Mecanismos inmunológicos de la coccidiosis aviar

EMILIO DEL CACHO

Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza

edelcach@unizar.es

Emilio del Cacho se licenció en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, obteniendo en 1990 el grado de Doctor en Veterinaria por esta misma Universidad. Se incorporó al Dpto. de Patología Animal de la Facultad de Zaragoza, donde ejerce como profesor titular desde 1997.

El Dr. del Cacho es especialista en parasitología, campo en el que ha desarrollado una intensa actividad investigadora, principalmente en coccidiosis aviar y en inmunidad de las aves frente a coccidios y otros parásitos. Hasta la fecha ha publicado 79 trabajos científicos en revistas internacionales, 18 artículos de divulgación, y presentado 85 comunicaciones a Congresos nacionales e internacionales, en su mayoría inscritos en los campos arriba indicados. Su línea de investigación actual se centra en el desarrollo de nuevas vacunas frente a la coccidiosis.

También ha desarrollado múltiples proyectos con la industria farmacológica, y ha ejercido actividades de asesoría en protocolos para pruebas clínicas de campo. Ha sido miembro del Comité de Gestión del Proyecto Europeo COST-857 y experto de la Agencia Española del Medicamento. También ha recibido diversas distinciones, como el Certificate of Appreciation por su destacada contribución en el campo de la Inmunología de la coccidiosis del Servicio de Investigación Agraria del Dpto. de Agricultura de EE.UU. (ARS-USDA) en 2006, y el Premio Coris Gruart por "Desarrollo de una vacuna frente a la coccidiosis aviar, constituida por células dendríticas", otorgado por la Facultad de Veterinaria de Zaragoza en 2009

RESUMEN

En este trabajo se describen las características más importantes de los mecanismos inmunológicos que se desencadenan en el curso de una infección por *Eimeria*. El conocimiento de estos mecanismos inmunológicos únicamente tiene una finalidad: Generar estrategias de inmunización frente a la coccidiosis. Por tanto aquí se expone el avance de los conocimientos inmunológicos en combinación con las estrategias de inmunización que han originado, y las nuevas tendencias en la inmunización de aves que pretenden activar y reforzar los mecanismos efectores de las células inmunocompetentes implicadas en la lucha frente a la coccidiosis aviar.

Palabras clave: *Eimeria*; respuesta inmune humoral; respuesta inmune celular

Immunological mechanisms against avian coccidiosis

SUMMARY

This paper describes the most important features of immunological mechanisms that are unleashed in the course of infection by Eimeria. Knowledge of these immunological mechanisms only has a purpose: to generate immunization against the coccidiosis. Therefore the advance of immunological knowledge is explained in combination with the resulting strategies of immunization. New trends for poultry immunization seeking to activate and strengthen the effector mechanisms in the immunocompetent cells involved in the fight against avian coccidiosis are also reflected.

Keywords: *Eimeria; humoral immune response; cellular immune response*

INTRODUCCIÓN

Durante mas de 50 años la coccidiosis aviar ha estado controlada mediante la administración de coccidiostáticos en el pienso de las aves. El rápido incremento en la producción de aves experimentado en los últimos años en todo el mundo se debe, sin ninguna duda, al éxito de los coccidiostáticos. Sin embargo, en la actualidad la coccidiosis es uno de los mayores problemas de la producción aviar en Europa. Este cambio es debido a la actitud de la Unión Europea frente a lo coccidiostáticos.

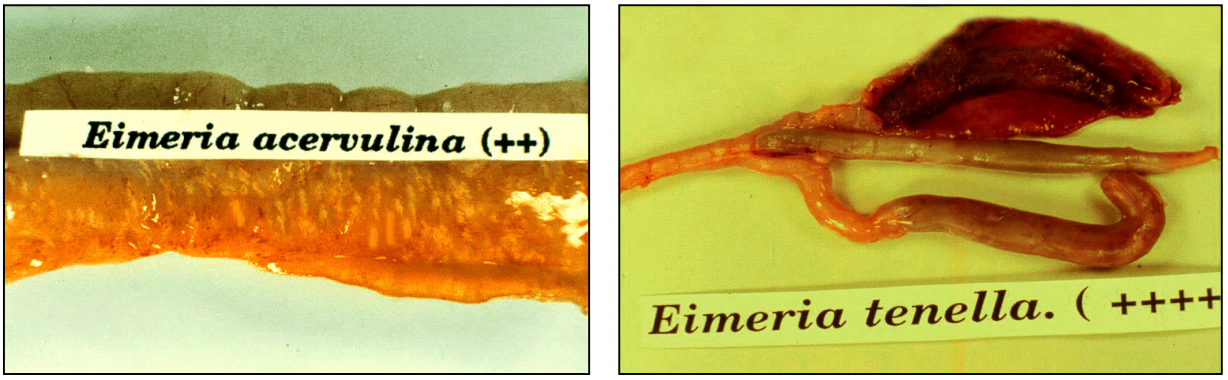
Los países pobres buscan la forma de producir carne barata para satisfacer las necesidades alimenticias de su población. Sin embargo, en los países ricos la preocupación es otra. En los países desarrollados existe una creciente preocupación sobre los efectos deletéreos de los productos químicos y farmacológicos utilizados en la producción de alimentos. La demanda de carne de animales alimentados sin productos farmacológicos ha obligado a la Unión Europea a considerar el cambio de denominación de los coccidiostáticos. De hecho, la Resolución del Parlamento Europeo Nº 1831/2003 establece que a partir del 31 de enero de 2012 todos los coccidiostáticos serán considerados como medicamentos, y por tanto no se podrán utilizar como aditivos en el pienso de las aves. Esto supondrá que la única forma de evitar la aparición de brotes de coccidiosis clínica será mediante la inmunoprofilaxis.

