

文章编号: 1000-7423(2009)-06-0527-04

【综述】

鸡卵黄免疫球蛋白在医学领域中的应用

蔡玉春, 陈家旭*

【摘要】 卵黄免疫球蛋白 (egg yolk immunoglobulin, IgY) 是鸟类、两栖类和爬行类动物的主要免疫球蛋白。IgY 稳定性好, 具有不激活补体系统、不与类风湿因子和蛋白 A、G 结合等免疫学特性, 且产量高、易提取纯化。该蛋白已广泛应用于兽医学、功能食品和生物制品等方面, 且在疾病预防控制和治疗方面开发潜力广阔。本文就从 IgY 在生物学特性、提取、纯化, 以及其在免疫诊断和免疫治疗方面的应用作一综述。

【关键词】 卵黄免疫球蛋白; 免疫; 制备; 诊断; 治疗

中图分类号: R3 文献标识码: A

Chicken Egg Yolk Immunoglobulin and its Application in Medicine

CAI Yu-chun, CHEN Jia-xu*

(National Institute of Parasitic Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Key Laboratory of Parasite and Vector Biology, Ministry of Health, WHO Collaborating Centre for Malaria, Schistosomiasis and Filariasis, Shanghai 200025, China)

【Abstract】 Egg yolk immunoglobulin (IgY) is a major immunoglobulin from birds, amphibians and reptiles. IgY does not activate mammalian complement system, and does not bind to mammalian rheumatoid factors, protein A or G. In addition, it has a high yield, and is easy to extract and purify. With these advantages, IgY has been widely used in veterinary science, functional food and bio-products, and proved potential application for disease control and treatment. This paper reviews biological characteristics of IgY, its extraction, purification, and application in immunodiagnosis and treatment.

【Key words】 Egg yolk immunoglobulin (IgY); Immunization; Preparation; Diagnosis; Treatment

Supported by the National Key Technology R&D Program (No. 2008BAI56B03)

* Corresponding author, E-mail: chenjiayu@yahoo.com

1893 年 Klemperer 提出母鸡血清中的抗体可通过产卵方式传给后代, 在胚胎发育早期作为主要的免疫球蛋白为雏鸡提供被动的免疫保护。因该抗体蛋白与哺乳动物 IgG 分子类似, 故称其为鸟类 IgG。而 1969 年 Leslie 等^[1] 的实验证明, 鸟类 IgG 与哺乳动物 IgG 的分子不同, 所以又提出了卵黄免疫球蛋白 (Egg yolk immunoglobulin, IgY) 这个概念。由于当时 IgY 提取困难, 故未受到重视。直到 1990 年后, Akita 等^[2] 建立了水稀释法, 使 IgY 的提取变得简单易行, 从而掀起了 IgY 制备和应用的热潮。鉴于 IgY 具有产量高、稳定性好、免疫学特性独特, 以及动物种系发生学距离远等优点, 该蛋白被称为最具潜力的哺乳动物抗体替代品。1996 年欧洲实验方法替换确认中心 (European

Centre for the Validation of Alternative Method, EC-VAM) 推荐使用 IgY 替代哺乳动物 IgG。1999 年出于对动物保护的考虑, IgY 技术被瑞士联邦政府接受。德国、日本、瑞典和南非等国家对 IgY 的研究也明显领先, 这些研究进展将使多克隆抗体的生产进入无害化、易操作的新时代, 鸡也被称作新一代的抗体“加工厂”^[3]。

1 IgY 的生物学特性

1.1 分子特征 两栖类、爬行类和鸟类等脊椎动物均可产生 IgY。IgY 是一种系统型抗体, 可根据抗原分子的大小结合 1~2 个抗原, 显示为单价或二价。IgY 相对分子质量 (M_r) 为 180 000, 沉降系数约为 7.8, 包含 2 个重链 (H) 和 2 个轻链 (L), 重链相对分子质量为 M_r 68 000, 比 IgG (H, M_r 50 000) 稍重^[4]。基因重排和体细胞突变是哺乳动物抗体多样性的主要原因。而在鸡体内抗体的多样性主要是基因转换^[5]、编

