

青海湖鸟岛斑头雁种群对 H5N1 亚型禽流感病毒的免疫状况

朱筱佳^{1,2}, 李来兴^{1,*}, 杨 乐^{1,2}, 王贵华³

(1. 中国科学院西北高原生物研究所 高原生物适应和进化重点实验室, 青海 西宁 810001;

2. 中国科学院研究生院, 北京, 100049; 3. 中国科学院微生物研究所 病原微生物学和免疫学重点实验室, 北京 100101)

摘要: 斑头雁 (*Anser indicus*) 是 2005 年青海湖 H5N1 型高致病性禽流感的主要被感染物种。为了解斑头雁目前对 H5N1 亚型禽流感病毒(AIV)免疫状况, 2008 年春季, 在青海湖鸟岛采集该种群弃卵 (68 枚) 和巢卵 (125 枚), 以血凝抑制试验 (HI) 检测抗 H5N1 亚型禽流感病毒的卵黄母源抗体 (IgY)。根据测试结果推断, 在高致病性禽流感暴发 3 年后, 青海湖鸟岛繁殖的斑头雁种群有 26.5%~35.2% 的繁殖对可能已经获得了对 H5N1 型禽流感病毒的免疫能力。另外, 以斑头雁巢密度和抗体效价进行相关分析发现, 斑头雁母源抗体水平与斑头雁巢密度正相关($r=0.736, P=0.000$), 表明高密度繁殖群内的母源抗体传递更具有适应性意义。

关键词: 斑头雁; H5N1 型禽流感; 卵黄; 母源抗体; 血凝抑制; 青海湖

中图分类号: Q95-3; Q959.739; Q862.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2009)04-0406-05

Immune Status to H5N1 Avian Influenza Virus of Bar-headed Geese on Bird Island in Qinghai Lake

ZHU Xiao-jia^{1,2}, LI Lai-xing^{1,*}, Yang Le^{1,2}, WANG Gui-hua³

(1. Key Laboratory of Adaptation and Evolution of Plateau Biota, Northwest Institute of Plateau Biology, the Chinese Academy of Science, Xi'ning 810001, China; 2. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: The most infected species of H5N1 highly pathogenic avian influenza (HPAI) broke out in Qinghai Lake in 2005 was bar-headed goose (*Anser indicus*). To investigate the immune status to H5N1-AIV of bar-headed geese in Qinghai Lake National Nature Reserve, 68 ejected eggs and 125 in-nest eggs of the breeding colony were collected in spring 2008, and haemagglutination inhibition (HI) was applied to analyze their yolk MAb (IgY) to H5N1-AIV. The results revealed, three years after the outbreak of HPAI in 2005, 26.5% to 35.2% of breeding pairs of the bar-headed geese breeding on Bird Island in Qinghai Lake may have acquired anti-H5N1 AIV immunocompetence. In addition, we analyzed the relationship of MAb titers of the nest-eggs and the nest density, and found the significant correlation between them ($r=0.736, P=0.000$). It is likely to be more adaptive that the MAb transmission pattern in the breeding colony with high breeding density.

Key words: Bar-headed goose; H5N1 Avian influenza; Yolk; Maternal antibody (MAb); Haemagglutination inhibition (HI); Qinghai Lake

集群繁殖种群有利于群体中个体提高捕食效率和抵御被天敌捕食的风险。然而, 繁殖季节大量的个体聚集同时却增加了病原体感染的风险, 包括病原微生物入侵的机会, 从而形成动物的另一个生存压力(Danchin & Wagner, 1997)。动物新个体在自身免疫系统未完成发育前, 亲代通过母源抗体传递

将其特异性病原体的获得性免疫能力传递给子代, 从而保证子代的存活 (Muller et al, 2004)。母源抗体传递, 是指由具免疫力的成体, 尤其是雌体, 通过胚胎传递或者初乳、乳汁、卵黄等将其抗体传递给无免疫力的新生个体 (Grindstaff et al, 2003)。母源抗体传递可以作为一种重塑幼鸟表现型以适应

收稿日期: 2009-04-03; 接受日期: 2009-06-17

基金项目: 国家科技支撑计划 (2006BAD06A01); 林业科技支撑计划(2008BADB0B0303)