Por tanto se plantea una revolución en la producción aviar que conlleva un reto a escala global: El desarrollo de vacunas frente a la coccidiosis aviar.

¿ES POSIBLE FABRICAR UNA VACUNA FRENTE A LA COCCIDIOSIS?

Antes de planear estrategias de inmunización frente a un agente etiológico debemos conocer sus secretos más íntimos. La coccidiosis aviar es una de las enfermedades parasitarias producidas por el genero *Eimeria*. Se han descrito siete especies de *Eimeria* que desencadenan la coccidiosis del pollo y de la gallina (*E. tenella*, *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. brunetti*, *E. necatrix*, *E. praecox* y *E. mitis*). Todas las especies de *Eimeria* presentan un ciclo coccidial con dos multiplicaciones asexuadas (esquizogonia y esporogonia) y una multiplicación sexuada (gametogonia). Entre las especies de *Eimeria* existen numerosas diferencias biológicas que están relacionadas con el tamaño, el periodo de prepatencia, la localización del parásito en el intestino, la patogenicidad, el tipo de lesión, la capacidad de multiplicación, etc.

Figura 1. Lesiones producidas por *Eimeria acervulina* y *Eimeria tenella*
Las lesiones de *E. acervulina* se localizan en el duodeno y son placas blanquecinas con distribución escaleriforme. *E. tenella* produce una tiflitis hemorrágica con la formación de moldes cecales.



Esta diversidad biológica facilita el diagnóstico y la identificación del parásito. Pero dificulta, en gran medida, el desarrollo de vacunas, ya que se observa una gran variabilidad antigénica entre las especies. Esto se traduce en que la inmunidad es específica de especie, tan apenas hay inmunidad cruzada, y por tanto es necesario incluir antígeno de todas las especies de *Eimeria* frente a las que se desarrolla la vacuna. Además, la memoria inmunológica se pierde si el hospedador no mantiene un contacto prolongado con el parásito. Pero a pesar de estas dificultades la esperanza de desarrollar una vacuna frente a la coccidiosis se mantiene, ya que los animales que sobreviven a una infección con *Eimeria* desencadenan un estado de protección estable, duradero y eficaz.

RESPUESTA INMUNE HUMORAL

Es bien conocido que la infección por *Eimeria* desencadena la síntesis de anticuerpos frente al parásito. Sin embargo, durante muchos años se ha puesto en duda la eficacia de estos anticuerpos en la lucha frente a *Eimeria*. En 1965 Burns y Challey detectaron que la concentración de anticuerpos anti-*Eimeria* comenzaba a aumentar a lo largo de la primera semana post-infección, alcanzaba el máximo a la tercera semana, y se mantenía durante dos meses. Se comprobó que tanto la IgG como la IgA eran capaces de disminuir la capacidad de multiplicación del parásito. Además, los anticuerpos, constituidos por el isotipo IgG, una vez unidos a los esporozoítos y merozoítos desencadenan el sistema del complemento que produce la muerte del parásito (Long y Rose, 1972,: Tanielian *et al.*, 1976).

A tenor de estos datos se pensó en utilizar la capacidad del hospedador para sintetizar anticuerpos frente al parásito, con la finalidad de fabricar una vacuna. Una vacuna similar a las utilizadas en aquellos años frente a virus y bacterias y que tanto éxito demostraban. Estas vacunas estaban basadas en que los anticuerpos generados por el hospedador bloqueaban los receptores de superficie que el agente patógeno utiliza para penetrar en la célula. Puesto que no se conocían los receptores que el parásito utiliza para identificar e infectar la célula hospedadora, se aislaron moléculas antigénicas de la superficie de esporozoítos y merozoítos y se administraron como vacuna. Pero los parásitos no son como los virus, y el fracaso fue estrepitoso.

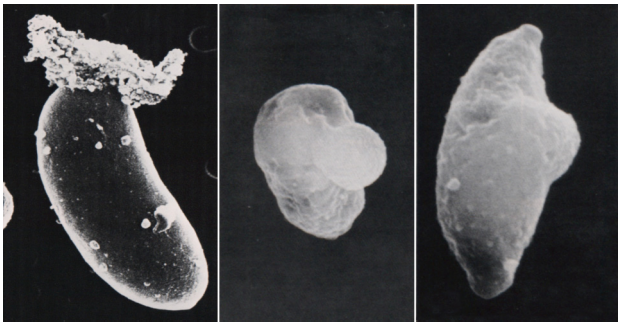


Figura 2. Esporozoítos que muestran alteraciones por activación del complemento debido a la presencia de inmunocomplejos

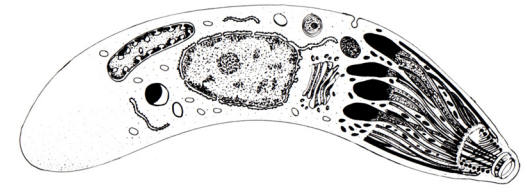


Figura 3. Esquema de un esporozoíto en el se observa la estructura del complejo a la apical en uno de los extremos

A partir de este intento una gran parte del esfuerzo investigador se dedicó a estudiar las características morfológicas de las fases infectantes, con la esperanza de conocer la forma en que el parásito penetra en la célula hospedadora. La idea de fabricar vacunas de subunidades se retomó en los años 70 con la descripción del complejo apical (Levine, 1969).

