشان داد که یک بازآرایی ژنتیکی بین ویروس H₅N₁ و H₉N₂ اتفاق افتاده است و در

این بازآرایی ژنتیکی، ویروس H₅N₁ که باعث آلودگی انسان و مرگ ۶ نفر در سال ۱۹۹۷ شد ممکن است ژن‌های داخلی خود را از ویروس (Qa/HK/G1/97) H₉N₂ گرفته باشد. در حال حاضر، ۳۱ واریانت از ویروس H₉N₂ در بانک ژنی موجود است (۱۱).

در تحقیقی ماساچی ماسی و همکارانش، واریانتی از ویروس H₉N₂ را از طوطی‌های صادر شده از پاکستان به ژاپن جدا کردند که ۹۷ درصد از نظر ژنتیکی با H₅N₁ جدا شده از انسان در سال ۱۹۹۷ و ۹۹ درصد با H₉N₂ جدا شده از پرندگان در بازار فروش پرندگان هنگ‌کنگ در سال ۱۹۹۹ مشابهت داشت. ویروس H₉N₂ بازار پرندگان با H₉N₂ جدا شده از انسان در سال ۱۹۹۹ نیز ۹۹ درصد مشابهت داشت (۱۲). تفاوت آنتی‌ژنی در دو پروتئین ساختمان داخلی (پروتئین M و NP) موجب تقسیم‌بندی ویروس آنفلوانزا به انواع A, B, C شده است. ویروس‌های آنفلوانزای A بر اساس گلیکو پروتئین‌های سطحی خود NA (نورامینیداز) و HA (هماگلوتینین) در قالب تحت تیپ‌های تعریف شده است (در مورد HA، ۱۶ تحت تیپ و در مورد NA، ۹ تحت تیپ) (۵، ۱). از جمله آزمایش‌هایی که می‌توان جهت شناسایی ویروس آنفلوانزا ذکر نمود، ممانعت از هم‌آلودگی‌ها (HI)، مهار نورامینیداز (NI)، الیزا، ثبوت کمپلمان و روش آگار ژل دیفوزیون می‌باشد (۱۳).

هدف از این بررسی، موارد مثبت و منفی آنتی‌بادی H₉N₂ در بین کارکنان مشغول در کشتارگاه‌های طیور و مرغداری‌های شهرستان اهواز به روش HI و پوشاندن آنتی‌ژن ویروس H₉N₂ به پلیت الیزا جهت تشخیص آنتی‌بادی H₉N₂ و نیز مقایسه و ارزیابی دو تست HI و الیزا در تعیین میزان تیتراژ آنتی‌بادی H₉N₂ از لحاظ حساسیت و ویژگی تست الیزا می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق تجربی، ابتدا فرم مخصوص ثبت

PBS=9/6 به چاهک‌های پلیت الیزا اضافه شده (Coat) و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتیگراد گذاشته شد و روز بعد بر روی ۴۵ سرم از نمونه افراد، آزمایش الیزا انجام گرفت (۱۶، ۱۵).

نتیجه‌گیری تست الیزا با استفاده از عدد Cut-Off صورت گرفت که عبارت است از میانگین تعدادی از نمونه‌ها که کمترین جذب نوری را داشتند، بعلاوه $(x+0.2) \times 0.2$. نمونه‌هایی که جذب نوری بالاتری از نقطه Cut-Off داشتند، به عنوان مثبت و آن‌هایی که جذبشان کمتر از آن بود، به عنوان نمونه منفی تلقی شدند. نتایج الیزا در مقایسه با روش HI به عنوان روش استاندارد طلایی مورد ارزیابی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار آماری SPSS و آزمون آماری مجذور کای صورت گرفت.

یافته‌ها

نتایج نشان داد که در آزمایش HI، ۶۶ درصد از افراد دارای تیتراژ مثبت آنتی‌بادی بر علیه ویروس H₉N₂ بودند که از این افراد ۶۲ نفر مرد و ۴ نفر زن بودند. همچنین ۶۰٫۶ درصد افراد مثبت از کارگران مشغول در مرغداری‌ها و کشتارگاه‌ها بودند و ۳۹٫۴ درصد مربوط به دانشجویان دامپزشکی اهواز بودند. در این تحقیق، نتایج با استفاده از آزمون مجذور کای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. بررسی از نظر جنس افراد مورد آزمایش نشان داد که ۹۵ نفر، مذکر بوده‌اند و علت آن این است که افراد شاغل در کشتارگاه‌ها همگی مرد هستند که از این تعداد ۶۲ نفر (۶۵ درصد) دارای آزمایش HI مثبت بودند و تعداد ۳۳ نفر (۳۵ درصد) آزمایش HI منفی شد. همچنین از تعداد ۵ مورد که مؤنث بودند، ۴ نفر (۸۰ درصد) دارای آزمایش HI مثبت و یک مورد (۲۰ درصد) دارای آزمایش HI منفی بود (جدول ۱).