*通讯作者 (Corresponding author), E-mail: lxli@nwipb.ac.cn

第一作者简介: 朱筱佳(1982-), 女, 硕士研究生, 主要从事鸟类行为进化学方面的研究

当地病原体环境的特殊途径, 而种群繁殖密度的变化会使母源抗体传递随繁殖群内巢位的不同而发生改变 (Muller et al, 2004)。亲鸟对母源抗体的传递能力, 是提高子代存活率, 进而提高种群繁殖率的一个重要途径, 具有重要的进化意义, 并且对野生鸟类生活环境, 特别是病原体环境, 具有一定的指示意义。野生鸟类母源抗体传递历程大致为 3 个阶段: 在亲鸟产卵前的 4~5d 内, 母源抗体开始大量传递到卵黄囊; 产卵后再发育的最后 5~6d (即出壳前 5~6d), 大量母源抗体由卵黄囊传递到胚胎 (Buechler et al, 2002); 雏鸟在出壳 5d 后自身开始主动合成抗体, 14d 后开始分解母源抗体。这样的传递历程表明, 雏鸟出壳前 5~6d 的卵黄母源抗体或出壳后 5d 内雏鸟的母源抗体水平代表了母体的获得性免疫抗体水平, 子代的母源抗体水平可以在一定程度上反映亲鸟的特异性病原体感染及其在繁殖环境中的病原体状况 (Apanius & Nisbet, 2003)。

刚孵出的幼鸟来自卵的无菌环境中, 像哺乳类一样, 需要暂时的免疫援助。产卵之前, 雌鸟就将其血清中的免疫球蛋白转移到卵黄中。卵黄免疫球蛋白 IgY 通过卵泡上皮主动转移到卵黄囊中 (Camenisch et al, 1999)。有研究发现, 在液态卵黄中的 IgY 和母体血清中的抗体水平相似 (Keck et al, 1993)。在卵沿着输卵管向下移动时, 输卵管分泌的 IgM 和 IgA 融合到卵清中。雏鸟胚胎发育时, 将卵黄中的 IgY 吸收到血液循环系统, 而卵清中的 IgM 和 IgA 混合到氨基酸液体中被胚胎吞食, 因而出壳后的幼鸟血清中含有 IgY, 而肠道中含有 IgM 和 IgA, 前者待完成出壳后早期的免疫功能, 后者已完成胚胎在卵中发育的营养 (Tizard, 2002)。血清 IgY 在出壳后一周内的雏鸡体内半衰期是 $(72 \pm 9) \text{ h}$ (Tizard, 2002)。经对家禽中血清和卵黄的母源抗体检测的比较研究表明, 两种样品抗体水平没有显著差异 (Arpin et al, 1991; Huang et al, 2004), 且抗体消长趋势一致 (Xi et al, 2007)。在鸟类自然种群的卵黄母源抗体传递研究中发现, 孵化后期卵黄囊中的母源抗体水平相对高于雏鸟血清中的母源抗体水平 (Buechler et al, 2002; Tizard, 2002)。

2005 年春季, H5N1 型高致病性禽流感 (HPAI) 在青海湖鸟岛集群繁殖水鸟中暴发 (Liu et al, 2005)。在这次事件中, 总共致死鸟类 12 种计 6 000 余只个体, 其中斑头雁 (*Anser indicus*) 的死亡数量最多, 达 3 272 只, 占鸟类死亡数量的一半以上

(Zhen & He, 2006)。为了评估这次重大 H5N1 型禽流感暴发事件对栖息在青海湖鸟岛的斑头雁种群的影响和斑头雁种群在事件后对 H5N1 型禽流感免疫力获得等情况, 研究人员试图对该种群进行病毒携带或免疫力等方面进行研究, 但迄今没有相应的报道。因为已有的测试手段极大地依赖对斑头雁繁殖种群进行捕捉个体取样, 但在自然种群且位于自然保护区的核心区是不现实的。