El complejo apical es la estructura que utilizan los merozoítos y los esporozoítos para penetrar en la célula hospedadora y formar la vacuola parasitófora. Se asilaron proteínas del complejo apical y se utilizaron para inmunizar pollos, con la esperanza de que los anticuerpos impidieran el correcto funcionamiento de este complejo órgano (Danforth, 1983). De nuevo la realidad demostró que la fortaleza que supone un ciclo coccidial no iba a ser vencida tan fácilmente.

Durante unos años se abandonó la idea de desarrollar una vacuna de subunidades. Pero ¿se habían elegido bien las fases parasitarias contra las que desarrollar una vacuna? El equipo de Wallach (Smith *et al.*, 1994) pensó en los gametos, más concretamente en los macrogametos. Aislaron diversas proteínas sintetizadas por el parásito para fabricar la pared del ooquistes y las utilizaron como antígeno. Se han realizado ensayos de esta vacuna en todo el mundo, utilizando más de 200 millones de pollos, y se ha comprobado que los anticuerpos producen una notable disminución en la eliminación de ooquistes. Los anticuerpos generados por los antígenos vacunales alteran la formación de la pared del ooquiste, y se produce la muerte del cigoto. El éxito es parcial, la vacuna reduce la producción de ooquistes entre el 58 y el 98% (Wallach *et al*., 2008), pero es la única vacuna de subunidades que se comercializa en la actualidad (CoxAvic, ABIC Biological Laboratories Ltd).

Figura 4. Imagen de un macrogameto obtenida mediante microscopía electrónica.
Los cuerpos formadores de la pared del ooquiste son las vesículas electrodensas,
que se localizan en la zona más periférica del macrogameto.

Los autores propusieron hacer del defecto virtud, sugiriendo inmunizar a las madres, para beneficiarse del hecho de que la inmunidad producida por la vacuna no es completa. Los pollitos nacen con anticuerpos maternales que los protegen parcialmente. Según los autores de la vacuna, es precisamente esta inmunización parcial la que les permite desarrollar un estado de protección total, sin experimentar un proceso clínico de coccidiosis. Los animales sufren infecciones naturales que no conllevan lesiones ni perdidas económicas, pero les permite desarrollar un estado de protección que dura toda su vida productiva. Es una estrategia de inmunización novedosa y prometedora. Sin embargo, necesita ser utilizada en diferentes sistemas de producción para conocer cuanto tiempo se mantiene, de forma eficaz, la inmunidad conferida por los anticuerpos maternales.

RESPUESTA INMUNE CELULAR

La importancia de la respuesta inmune celular, en la lucha frente a *Eimeria*, se acepto desde el momento en el que se publicaron los primeros indicios que demostraban que el parásito es capaz de activar diversas poblaciones de células inmunocompetentes (Rose, 1978). A partir de los años 80 la expansión del conocimiento de los mecanismos inmunológicos de los mamíferos ha sido espectacular. Sin embargo, en las aves la caracterización de las poblaciones de células inmunocompetentes, así como la descripción de sus funciones, ha sido mucho más lenta.

Pero el principal problema para comprender los mecanismos inmunológicos que se desencadenan frente a *Eimeria* es la falta de integración de los resultados que los diferentes equipos de investigación exponen en sus publicaciones. Se han descrito varios eventos celulares fundamentales en la lucha frente a *Eimeria*:

- Las células CD4 y CD8 son fundamentales en la lucha frente a *Eimeria*, pero necesitan dos infecciones para actuar eficazmente. Las CD4 se activan en una primo infección y sin embargo las CD8 ejercen su función citolítica en la segunda infección (Rose *et al*., 1992).

- En la lucha frente a *Eimeria* se ha comprobado que el incremento de la actividad citotóxica de las células inmunocompetentes esta relacionada con la presencia de anticuerpos (Zhang *et al*., 1995).

- Desde las primeras horas de la infección se sintetizan diversas citoquinas (IFN-γ, IL2, IL15, TGF-b y TNF-α) que dirigen la respuesta inmune humoral y celular (Lillehoj y Lillehoj, 2000).

A tenor de los datos expuestos se considera que el mecanismo más eficaz en la lucha frente a *Eimeria* es la citotoxicidad mediada por anticuerpos.

