

雏鸡免疫柔嫩艾美耳球虫早熟株和毒株的细胞免疫反应

李博 刘群 蒋金书

(中国农业大学 动物医学院,北京 100094)

摘要 AA肉鸡雏鸡分别经口免疫柔嫩艾美耳球虫毒株早熟株,用免疫组化ABC法染色检测小肠、盲肠扁桃体、脾脏中 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T淋巴细胞动态变化;用淋巴细胞转化实验MTT法检测T淋巴细胞活性。结果表明:球虫免疫鸡后, $CD4^+$ T淋巴细胞在一次免疫后迅速增殖,第6天达到第一峰,免疫柔嫩艾美耳球虫毒株的鸡盲肠与脾脏中 $CD4^+$ T淋巴细胞占有淋巴细胞百分率分别达到38%和44%,免疫早熟株的鸡盲肠与脾脏中 $CD4^+$ T淋巴细胞占有淋巴细胞百分率分别达到36%和43%,而二次免疫后和对照相比很少有显著差异。 $CD8^+$ T淋巴细胞在一次免疫后比 $CD4^+$ 增殖速度慢,第9天达到第一峰,免疫柔嫩艾美耳球虫毒株的鸡在此日盲肠与脾脏中 $CD8^+$ T淋巴细胞占有淋巴细胞百分率分别达到37%和47%,免疫早熟株的鸡在此日盲肠与脾脏中 $CD8^+$ T淋巴细胞占有淋巴细胞百分率分别达到36%和48%,二次免疫后迅速大量增殖,免疫柔嫩艾美耳球虫毒株的鸡在二免后第2天盲肠与脾脏中 $CD8^+$ T淋巴细胞占有淋巴细胞百分率分别达到39%和50%,免疫柔嫩艾美耳球虫早熟株的鸡在二免后第2天盲肠与脾脏中 $CD8^+$ T淋巴细胞占有淋巴细胞百分率分别达到37%和50%。且 $CD8^+$ T淋巴细胞总体水平比 $CD4^+$ T淋巴细胞多。盲肠扁桃腺中T细胞的增殖速度比其他组织更快。免疫早熟株的鸡与免疫毒株的鸡肠道黏膜中的 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T淋巴细胞变化基本一致。一次免疫鸡比未免疫对照T淋巴细胞活性显著升高;进行二免的鸡免疫后第一、二、三周T淋巴细胞活性均比未进行二免的鸡显著升高;毒株免疫鸡T淋巴细胞活性大多与早熟株免疫鸡无显著差异。

关键词 柔嫩艾美耳球虫;毒株;早熟株;细胞免疫;雏鸡

中图分类号 S855.9

文章编号 1007-4333(2004)02-0057-06

文献标识码 A

Immune responses in chickens against *Eimeria tenella*

Li Bo, Liu Qun, Jiang Jinshu

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract AA chickens were orally immunized with *Eimeria tenella* wild oocysts and its precocious oocysts twice. The oral infection and subsequent challenge with *Eimeria* oocysts effect on the populations of $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T lymphocytes in the intestine, cecal tonsils and spleen of chickens, which was assessed by immunohistochemistry. Lymphocyte proliferation assay was used for the assessment of cellular responses. The results showed that after primary infection $CD4^+$ cells increased immediately and significantly and reached peaked on 6th day, and the area positive of $CD4^+$ cells of intestine and spleen was 38% and 44% in chickens immunized with wild oocysts, and was 36% and 43% in chickens immunized with precocious oocysts. Whereas nonspecific increase post challenge was found. The rapid and considerable increase of $CD8^+$ cells occurred post challenge, on day 2nd post challenge, the area positive of $CD8^+$ cells in intestine and spleen was 37% and 50% in chicken immunized with live oocysts, and was 39% and 50% in chickens immunized with precocious oocysts. No notable differences were observed between the immune responses against wild and precocious oocysts. The lymphocyte responses of immune chickens noticeably increased post infection than the control chicken. The response level of chickens post challenge was remarkably higher than the level without challenge. There was not significant difference between response level of chickens immunized with wild oocysts and chicken im-

收稿日期:2003-09-04

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170695)

作者简介:李博,硕士研究生;刘群,教授,通讯作者,主要从事兽医寄生虫学与兽医寄生虫病的研究。E-mail:qunliu@cau.edu.cn

mune with precocious oocysts.