本研究基于子代母源抗体特异性反映母体种群特异性免疫力或特异性病原体携带状况的基本原理, 针对在青海湖鸟岛繁殖的斑头雁种群, 设计了收集其弃卵和巢卵提取卵黄中的母源抗体, 用血凝抑制试验 (hemagglutinin inhibition, HI) 检测母源抗体水平, 进而评估该种群对特异性病原体的携带或性免疫力获得状况的方法。本研究是首次使用该方法对栖息在青海湖鸟岛的斑头雁种群对 H5N1 亚型禽流感病毒的携带或免疫状况进行评估的一次尝试。

1 研究地点及方法

1.1 研究地区

青海湖国家级自然保护区的鸟岛 ($N36^{\circ} 58'$, $E99^{\circ} 52'$, 3200m a.s.l.), 为一连陆岛屿, 面积大约 0.22 km^2 , 是斑头雁种群在保护区最大的繁殖栖息地。每年 4 月中下旬至 5 月底, 大约有 4 500~6 500 只斑头雁在此营巢、产卵和孵化, 为该自然保护区数量最多的斑头雁繁殖群 (Cheng, 1979)。

1.2 研究方法

1.2.1 研究物种 斑头雁 (*Anser indicus*), 雁鸭类的一种, 早成鸟, 于亚洲南部低地越冬, 喜马拉雅北部高地湖泊和河流繁殖, 集群营巢于小型岛屿, 相邻鸟巢间的距离不超过 1 m, 有野外研究观察到在高密度繁殖区域的分散于鸟巢间的卵 (Weigmann & Lamprecht, 1991)。《中国动物志》中记载, 斑头雁, 青海湖夏候鸟, 单配制, 集群繁殖, 最早 3 月 20 日迁来繁殖; 营巢最早开始于 4 月上旬, 一般在 4 月中旬左右; 营巢后 10~12 d 开始产卵, 窝卵数 2~8 枚, 少数 10 枚以上, 通常以 4~6 枚为最多; 产卵期中, 雌雁每隔 1d 产卵 1 枚, 整窝卵全部产出需时 4~16d; 孵卵 29d 出雏 (Cheng, 1979)。据保护区人员和我们多年的野外观察, 发现斑头雁在其窝卵数未达到最大时发生弃卵行为, 多为产下的前几枚卵 (Lobato et al, 2006)。

1.2.2 野外采样 2008年4月,每天观察青海湖蛋岛斑头雁繁殖群的营巢和产卵情况。在没有外界干扰(天敌、游客等)的情况下,于每天下午2:00-3:00之间,捡取巢群中被斑头雁推出巢外的卵(弃卵)。在斑头雁巢群弃卵明显减少时完成卵收集。每取1枚弃卵,再取距离最近的巢中卵(巢卵)2枚,并记录其窝卵数,共收集85个巢的弃卵(86枚)和巢卵(149枚)。以所采集卵巢的3m半径内的相邻巢数作为巢密度指数,代表种群的繁殖密度(Muller et al, 2004)。每一批卵采集后小心运输,途中注意保温和防止震动,入孵前,卵保存在13~15℃(时间短采用温度上限,时间长则采用下限),相对湿度75%~80%(既能明显减低蛋内水分蒸发,又可防止霉菌孳生),并保持蛋库的良好通风条件。入孵前,经0.1%的高锰酸钾溶液消毒,称重及测量卵径,以37.5℃,相对湿度60%整批进入入孵于孵化器,进行人工孵化(Chen, 1990)。

1.2.3 卵黄母源抗体取样 根据母源抗体传递发育历程,对出壳前一周之内的卵,取卵黄进行卵黄母源抗体测试(Kowalczyk et al, 1985)。在孵化期结束的最后一周之前将人工未孵出的卵保存在0~4℃,无菌提取卵黄抗体(Cassey et al, 2007)。

试验采用卵黄囊取样提取卵黄抗体的方法,经卵黄囊提取卵黄样品后采用氯仿萃取法进行卵黄抗体提取(Xia et al, 1988):将卵壳经酒精消毒后,沿气室方向,气室轮廓一周打开裂缝(与雏鸟出壳方向一致),挑开卵膜,用更换针头为一段1.5~2.0cm输液管的5mL注射器刺入卵黄膜,吸取卵黄液5mL,加等量生理盐水和氯仿萃取,静置30min后,以3000r/min离心5min,吸取的上清液为卵黄抗体,保存在-20℃,避免反复冻融(Vaught, 2006)。