اطلاعات تدوین گردید و سپس از ۱۰۰ نفر از کارگران دو کشتارگاه (تمامی افراد شاغل در کشتارگاه‌های البرز و سیمین طیور-۴۶ نفر) از مجموع ۳ کشتارگاه صنعتی طیور اهواز (مدیریت کشتارگاه طیور سوم همکاری نکرد) و نیز از کارکنان مرغداری‌هایی که به شرکت تعاونی مرغداران شهر اهواز مراجعه می‌کردند (۱۰ نفر)، خونگیری به عمل آمد. همچنین از دانشجویان اکسترن و انترن دانشکده دامپزشکی دانشگاه چمران که با کشتارگاه‌های طیور و پرورش طیور در ارتباط بودند (۴۳ نفر)، به عنوان افراد مرتبط با صنعت طیور خونگیری به عمل آمده و بر روی آن‌ها آزمایش HI جهت وجود آنتی‌بادی ویروس H₉N₂ انجام شد. در مجموع ۹۵ نفر از افراد مرد و مابقی زن بودند. سپس به صورت تصادفی بر روی سرم ۴۵ نفر از آن‌ها (به دلیل محدودیت آنتی ژن) آزمایش الیزا انجام شد. خون‌ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه با دور RPM ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شده و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا موقع آزمایش نگهداری شدند.

ابتدا برای تهیه آنتی ژن، ویروس H₉N₂ استاندارد تهیه شده از دانشکده دامپزشکی چمران اهواز در ۱۲۰ تخم‌مرغ جنین‌دار، در حفره آلتوتوئیک کشت داده شد و پس از ۳ روز پی‌گیری مایع آلتوتوئیک کشیده شده و به روش HA تیتراژ آن تعیین شد و از آنتی ژن با تیتراژ ۴ واحد HA جهت آزمایش HI استفاده شد. آزمایش HI با استفاده از آنتی ژن تهیه شده و گلبول ۵ درصد جوجه بر روی سرم تهیه شده از افراد آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون انجام شد و تیتراژهای بیشتر از ۱/۲ به عنوان تیتراژ مثبت در نظر گرفته شد (۱۳).

سپس آنتی ژن تهیه شده از تخم‌مرغ جنین‌دار را اولتراسانتریفیوژ نموده و مقدار آنتی ژن آن با متد لوری (Lowry's Method) مشخص شد (۱۴). این روش برای اندازه‌گیری $200-20 \mu\text{g/ml}$ مناسب است. سپس ۱۰۰ میکرولیتر با غلظت $10 \mu\text{g/ml}$ از آنتی ژن توسط بافر

جدول ۱: نتایج آزمایش HI بر حسب سن و جنسیت

گروه سنی	مرد		زن		جمع
	مثبت	منفی	مثبت	منفی	
۱۰-۱۹	۳	۳	-	-	۶
۲۰-۲۹	۳۰	۱۹	۴	۱	۵۴
۳۰-۳۹	۱۶	۷	-	-	۲۳
۴۰-۴۹	۱۱	۳	-	-	۱۴
بیشتر از ۵۰	۲	۱	-	-	۳
جمع	۶۲	۳۳	۴	۱	۱۰۰

۴۵ نفر از ۱۰۰ نفر مورد بررسی (۴۰ نفر از افرادی که آزمایش HI آن‌ها مثبت شده بود و پنج نفر از آن‌هایی که آزمایش HI منفی داشتند) به طور تصادفی انتخاب و آزمایش الیزا بر روی آن‌ها انجام شد.

در آزمایش الیزای تهیه شده، ۵ نمونه از ۴۰ نمونه‌ای که آزمایش HI آن‌ها مثبت شده بود، با روش الیزا به اشتباه منفی شدند (منفی کاذب). همچنین ۴ مورد از ۵ مورد نمونه‌ای که آزمایش HI آن‌ها منفی شده بود، به اشتباه مثبت شدند (مثبت کاذب). با توجه به این نتایج حساسیت و اختصاصی بودن این روش به صورت زیر مشخص شدند:

$$\text{حساسیت} = \frac{\text{مثبت واقعی}}{\text{مثبت واقعی} + \text{منفی کاذب}} = \frac{۳۵}{۳۵+۵} = ۸۷/۵\%$$

$$\text{ویژگی} = \frac{\text{منفی واقعی}}{\text{مثبت کاذب} + \text{منفی واقعی}} = \frac{۱}{۱+۴} = ۲۰\%$$