Key words *Eimeria tenella*; wild oocysts; precocious oocysts; cell immunity; mucosal immunity; chickens

鸡球虫病分布广、危害大,造成一定的经济损失。由于传统药物防治有耐药性、残留等问题,疫苗预防球虫病逐渐受到关注,目前已有鸡球虫病活苗和早熟苗用于生产,二者效果相当,只是在安全性和免疫原性方面有一定的差异。造成这种差异的直接原因是早熟株与毒株发育过程的差别,但球虫是真核生物,它的免疫反应非常复杂,是多种因素共同作用的结果。已有的研究表明,肠道黏膜的细胞免疫在抗球虫免疫中起重要作用。本研究对鸡接种柔嫩艾美耳球虫早熟株和毒株后鸡肠道黏膜和免疫组织器官的T细胞亚群变化以及鸡体T淋巴细胞活性进行检测,比较球虫早熟株与毒株免疫后免疫细胞的变化以及二者间的差异,揭示早熟苗和毒苗免疫后机体免疫反应规律。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验AA肉鸡,0日龄自爱维茵家禽育种有限公司购入,饲养于无球虫环境中。

1.2 虫株

Eimeria tenella 北京株毒株:中国农业大学寄生虫教研组分离保存,潜隐期为144h;

E. tenella 早熟株:中国农业大学寄生虫教研组由*E. tenella*北京株选育而得,潜隐期为123h。实验用虫株为保存2个月内虫株。

1.3 免疫及取样设计

雏鸡7日龄分为3组,1组为不免疫对照组,2、3组分别用经口接种*E. tenella*毒株、早熟株每只各1000个孢子化卵囊进行第一次免疫;21日龄2组

和3组再各自分出一半雏鸡为4组和5组,分别经口免疫每只1000个*E. tenella*毒株、早熟株孢子化卵囊,即第二次免疫。分别于9,11,13,16,19,23,25,27,30,34和42日龄时做组织切片并ABC免疫组化染色;分别于7,14,21,28,35和42日龄时采血做淋巴细胞转化实验。

1.4 组织切片、染色、观察及计数

取雏鸡盲肠中部、盲肠扁桃体、脾脏,按常规制备冰冻切片。采用免疫组化ABC法,按VECTASTAIN ABC试剂盒使用说明书进行。数码相机连接显微镜与计算机观察, Magic软件计数固定大小区域CD4⁺、CD8⁺T细胞占有所有淋巴细胞比率。数据用SPSS软件处理。

1.5 淋巴细胞转化实验

采用MTT法检测T淋巴细胞活性。数据用SPSS软件处理。

2 试验结果

2.1 CD4⁺和CD8⁺T细胞动态变化

2.1.1 盲肠T淋巴细胞动态变化(图1) CD4⁺T淋巴细胞分布于盲肠肠绒毛固有层中,在免疫组化ABC法染色中呈黄色。免疫*E. tenella*毒株的鸡(2、4组)一免后CD4⁺T细胞迅速上升,第6天达最高峰,CD4⁺T细胞占有所有淋巴细胞的比率为38%,比对照组显著要高;进行二免(4组)与不进行二免的鸡二免后无显著差异。免疫*E. tenella*早熟株的鸡(3、5组)一免后CD4⁺T细胞迅速上升,第6天CD4⁺T细胞占有所有淋巴细胞的比率为36%,比对照显著高;进行二免的鸡(5组)二免后与不进行二