1.2.4 卵黄抗体水平检测 试验采用血凝抑制(HI)试验对青海湖鸟岛斑头雁种群的卵黄母源抗体水平进行检测。血凝抑制试验(HI)试验是采用倍比稀释法在微量96孔板混合等量待测卵黄抗体、血细胞悬液和抑制血凝效价的病毒,通过凝集反应情况判定血凝抑制效价,可定量检测抗体浓度

(Wang, 2004)。试验采用25μL系统的β-微量法血凝抑制试验,禽流感病毒H5型血凝抑制试验标准抗原与标准阴性血清购自青岛易邦生物工程有限公司(中动卫2007 RE1-019)。当阳性对照血清的试验结果符合HI试验要求(本试验,阳性血清为SPF鸡禽流感H5型高免血清,HI效价在1:256~1:512之间),阴性血清效价不高于1:4时,试验成立。试验结果中,以完全抑制4单位抗原的最高抗体样品稀释倍数为该抗体样的HI效价,若HI价 $\leq 2\log_2$,判定结果为阴性;若HI价 $= 3\log_2$,结果可疑(须重新检一次,重检效价 $\geq 3\log_2$ 为阳性, $< 3\log_2$ 为阴性);若HI价 $\geq 4\log_2$,判定结果为阳性。

2 结果

2.1 弃卵和巢卵母源抗体阳性率

经HI抗体效价检测,结果表明(表1),弃卵($n=68$)阳性率26.5%,巢卵($n=125$)阳性率35.2%。采用正态近似法,即U检验进行两样本百分率差异的显著性检验,并作连续性矫正,两比率差异不显著($u=1.08 < u_{0.05}$, $P > 0.05$),表明弃卵和巢卵的母源抗体阳性率无显著差异。

2.2 抗体水平和繁殖密度

对繁殖密度和抗体水平的相关分析,以繁殖密度最高区域的巢卵样本($n=18$)的巢密度(3m内相邻巢数)和巢卵抗体效价进行相关分析,以相同巢密度的抗体效价值作几何平均(以2的指数作图),由对数趋势线可以看出抗体效价值随密度增加而增大。相关分析表明(SPSS 16.0),巢卵抗体效价和巢密度间存在着极其显著的正相关关系($r=0.736$, $P=0.000 < 0.01$, Pearson Correlation),即青海湖斑头雁种群H5N1型禽流感母源抗体效价水平与繁殖密度正相关,在繁殖密度高的栖息地的种群免疫水平也高(图1)。

3 讨论

关于病原体入侵宿主种群的过程,在目前研究

表1 斑头雁H5N1亚型AIV抗体阳性率

Tab. 1 Positive rate of H5N1 AIV antibody in bar-headed geese

样品来源 Source of samples	标本数 Samples amount	阳性数 Positive amount	阳性率 Positive rates (%)
弃卵 Ejected eggs	68	18	26.5
巢卵 Nested eggs	125	44	35.2