基金项目: 国家科技支撑计划 (No. 2008BAI56B03)

作者单位: 中国疾病预防控制中心寄生虫病预防控制所, 卫生部寄生虫病原与媒介生物学重点实验室, 世界卫生组织疟疾、血吸虫病和丝虫病合作中心, 上海 200025

* 通讯作者, E-mail: chenjiayu@yahoo.com

码轻重链可变区的 V-J 基因片段的灵活连接^[6]和体细胞点突变^[7]。与哺乳动物不同,在鸡体内 D 基因以 16 个基因成簇存在,仅有 1 个有功能的 VH 或 VL 基因,但 IgY 却有 25 个缺乏转录调节和信号识别序列的假 V 基因,在未成熟 B 细胞迁移到法氏囊后,即在孵化后约 15~17 d,启动基因超级转换,在这一过程中,假 V 基因与重组可变区连接形成成熟的 B 细胞,从而形成有功能的体液免疫系统^[8]。

1.2 理化性质 IgY 为可溶性蛋白,亲水性比 IgG 好,且等电点较 IgG 低,约为 5.2。IgY 化学性质稳定:①耐酸性好,pH 值<3 时失活;②耐碱;③稳定性好,在 pH 8 时,IgY 与乳剂的复合物稳定性很好,可作为制备亲和层析柱纯化所需蛋白。Akita 等^[2]使用 IgY 制备的亲和层析柱分离乳清和初乳中的 IgG,1 年多使用 50 余次,其结合力仅略有降低;④热稳定性好,巴氏消毒不会使其失活,-30℃和 45℃亦不能使其变性。有研究表明,高糖溶液可有效提高 IgY 在高温(75~80℃)、高压(5 000 kg/cm²)和低 pH 值(pH 3)环境中的稳定性^[9]。

1.3 免疫学特性 Kronvall 等^[10]和 Åkerström 等^[11]分别证明,IgY 不与蛋白 A 和蛋白 G 结合,是单克隆抗体和多克隆抗体检测的有力工具。20 世纪 90 年代,研究者又发现 IgY 的其他免疫学特性:①不与类风湿因子结合。类风湿因子是一种自身抗体,可与 IgG 的 Fc 片段结合,产生假阳性反应。类风湿因子的干扰使免疫测定中易产生交叉反应。Larsson 等^[12]利用夹心 ELSIA 证明,类风湿因子不与 IgY 结合,使用 IgY 作免疫检测可避免假阳性。②不激活补体系统。新鲜的血清样品均含未激活的补体系统,通常 IgG 会激活补体系统,激活的补体组分与抗体结合,阻碍了抗体结合表位。而 IgY 则不激活补体系统,使用 IgY 可避免补体系统对固相免疫测定的干扰^[12]。③不结合细菌和哺乳动物细胞表面 Fc 受体,使得 IgY 在双重免疫组化方面比 IgG 更具优势^[13]。④与 IgG 几乎无交叉反应,常用于循环复合物的测定^[14]。⑤使用少量抗原即可产生大量抗体。高度保守的哺乳动物蛋白在兔中不能引起免疫应答,但在鸟类中却很容易获得抗这些蛋白的抗体。对各种哺乳动物的抗原均有效,如总量 30~475 μg 增殖细胞核抗原可产生鸡抗弱免疫原性 RNA 多聚酶 II 的抗体^[15]。

2 IgY 的制备

2.1 IgY 的来源和产量 IgY 来源于鸡卵黄。与哺乳动物(兔、牛等)相比,产蛋母鸡成本低,是有效的多克隆抗体生产者。Li 等^[12]研究证实,卵黄的重量与

母鸡产蛋天数的百分比是 IgY 产量的 2 个重要因素。单冠白来航鸡因其卵黄重量较重和产蛋天数较长,所以比其他鸡更具优势。母鸡初次免疫 10 d 后,即可获得高滴度的抗体,且效价稳定,可持续 6~28 周。另外,免疫鸡的饲养简单,花费少,且符合 3R [替代(replacing)、减少(reducing)、改善(refining)] 的动物保护原则^[17]。IgY 在鸡卵黄中的浓度约为 5~20 mg/ml,每枚鸡卵黄中可提纯 100~150 mg,12 枚鸡卵黄约可提纯 1 g 的 IgY,与 100 ml 血清中所含 IgG 的含量相当。每只母鸡每年可产卵 280 枚,即可生产约 40 g 的 IgY;而每只兔每 2~3 周抽血 1 次,一年仅可生产 1.3 g 抗体,所以 1 只鸡的年产蛋量所获得的 IgY 可相当于 40 只兔的年产抗体量。