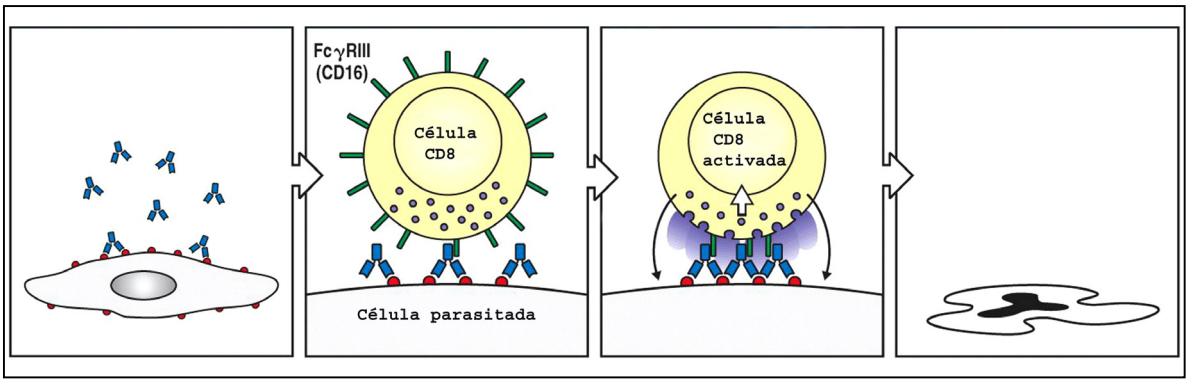


Figura 5. Mecanismo de la citotoxicidad mediada por anticuerpos que se desencadena mediante la formación de inmunocomplejos en la superficie de la célula parasitada. Los inmunocomplejos activan la capacidad citotóxica de las células inmunocompetentes.

En este mecanismo inmunológico es necesario que se expresen antígenos del parásito en la superficie de la célula hospedadora. A partir de estos antígenos se forman inmunocomplejos que son reconocidos por receptores FcγRIIB, expresados por una gran variedad de células inmunocompetentes que han sido activadas por INF-γ (Abbas *et al*., 2007). Una vez reconocida la célula parasitada, mediante los inmunocomplejos expresados en su superficie, las células inmunocompetentes activan sus mecanismos citotóxicos.

Las células CD8 producen la muerte de la célula parasitada mediante la liberación de moléculas apoptósicas como la granzima B. Sin embargo las células NK y los eosinófilos liberan proteínas, que inducen la formación de microporos en la membrana o que producen un estado de intoxicación celular que conlleva la muerte de la célula.

Ahora que conocemos el mecanismo inmunológico de la citoxicidad mediada por anticuerpos podemos explicar porqué las vacunas de parásito vivo son las únicas que han funcionado de forma aceptable hasta el momento. Son las únicas vacunas existentes en la actualidad que activan, de forma sincronizada, la respuesta inmune humoral y celular. Como consecuencia desencadenan la citoxicidad mediada por anticuerpos que muestra su mayor eficacia en la destrucción de los esquizontes.

La vacunación, que es el primer contacto con el parásito, desencadena la activación de las células CD4 y la síntesis de anticuerpos. En las posteriores reciclaciones de los ooquistes vacunales se activa la citotoxicidad mediada por anticuerpos. Las vacunas constituidas por parásito vivo patógeno o atenuado necesitan la multiplicación de los ooquistes vacunales y dos reciclaciones posteriores para desarrollar un estado de inmunidad eficaz (Shirley y Bedrnik, 1997).

Por tanto los animales inmunizados no son capaces de resistir una infección por *Eimeria* hasta la tercera semana post-vacunación. Pero además es necesario que las condiciones de la cama permitan la esporulación de los ooquistes y que los animales vacunados puedan ingerirlos. Hasta el momento no está claro cuánto dura la memoria inmunológica adquirida mediante este tipo de vacunas, pero nuestros resultados sugieren que se pierde casi completamente si el animal no se relaciona con el parásito durante 3-4 semanas. Por tanto, a pesar de su eficacia, es evidente que las vacunas constituidas por parásito vivo presentan problemas, a veces importantes, a la hora de ser utilizadas en la avicultura comercial, especialmente en la producción de pollos de carne.

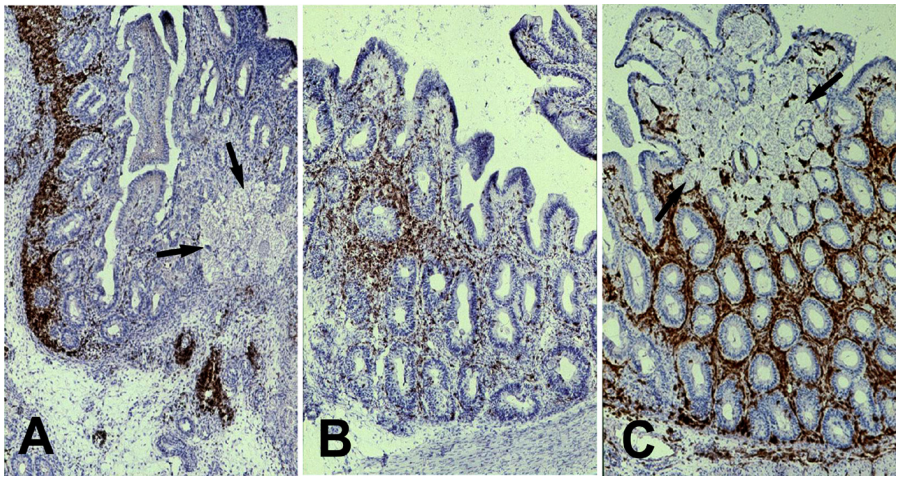


Figura 6. Distribución de algunas de las poblaciones inmunocompetentes en el curso de una infección por *Eimeria tenella*

A, Células CD4 localizadas en la zona mas profunda de la lámina propia.

B, Células CD8 rodeando e invadiendo una cripta parasitada.