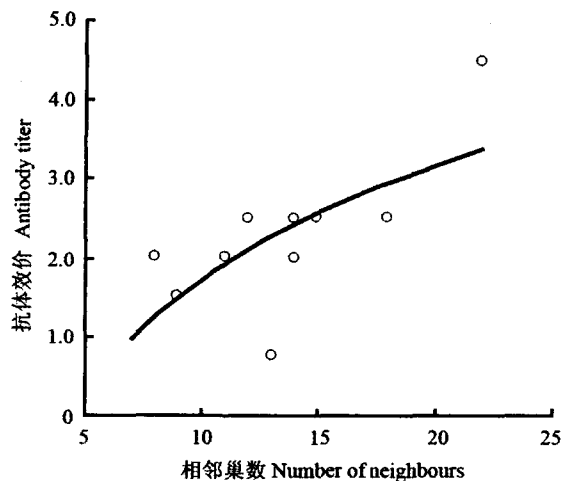


图 1 巢密度和抗体水平相关分析

Fig. 1 The correlation between nest-densities and antibody titers

中涉及较少。Dobson (2003) 曾将集合种群 (metapopulation) 的概念引入这一领域, 认为亚种群 (subpopulation) 内部, 个体之间是以集合种群的形式生活着; 病原体对它们的入侵, 实际上就像它们占领一块栖息地一样, 是呈斑块状的, 也就是形成繁殖群 (breeding colony), 这决定了其入侵或栖息的成功与否。Longini et al (2005) 对 1997 年 H5N1 亚型禽流感病毒 (Avian influenza virus, AIV) 在香港感染人员的病例分析后指出, 被感染的人群无非有两种情形: 发病或没有发病; 而在发病人群中, 也无非有两种情形: 感染死亡或病愈; 没有发病和感染后痊愈的, 可能携带病毒或不携带病毒, 但自身已经产生 H5N1 亚型 AIV 的抗体而进入下一个感染循环。因此, 可以推测, H5N1 亚型禽流感病毒在入侵青海湖鸟岛斑头雁种群后, 斑头雁个体可能感染或未感染此病原体。没有被感染的个体, 可能既没有携带 H5N1 亚型 AIV, 也没有产生对应的抗体; 被感染的个体中, 又可能有 3 种情形: 未发病的个体可能产生 H5N1 亚型 AIV 的抗体, 但没有携带病毒; 发病死亡的个体被种群剔除; 发病但痊愈的个体可能携带或不携带 H5N1 亚型 AIV, 但均产生了 H5N1 亚型 AIV 的抗体。本研究测试结果显示, 青海湖鸟岛斑头雁种群中有 73.5%~64.8% 的繁殖对 (个体) 没有 H5N1 亚型 AIV 的抗体, 可能没有接触过此病毒, 因而此种群再次感染 H5N1 亚型 AIV 的风险仍然较高; 然而, 此种群中至少有 26.5%~35.2% 的繁殖对 (个体) 具有 H5N1 亚型

AIV 的抗体, 因此, 即使发生大规模的 H5N1 禽流感疫情, 至少有约 1/3 的个体不会被感染, 可以在疫情中存活下来。这是此研究对青海湖鸟岛集群繁殖的斑头雁种群抗 H5N1 亚型 AIV 免疫力状况的基本判断。

母源抗体 (maternal antibody, MAb), 是免疫力低下的新生个体通过胎盘、初乳、乳汁或卵黄从母体获得的抗体 (Grindstaff, 2003)。鸟类母源抗体传递与种群疾病防御的对应关系体现在间接遗传效应 (IGE) 和间接环境效应 (IEE) 两种机理: 首先, IGE 表现在以下 3 点, 决定母源抗体传递的基因在亲代表达, 而选择作用则主要发生在子代接受母源抗体时, 子代存活比起亲代更易受到这种传递变化的影响; 而决定母源抗体传递的基因频率直到子代成熟并传递母源抗体给其下一代时才有明显的变化; 如果亲鸟选择升高体液免疫水平以传递母源抗体给后代将导致自身细胞免疫和天然免疫的相应降低。其次, 如果亲代暴露给特定的病原体并诱导产生抗体并传递抗体给其子代个体, 再次受到同一病原体入侵时, 子代个体会增高更有效的母源抗体水平, 称为 IEE 或跨代表型可塑性 (Fox et al, 1998; Agrawal et al, 1999)。相反, 亲鸟在传递前未曾暴露给特定的病原体将不会传递这种病原体诱导的抗体给雏鸟, 使其子代易被感染 (Heller et al, 1990)。在缺乏母源抗体时, 后代的免疫反应会被抑制, 若遇到严酷的病原体传播环境, 存活率必定降低 (Yasuda et al, 1998)。在上述基本原理和相关机理的基础上, 通过测试野生鸟类子代的 AIV 母源抗体, 反向推断亲代种群的特异性病原体对应抗体的携带状况, 进而对特异性病原体在宿主种群中的分布以及再次被该病原体感染的风险作出评估的方法, 是此项研究的重要意义所在。