2.2 提取与纯化 IgY 的分离、纯化难问题曾一度制约其广泛应用,主要原因是难以去除高浓度的脂类。鸡卵黄中包含 15.7%~16.6% 的蛋白、31.8%~35.5% 的脂类和 0.2%~1.0% 的碳水化合物。所有脂类均以不溶性的脂蛋白形式存在。水溶性蛋白包括 γ-活性蛋白、α-活性蛋白(鸡血清蛋白)、β-活性蛋白(α₂-蛋白)、高密脂蛋白和低密脂蛋白。IgY 属水溶性蛋白,而卵黄中的高含量脂蛋白不溶于水,根据相似相溶原理,用 pH 5.0~5.2 的双蒸水稀释卵黄,初步将水溶性蛋白与非水溶性脂蛋白分离,冷冻后在 4℃缓慢融化,使脂蛋白凝集,加速 IgY 的溶解并使其保留在水相中,该法即为水稀释法^[18]。国内研究者^[19]通过对影响卵黄除脂主要因素的研究,认为用 pH 5.2 双蒸水 1:7 稀释,4℃过夜,冻融 2 次除脂效果最好。粗提纯 IgY 最简单有效的纯化方法是硫酸盐沉淀法,再用聚乙二醇 6000 浓缩即可获得较高的回收率。其他较好的纯化方法还有正辛酸(一种有机酸)-硫酸铵沉淀法^[20],先加入正辛酸,在酸性条件下(pH 4.5)使卵黄中的大分子杂蛋白沉淀并去除,后加入硫酸铵即可使 IgY 抗体沉淀,从而得到纯化。

2.3 免疫方法 常用免疫方法有皮下、肌肉、静脉注射或几种方法联合使用。静脉注射时最好不加佐剂^[21],抗原剂量为 10~1 000 μg 效果最好。为符合动物保护原则,近年来许多研究者提倡用霍乱毒素 B 亚单位和天然柔肌素等佐剂与抗原混合后经口免疫动物,其效果与其他方法无差异,且能避免使用福氏完全佐剂和福氏不完全佐剂所引起的不良反应^[22]。

3 IgY 在医学领域中的应用

IgY 在人类医学、兽医学、食品科技和生物制剂等方面应用广泛。IgY 可作为特异抗体已成为医学领域中新的研究热点^[23-25]。

3.1 IgY 在疾病诊断中的应用

3.1.1 IgY 在疾病相关蛋白检测中的应用 血浆白蛋白 (HSA) 和 IgG 等 10 种高丰度蛋白约占血浆总蛋白的 90%，由于部分低丰度蛋白很可能是癌症、心肌梗塞等重大疾病的关键指示分子。如何去除高丰度蛋白，检出低丰度蛋白，在疾病的早期诊断和疗效考核中具有重要意义。制备抗 HSA 和 IgG 的鸡卵黄抗体 (IgY)，金磁微粒载体固定，可特异结合 HSA 和 IgG，以便除去血浆中大部分的 HSA 和 IgG，使低丰度蛋白富集，有效提高低丰度蛋白的检出率，这为血浆蛋白质组学研究提供了一种新的方法^[26]。

Hb Bart'S 胎儿水肿综合征是最严重的一种 α 型地中海贫血病。从该病患者的红细胞溶解液中提取 γ 链四聚体 (γ_4 , Hb Bartt'S)，免疫鸡获得特异 IgY 抗体，该抗体可特异结合 γ 球蛋白、Hb Bartt'S 和血红蛋白 F，用直接 ELISA 检测 336 份人红细胞溶血产物，其敏感性高达 100%，特异性为 96%，比传统渗透脆性试验法的特异性 (约 86%) 高。该方法的建立有利于在地中海贫血病流行的国家简单快速的检测 α 型地中海贫血病^[27]。