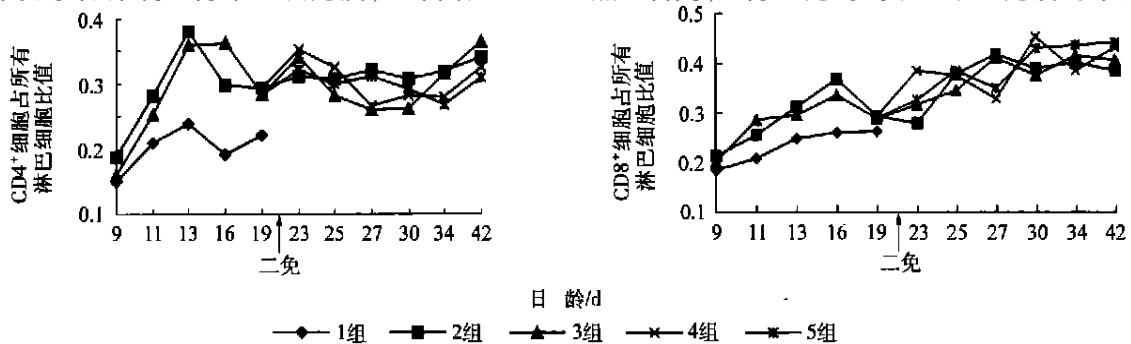


图1 肠道CD4⁺和CD8⁺T细胞变化

Fig. 1 Changes of CD4⁺ and CD8⁺T cell in intestine

免的鸡无显著差异。

CD8⁺T 淋巴细胞分布于盲肠肠绒毛上皮间和固有层中,在免疫组化 ABC 法染色中呈黄色。免疫 *E. tenella* 毒株的鸡(2、4 组)一免后第 9 天盲肠 CD8⁺T 淋巴细胞达峰值,CD8⁺T 细胞占有淋巴细胞的比率为 37%,比对照显著高;二免鸡(4 组)二免后 CD8⁺T 淋巴细胞迅速上升,第 2 天达到第一峰,CD8⁺T 细胞占有淋巴细胞的比率为 39%,第 9 天为最高峰,CD8⁺T 细胞占有淋巴细胞的比率为 45%,均比其他鸡高、差异显著。免疫早熟株的

鸡(3、5 组)一免后第 9 天 CD8⁺T 淋巴细胞达第一峰,CD8⁺T 细胞占有淋巴细胞的比率为 36%,比对照高,差异显著;二免鸡(5 组)二免后 CD8⁺T 淋巴细胞第 4 天达到第一峰,CD8⁺T 细胞占有淋巴细胞的比率为 37%,第 21 天达最高峰,CD8⁺T 细胞占有淋巴细胞的比率为 44%,比未进行二免的鸡显著高。

2.1.2 盲肠扁桃体 T 淋巴细胞动态变化(图 2)

CD4⁺、CD8⁺T 淋巴细胞大量分布于盲肠扁桃体的淋巴组织中。

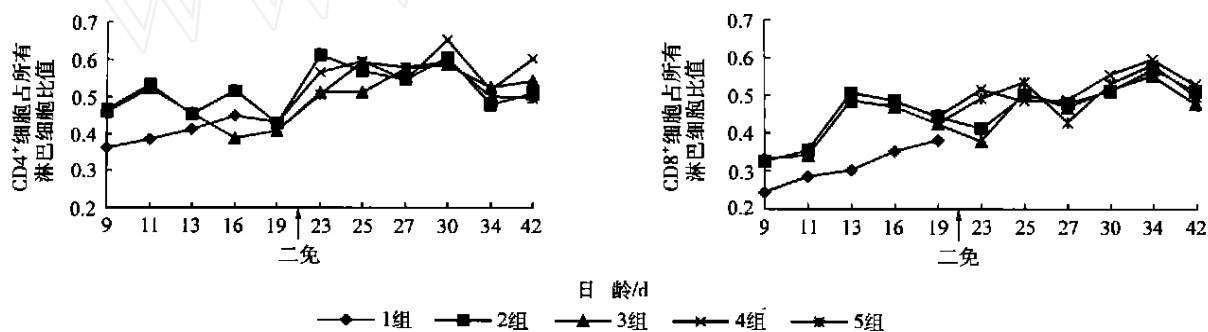


图 2 盲肠扁桃体 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞变化

Fig. 2 Changes of CD4⁺ and CD8⁺T cell in cecal tonsils

免疫 *E. tenella* 毒株的鸡(2、4 组)一免后 CD4⁺T 淋巴细胞迅速上升,免疫后第 2 天即比对照高,CD4⁺T 细胞占有淋巴细胞的比率为 46%,差异显著,第 4 天达到第一峰,CD4⁺T 细胞占有淋巴细胞的比率为 53%。进行二免的鸡(4 组)二免后 CD4⁺T 淋巴细胞第 21 天达峰值,CD4⁺T 细胞占有淋巴细胞的比率为 51%,比未进行二免的鸡高,差异极显著。免疫早熟株的鸡(3、5 组)一免后 CD4⁺T 淋巴细胞迅速上升,第 2 天即比对照高,CD4⁺T 细胞占有淋巴细胞的比率为 46%,差异显著,第 4 天达第一峰,CD4⁺T 细胞占有淋巴细胞的比率为 52%,一免后第 23 天达最高峰,CD4⁺T 细胞占有淋巴细胞的比率为 59%。