بحث

وجود آنتی‌بادی H₉N₂ در سرم افراد مورد مطالعه حکایت بر شیوع ویروس H₉N₂ در بین طیور و انتقال آن به افراد در تماس با طیور و ابتلای این افراد را نیز دارد. به نظر می‌رسد که ارتباط دائمی و طولانی مدت شاغلین در کشتارگاه‌ها با پرندگان آلوده و مبتلا به بیماری آنفلوانزا باعث انتقال ویروس از راه استنشاق ذرات ویروس موجود در هوا و یا از طریق دستگاه گوارش شده و علت وجود آنتی‌بادی در این افراد باشد و به علت

نشانه‌های عمومی و غیراختصاصی بیماری از جمله سردرد، تب، سرفه، گلو درد و میالژی، تشخیص بیماری مشکل می‌باشد. در اوایل سال ۱۳۷۷ بیماری ویروسی تنفسی با واگیری شدید در مرغداری‌های کشور شایع شد. سویه ویروسی جدا شده تحت تیپ H₉N₂ (A/Chicken /Iran/59/1998) تأیید و نامگذاری گردید. در این رابطه رضا ممیز و همکارانش به جهت عفونت افرادی که در تماس نزدیک با این ویروس بودند، تحقیقی انجام دادند که طی آن، عیار آنتی‌بادی ویروس H₉N₂ در سرم خون کارکنان کلینیک‌ها، آزمایشگاه‌های طیور و مرغداری‌های صنعتی با استفاده از آزمایش HI بررسی شد و نتایج به دست آمده حاکی از دارا بودن آنتی‌بادی علیه این ویروس در افراد در تماس با آن بود. حتی در تعدادی از آن‌ها علائم تنفسی هم دیده می‌شد (۶) و تحقیق انجام شده تأییدی بر کار آقای ممیز می‌باشد.

در این بررسی بیشترین فراوانی وجود آنتی‌بادی مربوط به کارگران مشغول در مرغداری‌ها و کشتارگاه‌ها مشاهده گردید (۶۰/۶ درصد) و نمونه‌های مربوط به دانشجویان دامپزشکی دارای فراوانی پایین‌تری بودند (۳۹/۴ درصد). این امر به این دلیل می‌تواند باشد که دانشجویان اکسترن دانشکده دامپزشکی ارتباط کمتری با طیور داشته‌اند و مدت زمان این ارتباط، کمتر بوده است. در یافته‌های این بررسی در خصوص رابطه بین جنس و مثبت شدن آزمایش HI اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید.

در یک بررسی، گواو مشخص کرد که ۱۹ درصد از افراد مورد مطالعه در چین دارای تیتراژ آنتی‌بادی مساوی یا بیشتر از ۲۰ بر علیه ویروس H₉N₂ بودند و ۵ سویه از ویروس H₉N₂ از آن‌ها جدا شد و به این نتیجه رسید که ویروس آنفلوانزای طیور A/H₉N₂ می‌تواند انسان را آلوده کند (۱۱). این شخص در سال ۲۰۰۲ این بررسی را تکمیل کرد و نشان داد که نه تنها انسان به ویروس H₉N₂ آلوده می‌شود، بلکه بین دودمان‌های متفاوت ژنتیکی

ویروس آنفلونزا A/H₉N₂ در طبیعت، بازآرایی ژنتیکی رخ می دهد (۱۷).

در پلیتی که به منظور آزمایش الیزا تهیه گردید، حساسیت و ویژگی پایینی مشاهده شد و این می تواند به این دلیل باشد که آنتی ژن پوشانده شده به پلیت، ویروس کامل بوده است و به دلیل پلی والان بودن، باعث واکنش های متقاطع می شود. لذا کاربرد کیت الیزای تهیه شده با این روش در این مطالعه نمی تواند کاربرد اساسی در تشخیص آنتی بادی H₉N₂ داشته باشد و نمی تواند مورد استفاده قرار گیرد.

طی مطالعه ای جهت مقایسه روش های سروایمنولوژی از آزمایش الیزای رقابتی که در آن از نوکلئوپروتئین بیان شده در بکلوویروس و یا استفاده از منوکلونال آنتی بادی تهیه شده بود، برای تعیین آنتی بادی علیه نوکلئوپروتئین تیپ A استفاده شد و کارایی الیزای

رقابتی ارزیابی شد. این آزمایش در مقایسه با آزمایش آگار ژل ایمنودیفوزیون، حساسیت ۱۰۰ درصد داشت. همچنین نسبت به آزمایش HI حساسیت ۹۶ درصد بود. بیشتر از ۹۰ درصد نمونه هایی که جواب آن ها با آگار ژل ایمنودیفوزیون منفی و با الیزای رقابتی مثبت شده بودند، با آزمایش HI حداقل برای یک سروتیپ مثبت شدند. این نتایج بر حساسیت و ویژگی بیشتر الیزای رقابتی نسبت به آگار ژل ایمنودیفوزیون و HI دلالت داشت (۱۸).