3.1.2 IgY 在病原体检测中的应用 疗效考核是目前日本血吸虫病免疫诊断的瓶颈，建立有效的评价方法是寄生虫学界广泛关注的问题^[28]。近两年已有研究者使用 IgY 以改进血吸虫病免疫诊断方法。即用纯化的抗可溶性虫卵抗原 (SEA) 的 IgY 为捕捉抗体，以酶标抗 SEA 单克隆抗体为检测抗体的双抗体夹心酶联免疫吸附试验 (S-ELISA) 检测急性血吸虫病患者、慢性血吸虫病患者和健康人的血清，其中急性血吸虫病患者和慢性血吸虫患者的血清循环抗原的阳性率分别为 100% (9/9) 和 84.4% (38/45)，特异性为 96% (48/50)^[29]。而常用的间接血清凝集试验 (IHA) 的敏感性和特异性分别为 69.6% 和 89.4%^[30]。可见前者比后者更具敏感性和特异性，为解决血吸虫病疗效考核的问题带来了希望。

3.2 IgY 在疾病预防和治疗中的应用

3.2.1 IgY 在胃肠道疾病中的应用 最新研究显示，通过口服抗菌抗体或抗病毒抗体可替代抗生素药物而有效预防胃肠道感染。但传统的抗体生产工艺复杂，价格昂贵。而 IgY 因其来源便宜、易制备、稳定性好、耐酸和耐胃蛋白酶等优点成为制备口服抗体的最佳选择。如轮状病毒是致婴幼儿秋冬季腹泻的主要病原体，全球每年约有 100 万儿童患轮状病毒性腹泻，至今尚缺乏有效的治疗手段。新药百贝宁主要成分是抗轮状病毒抗体 (IgY)，治愈率高达 88.9%，在临床应用未发现不良反应^[31]。

3.2.2 IgY 在呼吸道传染病中的应用 Nilsson 等^[32]

在瑞典对 17 例胆囊纤维症患者给予口服 IgY 以预防铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)，通过长达 12 年的观察，发现 17 人中仅有 2 人有铜绿假单胞菌慢性植入情况，而对照组 23 人中却有 7 人。所有实验组患者肺功能均正常，且身体质量指数正常或接近正常。表明抗铜绿假单胞菌的特异 IgY 能有效预防铜绿假单胞菌引起的呼吸道感染。

3.2.3 IgY 在抗蛇毒中的应用 毒蛇咬伤是危害人类健康的世界性问题和重要急症之一。蛇伤诊断及蛇毒检测常用哺乳动物源性 IgG 类抗体，易产生假阴性或假阳性，诊断准确性低。目前，世界抗蛇毒血清专家^[33]已制备了抗响尾蛇毒和竹叶青蛇毒等多种蝰蛇科蛇毒的 IgY 抗体，与现有的抗蛇毒马血清 IgG 相比，IgY 更具特异性强、过敏性小等优点，因此，IgY 可能成为一类新型的特效蛇伤诊断治疗药物。

4 结语和展望

经过 20 多年的发展，IgY 已在世界范围引起重视。国内外研究文献数量不断增多，IgY 的应用也日益广泛。特异 IgY 的制备为治疗和诊断各类疾病提供了新的思路。在免疫诊断方面，IgY 是传统哺乳动物抗体最好的替代品，它改进了现代免疫诊断检测方法，已在蛋白质印迹分析、免疫组化、胶体金标记和免疫电泳等检测方法中广泛应用。值得一提的是免疫诊断在寄生虫病预防控制中发挥着不可替代的作用，而 IgY 抗体的应用将使其发挥更好的作用。在免疫治疗方面，IgY 是抗生素药物最好的替代品，在寻找药物靶位和肿瘤治疗中应用前景广阔，但在目前均处于实验研究阶段，距临床应用 (诊断和治疗) 还较遥远。作为口服药物怎样保证其完整地到达靶器官，适应胃肠道环境而发挥药效，是值得进一步研究的问题。