C, Macrófagos rodeando un numeroso grupo de esquizontes.
Las flechas indican la localización de los esquizontes.

NUEVAS TENDENCIAS

¿Cómo solucionar los problemas de las vacunas constituidas por parásito vivo? Deberíamos desencadenar el mecanismo de citotoxicidad mediada por anticuerpos con algún método que haga aparecer la respuesta inmune humoral y celular, de forma sincronizada, y que evite los problemas de introducir en la granja parásito vivo.

Algunos autores han propuesto utilizar antígenos que son capaces de estimular la respuesta inmune humoral y celular. Estos antígenos son proteínas que en algunos casos se han aislado a partir de esporozoítos y merozoítos (Breed *et al*., 1999) y en otras ocasiones son antígenos sintéticos constituidos mediante técnicas de biología molecular (Bhogal *et al*., 1992). La respuesta inmune celular desencadenada por estos antígenos esta mediada por células CD4 y CD8 que después de la vacunación experimentan una activación celular cuantificable mediante la síntesis de IFN-_. La vacunación con estos antígenos parece muy adecuada para la activación celular pero la realidad es que se consigue una reducción de las lesiones intestinales de menos del 50%.

Por tanto los resultados obtenidos mediante la vacunación con antígenos que activan la respuesta inmune celular deben ser mejorados antes de ser usados en la producción de carne de pollo, ya que si los animales vacunados se infectan con *Eimeria* las perdidas económicas pueden ser muy significativas. Una posible solución para mejorar el estado de protección de los animales vacunados puede ser unir los antígenos a adyuvantes capaces de estimular la respuesta inmune celular.

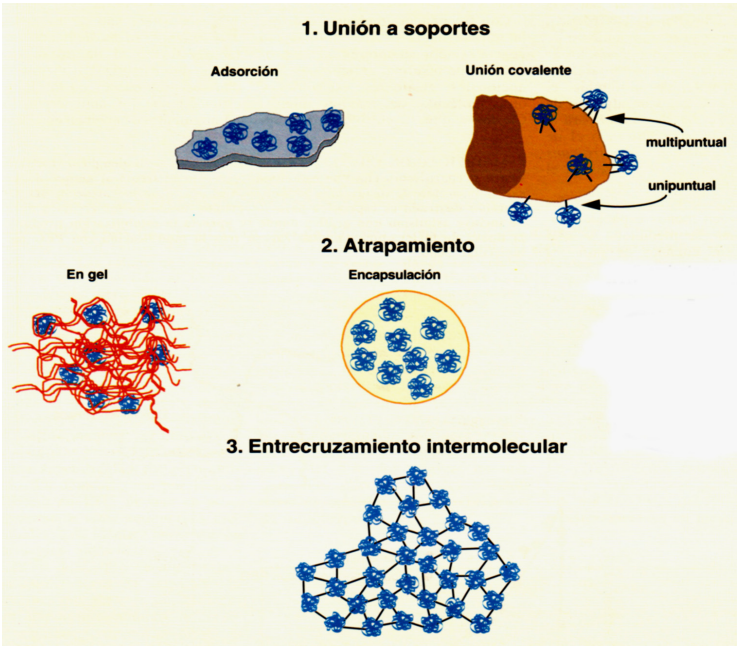


Figura 7. Métodos de unión al adyuvante para reforzar el efecto de los antígenos vacunales.

Los antígenos que estimulan la respuesta inmune celular muestran características moleculares y morfológicas específicas que permiten su unión a diferentes tipos de adyuvantes, tal como se representa en la imagen.

Otro método que se ha explorado, en el intento de desarrollar una vacuna frente a la coccidiosis aviar, es la utilización de plásmidos. Son cadenas circulares de ADN que no se integran con el genoma del hospedador y sintetizan proteínas de forma independiente a los mecanismos de síntesis proteica del hospedador. Los plásmidos que se utilizan en la inmunización frente a *Eimeria* son fracciones de ADN recombinado que se fabrica en el laboratorio utilizando fragmentos de ADN del parásito.

La idea de estas vacunas es introducir los plásmidos en células del hospedador para que sinteticen proteínas del parásito que desencadenan la respuesta inmune celular y humoral (Tang *et al*., 1992). La gran ventaja de las vacunas constituidas por plásmidos, y en general por secuencias recombinadas de ADN, es que las células sintetizan proteínas del parásito y, además de liberarlas al espacio intercelular, las presentan en el contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo I. Las moléculas expulsadas al exterior de la célula hospedadora desencadenan la síntesis de anticuerpos mediante la activación de las células presentadoras de antígeno. Por otra parte las moléculas presentadas en el CMH I desencadenan la citotoxicidad celular mediada por células CD8. La combinación de la presencia de anticuerpos y la activación de las poblaciones celulares citotóxicas origina el mecanismo de citotoxicidad mediada por anticuerpos que determina, en gran medida, el éxito o el fracaso de este tipo de vacunas.

La protección conferida por estas vacunas es del 68% (Song *et al*., 2001). Pero presentan varios problemas. Dos de ellos son problemas técnicos: 1) las células portadoras del plásmido no sobreviven más de un mes, 2) se han descrito problemas de autoinmunidad en individuos vacunados. El otro problema no es técnico pero quizás sea el mas importante. ¿Cabe alguna posibilidad de que el consumidor acepte pollos genéticamente modificados? Como consecuencia de este método de vacunación se consiguen pollos que transportan secuencias de ADN fabricadas a partir del material genético de *Eimeria*, y por tanto se pueden considerar como pollos genéticamente modificados.