免疫 *E. tenella* 毒株的鸡(2、4 组)一免后第 6 天盲肠扁桃体 CD8⁺T 淋巴细胞达第一峰,其占有淋巴细胞的比率为 50%,比对照显著高。不进行二免的鸡(2 组)CD8⁺T 淋巴细胞于一免后第 27 天达到最高峰,CD8⁺T 细胞占有淋巴细胞的比率为 51%,进行二免的鸡(4 组)二免后第 2 天 CD8⁺T 细胞占有淋巴细胞的比率为 52%,比不进行免疫的鸡显著高。免疫早熟株的鸡(3、5 组)一免后 CD8⁺

T 淋巴细胞于第 6 天达第一峰,CD8⁺T 细胞占有淋巴细胞的比率为 49%,比对照显著高;进行二免的鸡(5 组)二免后第 2 天 CD8⁺T 细胞占有淋巴细胞的比率为 49%,比不进行二免的鸡显著高。

2.1.3 脾脏 T 淋巴细胞动态变化(图 3) CD4⁺、CD8⁺T 淋巴细胞主要分布于骨髓的动脉周围淋巴鞘和红髓的脾索内,在骨髓的动脉周围淋巴鞘中分布十分密集,在红髓脾索中呈散在分布。

免疫 *E. tenella* 毒株的鸡(2、4 组)一免后第 6 天脾脏 CD4⁺T 细胞达到第一峰,CD4⁺T 细胞占有淋巴细胞的比率为 44%,第 12 天 CD4⁺T 细胞占有淋巴细胞的比率为 41%,第 6 和 12 天比对照高,差异显著和差异极显著;进行二免的鸡(4 组)与未进行二免的鸡无显著差异。免疫早熟株的鸡(3、5 组)一免后第 6 天 CD4⁺T 细胞达到第一峰,CD4⁺T 细胞占有淋巴细胞的比率为 43%,第 12 天 CD4⁺T 细胞占有淋巴细胞的比率为 39%,第 6 和 12 天比对照高,差异显著和差异极显著;进行二免的鸡(5 组)与未进行二免的鸡无显著差异。

免疫 *E. tenella* 毒株的鸡(2、4 组)一免后第 9 天脾脏 CD8⁺T 细胞达到第一峰,CD8⁺T 细胞所占

有淋巴细胞的比率为47%,第12天 $CD8^+$ T细胞占所有淋巴细胞的比率为46%,第9和12天比对照高,差异极显著;进行二免的鸡(4组)二免后第2和9天 $CD8^+$ T细胞比未进行二免的鸡显著高,第2天 $CD8^+$ T细胞占所有淋巴细胞的比率为50%,第9天 $CD8^+$ T细胞占所有淋巴细胞的比率为59%。免疫早熟株的鸡(3、5组)一免后第9天脾脏 $CD8^+$ T细胞达到第一峰, $CD8^+$ T细胞占所有淋巴细胞的比

率为48%,第12天 $CD8^+$ T细胞占所有淋巴细胞的比率为45%,第9和12天比对照高,差异显著;进行二免的鸡(5组)第2、4和9天比未进行二免的鸡脾脏 $CD8^+$ T细胞高, $CD8^+$ T细胞占所有淋巴细胞的比率在第2、4和9天分别为50%、55%和56%,第2和4天差异显著,第9天差异极显著,第13天达最高峰。