另外，鸡卵黄中可能携带有传染性疾病的病原，是否对人体存在潜在的威胁，尚需进一步的实验研究加以论证。IgY 提取过程中脂类的去除仍需进一步改进。但相信，IgY 凭借其自身优势，将会在医学领域中发挥更大的作用。

参 考 文 献

- [1] Leslie GA, Clem LW. Phylogeny of immunoglobulin structure and function[J]. J Exp Med, 1969, 130(6): 1337-1352.
- [2] Akita EM, Nakai S. Immunoglobulins from egg yolks; isolation and purification[J]. J Food Sci, 1992, 57(3): 629-634.
- [3] Van Nguyen S, Umeda K, Yokoyama H, et al. Passive protection of dogs against clinical disease due to canine parvovirus-2 by specific antibody from chicken egg yolk[J]. Can J Vet Res, 2006, 70(1): 62-64.
- [4] Warr GW, Magor KE, Higgins DA. IgY: clues to the origins of

- modern antibodies[J]. Immunol Today, 1995, 16(8): 392-398.
- [5] Reynaud CA, Anquez V, Grimal H, *et al.* A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire[J]. Cell, 1987, 48(3): 379-388.
- [6] McCormack WT, Tjoelker LW, Barth CF, *et al.* Selection for B cells with productive IgL gene rearrangements occurs in the bursa of *Fabricsius* during chicken embryonic development[J]. Genes Dev, 1989, 3(6): 838-847.
- [7] Parvari R, Ziv E, Lantner F, *et al.* Somatic diversification of chicken immunoglobulin light chains by point mutations[J]. Proc Natl Acad Sci, 1990, 87(8): 3072-3076.
- [8] Masteller EL, Lee KP, Carlson LM, *et al.* Expression of sialyl Lewis(x) and Lewis(x) defines distinct stages of chicken B cell maturation[J]. J Immunol, 1995, 155(12): 5550-5556.
- [9] Shimizu M, Nagashima H, Hashimom K, *et al.* Egg yolk antibody (IgY) stability in aqueous solution with high sugar concentrations[J]. J Food Sci, 1994, 59(4): 763-765.
- [10] Kronvall G, Seal US, Svensson S, *et al.* Phylogenetic aspects of staphylococcal protein A-reactive serum globulins in birds and mammals[J]. Acta Path Microbiol Scand Section B, 1974, 82(1): 12-18.
- [11] Åkerström B, Brodin Th, Reis K, *et al.* Protein G: A powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies[J]. J Immunol, 1985, 135(4): 2589-2592.
- [12] Larsson A, Karlsson-Parra A, Sjoquist J. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors[J]. Clin Chem, 1991, 37(3): 411-414.
- [13] Larsson A, Wejaker PE, Forsberg PO, *et al.* Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA[J]. J Immunol Methods, 1992, 156(1): 79-83.
- [14] Schmidt P, Erhard MH, Schams D, *et al.* Chicken egg antibodies for immunohistochemical labelling of growth-hormone and prolactin in bovine pituitary gland [J]. J Histochem & Cytochem, 1993, 41(9): 1441-1446.
- [15] Carroll SB, Stollar BD. Antibodies to calf thymus RNA polymerase II from egg yolks of immunized hens [J]. J Biol Chem, 1983, 258(1): 24-26.
- [16] Li X, Nakano T, Sunwoo HH, *et al.* Effects of egg and yolk weights on yolk antibody (IgY) production in laying chickens[J]. Poultry Sci, 1998, 77(2): 266-270.
- [17] Schade R, Staak C, Hendriksen C, *et al.* The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY[J]. ATLA, 1996, 24(1): 925-934.
- [18] Akita EM. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from egg laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain[J]. J Immunol, 1993, 160(2): 207-214.
- [19] Liu Y, Wang YH, Wang DQ, *et al.* Study on the conditions of freeze-thaw method to removal lipids in IgY[J]. Chin J Biol, 2006, 19(5): 534-536. (in Chinese)
(刘颖, 王玉华, 王冬倩, 等. IgY 的冻融法脱脂条件研究[J]. 中国生物制品学杂志, 2006, 19(5): 534-536.)