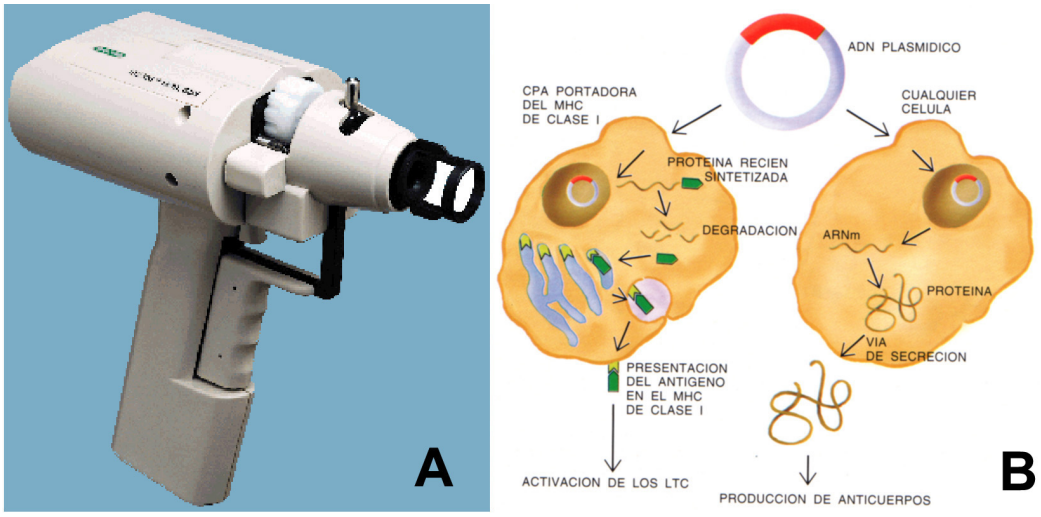


Figura 8. En la imagen A se observa una pistola génica utilizada para introducir los plásmidos en las células de los animales que se desea inmunizar.

En la imagen B se ha representado el mecanismo inmunológico desencadenado por los plásmidos vacunales.

Por tanto, ¿debemos abandonar completamente las vacunas de ADN?

Consideremos la posibilidad de introducir secuencias de ADN que sean propias de los animales que van a recibir la vacuna. Bajo este razonamiento el equipo de Hyun Lillehoj (2005) propone inyectar un antígeno del parásito, para que haya una respuesta inmune humoral, e introducir plásmidos que contienen los genes de algunas de las citoquinas implicadas en la respuesta inmune celular.

Durante años este equipo de investigación identificó y mapeó el ADN del pollo hasta encontrar las secuencias encargadas de codificar las citoquinas mas importantes en la respuesta frente a *Eimeria* (IL1, IL2, IL6, IL8, IL16, IL17, IL18, IFN-γ, IFN-α, LTN y TGF-b). Para que los animales desarrollen un estado de protección frente a *Eimeria* en la primera semana de vida, estos autores proponen la vacunación *in ovo*. Los animales vacunados, mediante la administración simultánea de antígenos y plásmidos, mostraron una disminución en la eliminación de ooquistes del 65% y además experimentaron mejores características productivas. Como trabajo experimental es impecable, pero en la práctica el método tiene un alto coste económico y los resultados no justifican el precio de la vacuna.

Por los resultados expuestos no parece posible la modificación genética del hospedador para hacerlo resistente a la coccidiosis, pero ¿qué pasaría si modificamos al parásito con la finalidad de disminuir su patogenicidad o de incrementar su capacidad inmunógena? La idea es modificar genéticamente al parásito para utilizarlo como vacuna (Kelleher y Tomley, 1999). Cuando se comenzó a trabajar en esta idea el problema más importante era cómo modificar un número suficiente de células parasitarias para administrarlas como vacuna. El problema se solucionó con la técnica de la transfección (Hao *et al.*, 2007). La transfección de células generalmente se lleva a cabo abriendo poros o "agujeros" transitorios en la membrana plasmática mediante electroporación, para permitir la entrada del material genético.

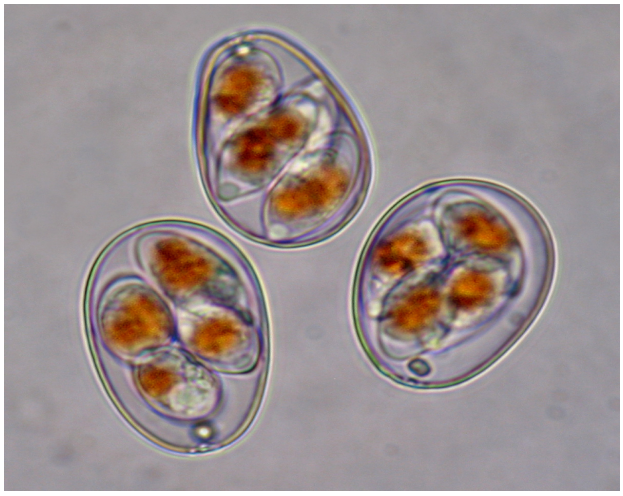


Figura 9. Ooquistes de *E. maxima* modificados mediante transfección para que hiperexpresen un antígeno T-dependiente, que estimula y refuerza la respuesta inmune.