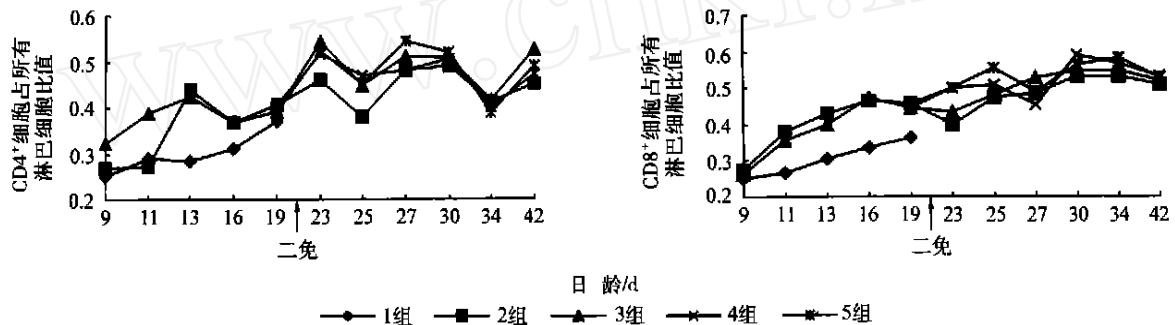


图3 脾脏 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T细胞变化

Fig. 3 Changes of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cell in spleen

2.2 T淋巴细胞活性变化(图4)

免疫 *E. tenella* 毒株的鸡(2、4组)一免后14和21日龄T淋巴细胞活性比对照高,差异极显著,反映T淋巴细胞活性的试验结果OD值分别为0.41和0.44;不进行二免的鸡(2组)T淋巴细胞活性于28日龄达最高峰,OD值为0.47,之后下降。进行二免的鸡(4组)二免后T淋巴细胞活性上升,35和42日龄均比未进行二免的鸡差异极显著,OD值分别为0.55和0.57,42日龄达到最高峰。免疫早熟株的鸡(3、5组)一免后上升,14和21日龄T淋巴细胞活性比对照高,差异极显著,OD值分别为0.43和0.47;未进行二免的鸡(3组)28日龄T淋巴细胞活性达最高峰,OD值为0.44;进行二免的鸡(5组)二免后T淋巴细胞活性上升,28、35和42日龄比未进行二免的鸡高,差异极显著,OD值分别为0.49,0.53和0.53。

3 结果与讨论

3.1 组织器官中 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T淋巴细胞动态变化

3.1.1 盲肠黏膜中 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T细胞动态变化
鸡免疫 *E. tenella* 毒株和早熟株后,盲肠黏膜中 $CD4^+$ T细胞在一免后迅速增殖,第6天达到第一

峰,二免后少有显著变化;而其中 $CD8^+$ T细胞在一免后比 $CD4^+$ 增殖速度慢,第9天达到第一峰,二免后迅速大量增殖,且 $CD8^+$ T细胞总体增殖水平显著高于 $CD4^+$ T淋巴细胞。 $CD4^+$ T淋巴细胞只存在于肠绒毛固有层中, $CD8^+$ T淋巴细胞在肠绒毛上皮和固有层中均有分布。这一结果与Lillehoj、Rothwell、Verveld、ShiMQ和史喜菊的研究结果相一致^[1-7],证实 $CD4^+$ T淋巴细胞主要在初次免疫中迅速反应,启动免疫应答,主要起免疫诱导、调节作用;而 $CD8^+$ T淋巴细胞有记忆功能,在再次免疫中大量增殖,直接杀灭靶细胞,是效应细胞。

免疫早熟株与毒株的鸡肠道黏膜中的 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T淋巴细胞变化基本一致,差异多不显著;这说明 *E. tenella* 的毒株和早熟株均能够在鸡肠道黏膜中引起有效的细胞免疫反应。这与Shirley、Millard、McDonald和刘群的报道一致^[8-12]。证实该选育的早熟株免疫后能够引起鸡肠道组织的细胞免疫反应。

球虫的孢子化卵囊被鸡吞食后,在肌胃中受机械性作用囊壁被破坏,释放出4个孢子囊,孢子囊在胆汁和酶的作用下子孢子逸出,侵入肠道绒毛部上皮细胞,巨噬细胞等抗原递呈细胞对子孢子抗原进行吞噬、加工,并递呈给辅助性T细胞,TH细胞对