بنابراین وجود آنتی بادی H₉N₂ در سرم افراد مورد مطالعه حاکی از شیوع ویروس H₉N₂ در بین طیور و انتقال آن به افراد در تماس با طیور و ابتلای این افراد را نیز دارد. لذا پیشنهاد می شود ساخت واکسن H₉N₂ در برنامه سالانه ی پیشگیری به عنوان یک سوبیه ی نو ظهور گنجانده شود.

منابع

- ۱- جاوتز، شلنیک، آدلبرگ. میکروبیولوژی جاوتز. ترجمه جمیله نوروزی، ویرایش ۲۱. تهران: انتشارات حیان، چاپ دوم ۱۳۷۹. صفحات ۶۰۷-۵۹۱.
2. Knip DM, Howley PM. *Fundamental Virology*: Philadelphia, USA: Lippincott williams & wilkins, Fourth Edition. 2000; 24: 725-770.
3. Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology Philadelphia, USA: Lippincott williams & wilkins*. 2001; 46, 47(1): 1487-1581.
4. Matrosovich MN, Krauss S, Webster RG. H₉N₂ Influenza A viruses from poultry in Asia have human virus – like receptor specificity. *J Virology* 2001; 15: 281(2): 156-62.
5. Gamborian AS, Iammikova SS, Lvord K, Robertson JS, Webster RG, Matrosovich MN. Difference in receptor specificity between the Influenza A viruses isolated from the duck chicken and human. *Mol Biol Mosky* 2002; 36(3): 542-9.
- ۶- ممیزر، پوربخش س.ع، بنانی م. ارزیابی عیارآنتی بادی ویروس آنفلوانزای H₉N₂ در کارکنان کلینیک ها و آزمایشگاه های دامپزشکی و مرغداری های صنعتی، موسسه سرم سازی رازی. خلاصه مقالات اولین کنگره ویروس شناسی، ۱۳۸۰ صفحه ۱۴۷.
7. Peiris M, Yam WC, chan KH, Chose P, et al. Influenza A H₉N₂: Aspects of laboratory diagnosis. *JMC*. /1; k
8. LU X, Remshawm, Tumpey TM, Kelly G, et al. Immunity to influenza H₉N₂ viruses induced by inection and vaccination. *Journal of Virology*, 2001; 75(10): 4896-901.
9. Matrosovich M, Zhou N, Kawaoka Y, Webster R. The surface glycoproteins of H5 Influenza Viruses isolated, from humans, Chikens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *Journal of Virology* 1999; 73(2): 1146-55.

10. Guan Y, Shortridge KF, Krauss S and Webster RG, Molecular Characterization of H₂N₂ Influenza Viruses: Were They the Donors of the Internal genes of H₅N₁ Viruses in Hongkong? *Proc Natl M Acad Sci* 1999; 96(16): 9363-7.
11. GUO Y, Li J, Cheng X. Discovery of Men Infected by Avian Influenza A (H₉N₂) Viruses, *Zhanghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Zazhi*. 1999; 13(2): 105-8.
12. Mase M, Tadao TM, Sanada YU, Etoh M, et al. Imported parakeets harbor H₉N₂ Influenza A viruses that are genetically closely related to those transmitted to humans in Hong Kong. *J Virol* 2001; 75(7): 3490-4.
13. Geralj SS, Lancz. *Clinical Virology Manual*. Washington, D.C: ASM Press, 2000; 13, 201-207.
- ۱۴- فیوضی یوسفی ر. تولید و خالص‌سازی آنتی‌بادی ضد ویروس هپاتیت B (Anti-HBS) در زرده تخم مرغ و کاربرد آن در تشخیص HBs-Ag به روش الیزا (ELISA). پایان نامه دکترای داروسازی، دانشگاه اهواز. ۱۳۷۶.
- ۱۵- کلیشادی م. بررسی سرواپیدمیولوژی سرخک، سرخجه و پاروویروس B19 در بیماران دارای بثورات در استان خوزستان. سال‌های ۸۱-۱۳۸۰. پایان‌نامه کارشناسی ارشد ویروس‌شناسی دانشگاه اهواز، ۱۳۸۱.
16. Meir DM, *Applications of Immunological Methods in Biomedical Sciences* Oxford UK: Blackwell Scientific Publications, 4th Edition. 1986; 121, 7-9.
17. Guo Y, Xie J, Wu K, Dong J, Wang M, Zhang YM, et al. Characterization of A/guang zhou/333/99 (H₉N₂) virus. *zhanghua shi yan He lin chuang Bing du yue za zhi*. 2002; 6(2): 142-2.
18. Zhou EM, Chan M, Heckert RA, Riva J, et al. Evaluation of a Competitive ELISA for detection of antibodies against avian influenza virus nucleoprotein. *Avian Dis* 1998; 42(3): 517-22.