弃卵和巢卵的抗体阳性率比较说明, 斑头雁种群的母源抗体水平, 即种群免疫能力, 在弃卵和巢卵之间无显著性差异, 因而下一步研究考虑以弃卵替代巢卵进行母源抗体传递研究, 对自然保护区斑头雁种群进行疾病监测。由于卵黄效价高于血清, 而取繁殖期新鲜弃卵进行母源抗体水平测试对鸟群没有伤害, 是一种较为适用的自然保护区野生水鸟的抗体采样方法。巢密度和巢卵效价的正相关结果表明, 繁殖密度高的区域的种群免疫力也相对较强。此结果与 Muller et al (2004) 对红嘴鸥 (*Larus ridibundus* L.) 的研究结果一致, 表明以鸟巢密度为

表征的繁殖密度可能是集群水鸟种群感染病原体的一个影响因素。在自然保护区管理中,可以考虑以改善集群水鸟的栖息地环境使其局域的繁殖密度降低,从而降低病原体入侵种群的风险。本研究首次利用母源抗体测试技术对鸟类自然种群的特异性病原体抗感染能力进行研究,也是对利用母源抗体检测技术进而对禽流感进行监测的方法研究。

参考文献:

- Agrawal A, Laforsch C, Tollrian R. 1999. Transgenerational induction of defences in animals and plants [J]. *Nature*, **401**(6748): 60-63
- Apanius V, Nisbet ICT. 2003. Serum immunoglobulin G levels in very old common terns *Sterna hirundo*[J]. *Exp Gerontol*, **38**(7): 761-764.
- Arpin C, Silim A, Venne D. 1991. Kinetics of antibody-titers in egg-yolk and serum to 4 avian viruses in 5 breeder hen flocks[J]. *Ann Med Vet*, **135**(5): 377-380.
- Buechler K, Fitze PS, Gottstein B, Jacot A, Richner H. 2002. Parasite-induced maternal response in a natural bird population[J]. *J Anim Ecol*, **71** (2): 247-252.
- Camenisch G, Tini M, Chilov D, Kvietikova I, Srinivas V, Caro J, Spielmann P, Wenger RH, Gassmann M. 1999. General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1 α [J]. *FASEB J*, **13**(1): 81-88.
- Cassey P, Ewen JG, Boulton RL, Karadas F, Moller AP, Blackburn TM. 2007. A nondestructive method for extracting maternally derived egg yolk carotenoids[J]. *J Field Ornithol*, **78**(3): 314-321.
- Chen YX. 1990. Chinese Waterfowl[M]. Beijing: Chinese Agriculture Publishing. [陈育新. 1990. 中国水禽. 北京: 中国农业出版社.]
- Cheng TH. 1979. Anser indicus[M]// Fauna Editorial Committee Academia Sinica. Fauna Sinica: Aves. Beijing: Science Press, 39-43. [1979. 郑作新. 斑头雁. 见: 郑作新. 中国动物志: 鸟纲. 北京: 科学出版社, 39-43.]
- Danchin E, Wagner RH. 1997. The evolution of coloniality: the emergence of new perspectives[J]. *Trends Ecol Evol*, **12**(9): 342-347.
- Dobson A. 2003. Metalife![J]. *Science*, **301** (5639) : 1488-1489.
- Fox CW, Mousseau TA. 1998. Maternal effects as adaptations for transgenerational phenotypic plasticity in insects[M]// Mousseau TA, Fox CW. *Maternal Effects as Adaptations* New York: Oxford University, 159-177.
- Grindstaff JL, Brodie ED, Ketterson ED. 2003. Immune function across generations: integrating mechanism and evolutionary process in maternal antibody transmission[J]. *Proc R Soc Lond B*, **270**(1531): 2309-2319.
- Heller E.D., Leitner G, Drabkin N. 1990. Passive-immunization of chicks against escherichia-coli[J]. *Avian Pathol*, **19**(2): 345-354.
- Huang JW, Mao GN, Ma WM, Zhu XD, Wang X, Zhao Zh, Li LZ. 2004. Correlation between avian influenza virus antibody in serum of chickens and that in yolk[J]. *Chn J Vet Sci Technol*, **34**(5): 65-67. [黄建文, 毛跟年, 马秋明, 何维明, 朱旭东, 王霞, 赵卓, 李联正. 2004. 蛋鸡血清与卵黄中禽流感病毒抗体的相关性. 中国兽医科技, **34**(5): 65-67.]