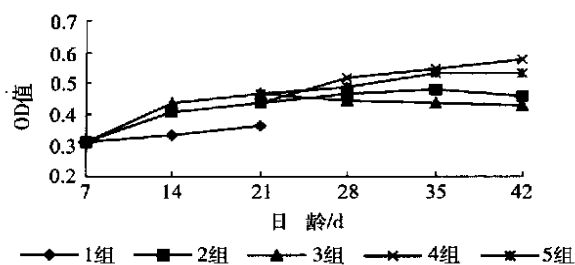


图 4 T 淋巴细胞活性

Fig. 4 Action of T lymphocytes

抗原进行识别后 (TH, 属 $CD4^+$ T 细胞亚群), 增殖、分化为效应性 TH 细胞, 并分泌一系列的细胞因子如 IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9 及 IFN- γ 等, 发挥 TH 细胞的诱导效应, 激活并增强细胞毒性 T 细胞 (Tc, 属 $CD8^+$ T 细胞亚群) 的增殖与发挥效应, 促进自然杀伤细胞的活性与肥大细胞的发育, 辅助 B 细胞分化并产生抗体, 协助迟发型变态反应型 T 细胞 (TD) 与巨噬细胞产生迟发型变态反应等。

细胞毒性 T 细胞被 TH 细胞及其产生的细胞因子激活并增殖、分化, 识别被球虫感染的细胞, 发挥细胞毒作用: 与靶细胞结合, 释放穿孔素导致靶细胞溶解和释放淋巴毒素诱导靶细胞自杀。由于细胞毒性 T 细胞在第一次球虫免疫后的分化增殖过程中有一部分细胞停留在分化中间阶段而不再往前分化, 成为记忆细胞, 在再次遇到相同球虫抗原时不需辅助性 T 细胞的刺激就可直接活化增殖、迅速反应、发挥免疫效应杀灭感染球虫的靶细胞, 所以是抵抗再次感染的主力。因为 $CD8^+$ T 细胞大量存在于肠绒毛上皮间和固有层之中, 直接发挥杀伤靶细胞的作用, 故而构成肠道抵抗外界抗原感染的第一道防线^[5,13,14]。

3.1.2 盲肠扁桃体中 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞动态变化 鸡免疫 *E. tenella* 后盲肠扁桃体中 $CD8^+$ T 细胞反应强烈, 这可能是因为 *E. tenella* 的寄生部位是盲肠黏膜, 与盲肠扁桃体联系紧密。

盲肠扁桃体中 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 淋巴细胞变化与肠道中的变化基本一致, 这与 Verveld 和史喜菊的研究结果一致^[4,7]。已有大量研究表明球虫感染后会引盲肠扁桃体淋巴细胞的增殖。盲肠扁桃体 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 淋巴细胞大量分布于盲肠扁桃体的淋巴组织中。以往的研究表明: 盲肠扁桃体是鸡肠相关淋巴组织最大的一部分, 由盲肠颈处的淋巴小结组合而成, 含有 B 细胞依赖型滤泡区、滤泡区之

间的 T 细胞及散在的巨噬细胞, 参与抗体产生和细胞介导的免疫功能, 对肠道内细菌和其它抗原物质起局部免疫的作用^[15]。

3.1.3 脾脏中 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 细胞动态变化 脾脏 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 淋巴细胞主要分布于骨髓的动脉周围淋巴鞘和红髓的脾索内, 其中尤以在骨髓的动脉周围淋巴鞘内分布十分密集, 在红髓的脾索中呈散在分布。这与以往研究的脾脏淋巴细胞分布相符。鸡免疫球虫后和脾脏中 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 淋巴细胞变化与肠道中变化大体一致, 这与 Lillehoj、Martin 和史喜菊的研究结果相一致^[7,16,17], 也与以往研究证明的脾脏对血液中的抗原产生免疫应答、在免疫反应中起重要作用相一致。

3.2 鸡体 T 淋巴细胞活性变化

T 淋巴细胞活性反映细胞免疫水平。免疫一次的鸡比未免疫对照细胞免疫水平显著升高, 免疫二次鸡比未进行二免鸡的 T 淋巴细胞活性显著升高, 这与 Martin、Lillehoj、Talebi、Rajat Carg 和 Goldova 的研究结果一致^[17~20], 证明细胞免疫在抗球虫免疫中起重要作用; 二次免疫在提高鸡体细胞免疫水平中起到重要作用, 因此鸡免疫球虫苗后必须有适当的重复感染才能不断增强免疫力。