- [20] Ruan GP, Ma L, He XW, *et al.* Efficient production, purification, and application of egg yolk antibodies against human HLA-A*0201 heavy chain and light chain(β 2m)[J]. Protein Expr Purif, 2005, 44(1): 45-51.
- [21] Calzado EG, Garrido RMG, Schade R. Human haemoclassification by use of specific yolk antibodies obtained after immunization of chickens against human blood group antigens [J]. ATLA, 2001, 29(6): 717-726.
- [22] Hedlund GB, Hau J. Oral immunisation of chickens using cholera toxin B subunit and Softigen as adjuvants results in high antibody titre in the egg yolk[J]. J In Vivo, 2001, 15(5): 381-384.
- [23] Schade R, Calzado EG, Sarmiento R, *et al.* Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine[J]. Altern Lab Anim, 2005, 33(2): 129-154.
- [24] Carlander D, Stalberg J, Larsson A. Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective[J]. Ups J Med Sci, 1999, 104(3): 179-189.
- [25] Malmarugan S, Raman M, Jaisree S, *et al.* Egg immunoglobulins—an alternative source of antibody for diagnosis of infectious bursal disease[J]. Veterinarski Arhiv, 2005, 75(1): 49-56.
- [26] Lin F, Huang JX, Chen C, *et al.* Preparation of hen egg yolk immunoglobulin and partial plasma high abundant protein depletion by prepared chicken immunoglobulin coupled on GoldMag carrier[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2008, 24(7): 706-709. (in Chinese)
(林芳, 黄建新, 陈超, 等. 鸡卵黄抗体的制备以及金磁微粒为载体去除人血浆部分高丰度蛋白的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24(7): 706-709.)
- [27] Jintaridith P, Srisomsap C, Vichittumaros K, *et al.* Chicken egg yolk antibodies specific for the γ chain of human hemoglobin for diagnosis of thalassemia [J]. Int J Hematol, 2006, 83(5): 408-414.
- [28] Wu GL. Review and prospect on immunodiagnosis developments of schistosomiasis japonica in China[J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2005, 23(5): 323-328. (in Chinese)
(吴金陵. 我国血吸虫病免疫诊断发展的回顾与展望[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005, 23(5): 323-328.)
- [29] Zhang WM, Wu YL, Liu WQ, *et al.* Preliminary study on detection of circulating schistosome antigen with anti-SEA chicken immunoglobulin Y[J]. Chin J Schisto Control, 2008, 20(1): 16-19. (in Chinese)
(张炜明, 吴玉龙, 刘文琪, 等. 卵黄抗体 IgY 检测血吸虫病人循环抗原的初步研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2008, 20(1): 16-19.)
- [30] Lin DD, Liu YM, Hu F, *et al.* Evaluation on application of common diagnosis methods for schistosomiasis japonica in endemic areas of China. I. Evaluation on estimation of prevalence of *Schistosoma japonicum* infection by IHA screening method[J]. Chin J Schisto Control, 2008, 20(3): 179-183. (in Chinese)
(林丹丹, 刘跃民, 胡飞, 等. 日本血吸虫病常用诊断方法应用价值的评估 I. IHA 筛查法对血吸虫病疫区人群感染率的评价[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2008, 20(3): 179-183.)
- [31] Zheng P, Sun XJ, Guo YH. Effect of anti-RV IgY therapy on infants with rotavirus enteritis[J]. Matern Child Hlth Care Chin, 2007, 22(29): 4108-4109. (in Chinese)
(郑平, 孙先军, 郭宇红. 抗轮状病毒免疫球蛋白治疗婴幼儿轮状病毒肠炎疗效观察[J]. 中国妇幼保健, 2007, 22(29): 4108-4109.)
- [32] Nilsson E, Larsson A, Olesen HV. Good effect of IgY against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients [J]. Pediatr Pulmonol, 2008, 43(9): 892-899.
- [33] Trampel DW, Zhou EM, Yoon KJ, *et al.* Detection of antibodies in serum and egg yolk following infection of chickens with an H6N2 avian influenza virus[J]. J Vet Diagn Invest, 2006, 18(5): 437-442.

(收稿日期: 2009-02-09 编辑: 杨频、盛慧锋)