De esta forma se puede obtener un elevado número de esporozoítos genéticamente modificados que se pueden utilizar como vacuna. Uno de los problemas de esta técnica es que la transfección no es estable. Se ha comprobado que sólo el 9% de los ooquistes mantiene la información genética transferida después de la primera multiplicación en el hospedador. Por tanto, la mayoría de los ooquistes expulsados por los animales vacunados serían ooquistes patógenos. Sin embargo, este método de manipulación genética del parásito es muy reciente, y será necesario que se lleven a cabo numerosos ensayos para conocer el alcance real de esta técnica.

Pero volvamos al intento de activar el mecanismo inmunológico de la citotoxicidad mediada por anticuerpos. Para desencadenar la síntesis de anticuerpos es imprescindible la presencia de un antígeno. ¿Por qué no buscamos un sistema de vehiculización del antígeno que active la respuesta inmune celular? Ésta es la pregunta a partir de la cual nuestro equipo de investigación comenzó una nueva línea de investigación en inmunología aviar. En medicina humana este problema está bastante bien resuelto mediante la utilización de células dendríticas enriquecidas con antígenos. Sin embargo en aves era una línea de trabajo completamente novedosa.

Las células dendríticas de las aves son células presentadoras de antígeno que desencadenan la respuesta inmune celular y humoral. Son capaces de fijar el antígeno en su superficie y presentarlo en el contexto del CMH tipo I y II, por tanto activan la síntesis de anticuerpos y la citotoxicidad celular. Nos propusimos aislar moléculas del parásito que fueran vitales para su supervivencia y utilizarlas para fabricar una vacuna frente a la coccidiosis aviar constituida por células dendríticas.

Cuando comenzamos este trabajo no se había descrito ningún método de aislamiento, enriquecimiento con antígenos, cultivo o criopreservación de las células dendríticas de las aves.

Nuestro equipo de investigación ha establecido novedosos métodos para todas estas tareas, que son necesarias para el desarrollo de vacunas constituidas por células dendríticas (del Cacho *et al*., 2008; del Cacho *et al*., 2009). Hemos comprobado que el mejor método de administración de las células dendríticas como vacuna es la inoculación *in ovo*. Los animales no rechazan las células vacunales, y están protegidos desde la primera semana de vida. Según nuestros ensayos la protección suministrada por la vacuna es casi completa (> 95%) y dura toda la vida del animal.

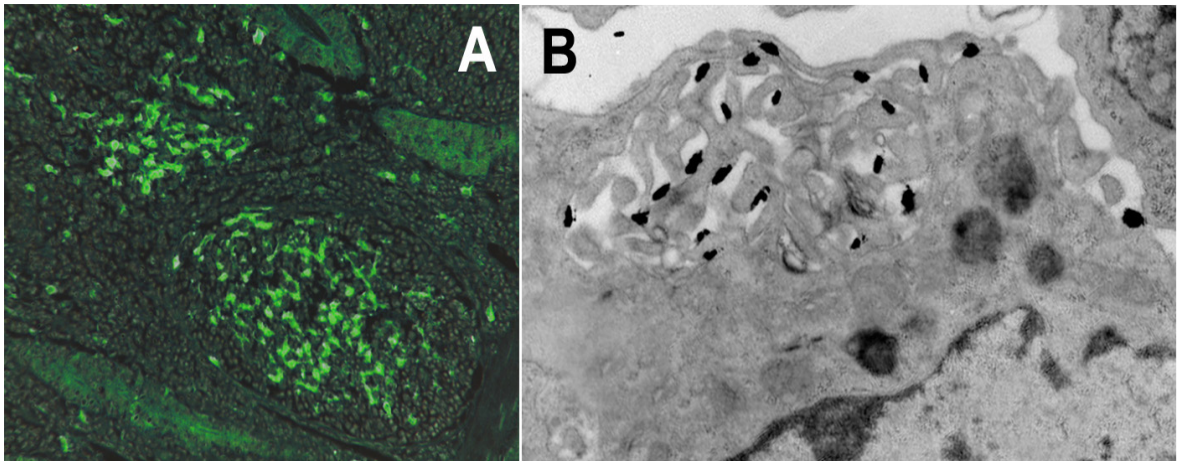


Figura 10.

A. Células dendríticas vacunales localizadas en la tonsila cecal de un pollo de 7 días de vida
Obsérvese su localización en el interior de los centros germinativos y en el tejido linfoide difuso T-dependiente.

B. Detalle de una célula dendrítica que retiene antígeno entre sus proyecciones citoplásmicas.

Se está considerando la posibilidad de enriquecer las células dendríticas con antígenos de diferentes agentes patógenos, para conseguir una vacuna polivalente y más competitiva. Sin embargo, en la actualidad el manejo de las células dendríticas resulta muy laborioso y costoso.

Como dije al comienzo de este trabajo creo que el desarrollo de una vacuna, eficaz y barata, frente a la coccidiosis aviar es necesario y urgente. Si alguien cree tener alguna idea de cómo hacerlo que la haga pública cuanto antes.