鸡免疫不同 *E. tenella* 后, 免疫毒株的鸡细胞免疫水平与早熟株免疫鸡无显著差异, 与研究中肠道黏膜、盲肠扁桃体、脾脏中 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ T 淋巴细胞水平检测所得的结果一致; 这与 Shirley、Millard、McDonald 和刘群报道相符^[8~10,12]。说明早熟株在降低致病性的同时也能保持良好的免疫原性, 能够有效刺激鸡体细胞免疫水平。

参 考 文 献

- [1] Lillehoj H S, Bacon L D. Increase of intestinal intraepithelial lymphocytes expressing CD8 antigen following challenge infection with *Eimeria acervulina* [J]. Avian Diseases, 1991, 35:294 ~ 301
- [2] Lillehoj H S. $CD8^+$ T cell ~ coccidia interactions [J]. Parasitology Today, 1994, 10:1
- [3] Rothwell L, Robert A, Gramzinski M. Elaine rose & peter kaiser, Avain coccidiosis: changes in intestinal lymphocyte populations associated with the development of immunity to *Eimeria maxima* [J]. Parasite Immunology, 1995, 17:525 ~ 533
- [4] Vervelde L, Jeurissen S H. The role of intra ~ epithelial and lamina propria leukocytes during infection with

- Eimeria tenella*. [J]. Adv Exp Med Biol, 1995, 371B: 953 ~ 958
- [5] Lillehoj H S. Role of T lymphocytes and cytokines in coccidiosis [J]. International Journal for Parasitology, 1998, 28:1071 ~ 1081
- [6] Shi Meiqing, Huther S, Burkhardt E, Zahner H. Lymphocyte subpopulations in the caecum of rats after infections with *Eimeria separata*: early responses in naïve and immune animals to primary and challenge infections [J]. International Journal for Parasitology, 2001, 31:49 ~ 55
- [7] 史喜菊. *E. tenella* 感染雏鸡 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞的动态变化和母源免疫的研究 [D]. 太原:山西农业大学, 2001
- [8] Shirley M W, Millard B J. Studies on the immunogenicity of seven attenuated lines of *Eimeria* given as mixture to chickens [J]. Avian Pathology, 1986, 15:629 ~ 638
- [9] McDonald V, Shirley M W, Bellatti M A. *Eimeria maxima*: characteristics of attenuated lines obtained by selection for precocious development in the chicken [J]. Exp Parasitol, 1986, 61:192 ~ 200
- [10] McDonald V, Shirley M W. The endogenous development of virulent strains and attenuated precocious lines of *Eimeria tenella* and *E. necatrix* [J]. J Parasitology, 1987, 73:993 ~ 997
- [11] 刘群. 柔嫩艾美耳球虫早熟株选育及 RAPD 在鸡球虫种和株鉴定上的应用 [D]. 北京:中国农业大学, 1997
- [12] 刘群, 蒋金书. 三株柔嫩艾美耳球虫繁殖力和免疫原性比较 [J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 1998, 5(2):97 ~ 100
- [13] 杨汉春. 动物免疫学 [M]. 北京:中国农业大学出版社, 1996. 55 ~ 67
- [14] Lillehoj H S, Lillehoj E P. Coccidiosis. A review of acquired intestinal immunity and vaccination strategies [J]. Avian Diseases, 2000, 44:408 ~ 425
- [15] 马仲华. 家畜组织解剖学 [M]. 北京:中国农业出版社, 1987
- [16] Lillehoj H S. Intestinal intraepithelial and splenic natural killer cell responses to *Eimeria* infections in inbred chickens [J]. Infection and Immunity, 1989, 57(7): 1879 ~ 1884
- [17] Martin and Lillehoj. Antigen ~ specific T cell proliferation following coccidia infection [J]. Poultry Science, 1993, 72:2084 ~ 2094
- [18] Talebi A, Mulcathy G. Correlation between immune responses and oocyst production in chickens monospecifically infected with *Eimeria maxima*. [J]. Avian Pathology, 1995, 24:485 ~ 495
- [19] Rajat Carg, Banerjee D P, Gupta S K. Immune responses in chickens against *Eimeria tenella* sporozoite antigen [J]. Veterinary Parasitology, 1999, 81:1 ~ 10
- [20] Goldova M, Pisl J, Letkova V, et al. Cellular immunological responses of phasian during endogenous development of *Eimeria colchici*. [J]. Parasitology International, 2000, 49:147 ~ 154