- Keck LD, Skeeles, JK, McNew RW. 1993. Antibody detection in matched chicken sera and egg-yolk samples by commercial enzyme-linked-immunosorbent-assay kits for Newcastle-disease virus, infectious-bronchitis virus, infectious bursal disease virus, and avian reovirus[J]. *Avian Dis*, **37**(3): 825-828.
- Kowalczyk K, Daiss J, Halpern J, Roth TF. 1985. Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken[J]. *Immunology*, **54**(4): 755-762.
- Liu J, Xiao H, Lei F, Zhu Q, Qin K, Zhang XW, Zhang XL, Zhao D, Wang G, Feng Y, Ma J, Liu W, Wang J, Gao GF. 2005. Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory Birds[J]. *Science*, **309** (5378) : 1206.
- Lobato E, Moreno J, Merino S, Sanz J, Arriero E, Morales J, Tomas G, Puente JMD. 2006. Maternal clutch reduction in the pied flycatcher *icedula hypoleuca*: an undescribed clutch size adjustment mechanism[J]. *J Avian Biol*, **37**(6): 637-641.
- Longini IM, Nizam A, Xu Shufu, Ungchusak K, Hanshaoworakul WA, Cummings DA, Elizabeth MH. 2005. Containing pandemic influenza at the source[J]. *Science*, **309**(5737): 1083-1087.
- Muller W, Groothuis TGG, Dijkstra C, Siitari H, Alatalo RV. 2004. Maternal antibody transmission and breeding densities in the Black-headed Gull *Larus ridibundus*[J]. *Funct Ecol*, **18**(5): 719-724.
- Tizard I. 2002. The avian antibody response[J]. *Semin Avian Exotic Pet Med*, **11**(1): 2-14.
- Vaught JB. 2006. Blood collection, shipment, processing, and storage[J]. *Cancer Epidem Biomarker Prev*, **15**(9): 1582-1584.
- Wang GH. 2004. Development of Vaccines and Diagnostic Methods for Avian Influenza Epidemic Isolates[D]. Master thesis, College of Veterinary Medicine Huazhong Agricultural University, Wuhan, China. [王贵华. 2004. 禽流感流行毒株疫苗研制及诊断方法的研究, 硕士论文, 华中农业大学动物医学院, 武汉.]
- Weigmann C, Lamprecht J. 1991. Intraspecific nest parasitism in Bar-headed geese, *Anser indicus* [J]. *Anim Behav*, **41**(4): 677-688.
- Xi WP, Li JX, Yue JX. 2007. Studies on the Decreasing and Increasing Rule of Serum-antibody and Yolk-antibody Titers in Laying Hens Vaccinated with Avian Influenza Oil-emulsion Killed Bivalent Vaccines[J]. *Chn Anim Husb Vet Med*, **34**(1): 103-105. [席文平, 李吉轩, 岳建新, 闫若潜. 2007. 禽流感血清抗体与卵黄抗体消长规律比较研究. 中国畜牧兽医, **34**(1): 103-105.]
- Xia GZ, Zhang JD, Sun ZW. 1988. Compare assay of detecting HI antibody to New Castle Virus in serum and yolk with chloroform.[J] *Chn Agr Sci Bull*, (3): 10-11. [夏广忠, 张嘉栋, 孙振维. 1988. 血清与氯仿处理卵黄测定鸡新城疫 HI 抗体的对比试验. 中国农学通报, (3): 10-11.]
- Yasuda M, Furusawa S, Matsuda K et al, 1998. Development of maternal IgG-free chick obtained from surgically bursectomized hen [J]. *Comp Immunol Microbiol Infect*, **21**(3): 191-200.
- Zhen J, He YB. 2006. Considerations on Prevention and Control of Avian Influenza Epidemic Situation of Wild Birds in Qinghai Lake Region [J]. *Chn Wildlife*, **27**(5): 19-21 [郑洁, 何玉邦. 2006. 对青海湖区鸟类禽流感疫情防控的几点思考. 野生动物杂志, **27**(5): 19-21.]