REFERENCIAS

ABBAS A.K., LICHTMAN, A.H., PILLAI, D. (2007). Effector mechanisms of immune responses. In*: Cellular and molecular immunology. Elsevier, pp 267-321.*

BREED D.G.J., SCHETTERS, T.P.M., VERHOEVEN, N.A.P., BOOT-GROENINK, A., DORRESTEIN, J., VERMUELEN, A.N. (1999). Vaccination against *Eimeria tenella* infection using a fraction of *E. tenella* sporozoites selected by the capacity to activate T cells. *Int. J. Parasitol. 29, 1231-1240.*

BHOGAL B.S., MILLER, G.A., ANDERSON, A.C., JESSEE, E.J., STRAUSBERG, S., McCANDLISS, R., NAGLE, H., STRAUSBERG, R.L. (1992). Potential of a recombinant antigen as a prophylactic vaccine for day-old broiler chickens against *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. *Vet. Immunol.Immunopathol. 31, 323-335.*

BURNS W.C., CHALLEY, J.R. (1965). Serum lysins in chickens infected with *Eimeria tenella*. *J. Parasitol. 51, 660-668.*

DANFORTH, H.D. (1983). Use of monoclonal antibodies directed against *Eimeria tenella* sporozoites to determine stage specificity and in vitro effect on parasite penetration and development. *Am. J. Vet. Res. 44, 1722-1727.*

DEL CACHO E., GALLEGO, M., LILLEHOJ, H.S., LÓPEZ-BERNARD, F., SÁNCHEZ-ACEDO, C. (2009). Avian follicular and interdigitating dendritic cells: Isolation and morphologic, phenotypic, and functional analyses. *Veterinary Immunology and Immunopathology 129, 66–75*.

DEL CACHO E., GALLEGO, M., LÓPEZ-BERNARD, F., SÁNCHEZ-ACEDO, C., LILLEHOJ, H.S. (2008). Isolation of chicken follicular dendritic cells. *J. Immunol. Methods 334, 59–69.*

HAO, L., LIU, X., ZHOU, X, LI, J., SUO, X. (2007). Transient transfection of *Eimeria tenella* using yellow or red fluorescent protein as a marker. *Mol. Biochem. Parasitol. 153, 213–215.*

KELLEHER, M., TOMLEY, F.M. (1998). Transient expression of beta-galactosidase in differentiating sporozoites of *Eimeria tenella*. *Mol Biochem Parasitol 97, 21–31*.

LEVINE, N.D. (1969). Taxonomy of the sporozoa. Prog. Protozool III. Int. Congr. Protozool, Leningrad. 365-366.

LILLEHOJ, H.S., DING, X., DALLOUL, R.A., SATO, T. YASUDA, A. LILLEHOJ, E. (2005). Embryo vaccination against *Eimeria tenella* and *E. acervulina* infections using recombinant proteins and cytokine adjuvants. *J. Parasitol. 9, 666-673.*

LILLEHOJ, H.S., LILLEHOJ, E. (2000). Avian coccidiosis. A review of acquire intestinal immunity and vaccination strategies. *Avian Diseases, 44, 408-425.*

LONG, P., ROSE, M.E. (1972). Immunity to coccidiosis: effect of serum antibodies on cell invasion by sporozoites of *Eimeria* in vitro. Parasitology 65, 437-445.

ROSE, M.E. (1978). Immune response of chicken to coccidian and coccidiosis. In: Avian cocidiosis. *British Poultry Science Ltd, pp 297-338.*

ROSE, M.E., HESKETH, P. WAKELIN, D. (1992). Immune control of murine coccidiosis: CD4- and CD8- T lymphocytes differentially contribute in resistance to primary and secondary infections. *Parasitology, 105, 349-354.*

SHIRLEY, M.W., BEDRNIK, P. (1997). Live attenuated vaccines against avian coccidiosis: Success with precocious and egg-adapted lines. *Parasitology Today 13, 481-484.*

SMITH, N.C., WALLACH, M., PETRACCA, M., BRAUN, R., ECKERT, J. (1994). Maternal transfer of antibodies induced by infection with *Eimeria maxima* partially protects chickens against challenge with *Eimeria tenella*. *Parasitology 109, 551–557*.

SONG K.D., LILLEHOJ, H.S., CHOI, K.D., YUN, C.H.,. PARCELLS, M.S., HUYNH, J.T., HAN, J.Y. (2001). A DNA vaccine encoding a conserved *Eimeria* protein induces protective immunity against live *Eimeria acervulina* challenge. *Vaccine 19, 243-252.*

TANIELIAN Z., ABU ALI, N., GHANNOUM, B.J.. SOKOLIE, A., BOROJEVIE, D., MOVSESIJAN, M. (1976). Circulating antibody response in chickens to homologous and heterologous antigens of *Eimeria tenella*, *E. necatrix* and *E. brunette*. *Acta Parasitol. Jugoslav. 2, 79-84.*

TANG D.C., DEVIT, M., JOHNSTON, S.A. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immuneresponse. *Nature, 356, 152-154*.

WALLACH, M.G., ASHASH, U., MICHAEL, A., SMITH, N.C. (2008). Field Application of a Subunit Vaccine against an Enteric Protozoan Disease. *PLoS ONE 3, 1-7.*

ZHANG S., LILLEHOJ, H.S., RUFF, M.D. (1995). Chicken tumor necrosis-like factor. *Poult. Sci. 74, 1304-1310.*