

鸡球虫病免疫学研究进展

马广鹤,袁福斌,杨艺,王建民

(沈阳农业大学 畜牧兽医学院,沈阳 110866)

摘要:鸡球虫病是严重危害养鸡业的一种原虫病。长期以来本病防治主要依赖于药物,但由于耐药虫株的频繁出现、药物残留,研制开发新药成本高、周期长等问题的存在,用免疫方法来控制鸡球虫病日益受到重视,并有望成为主要的技术手段。文章从体液免疫和细胞免疫等方面综述了鸡球虫免疫原性,并概述了鸡球虫免疫学的研究进展。

关键词:鸡;球虫病;体液免疫;细胞免疫;细胞因子

中图分类号:S852.72+3

文献标志码:A

论文编号:2010-2794

Study on Recent Advances in Immunobiology of Avian Coccidiosis

Ma Guanghe, Yuan Fubin, Yang Yi, Wang Jianmin

(College of Husbandry and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866)

Abstract: Coccidiosis is recognized that has the greatest economic impact on poultry production. Long-term prevention and treatment of this disease depends on the drugs, but because of the frequent drug-resistant insect strains, drug residue, the high cost of research and development of new drugs, the existence of a long cycle and so on, using immunological methods to control coccidiosis received increasing attention, and is expected to become a major technological means. The applications of the humoral and cellular immunity and so on, about the immunogenicity of coccidia were reviewed, and the future research of coccidia in immunology were also discussed.

Key words: chicken; coccidiosis; humoral immunity; cell immunity; cytokine

0 引言

鸡球虫病是由艾美耳属(*Eimeria*)球虫中的一种或多种球虫寄生于鸡肠上皮细胞内所引起的一种原虫病。主要导致家畜和家禽的营养不良,工作能力低和生产率下降,严重的影响鸡的生长,降低饲料利用率,在养殖业带来很大的经济损失。目前,控制鸡球虫病的主要方法仍是依靠在饲料中添加各种抗球虫药^[1]。然而,基于药物防制中存在成本高、耐药性及危害人类健康等问题,疫苗防制鸡球虫病日益引起了人们的关注^[2]。由于球虫复杂的生活周期和复杂的宿主免疫应答,疫苗的研制非常困难。在免疫学方面对关宿主和寄生虫之间相互作用的了解和加深,是控制球虫病的

有效方法。Susana Refega等^[3]在感染艾美耳球虫的鸡肠道内发现特异性抗体。这些肠道内的特异性抗体已被证实可以抵抗不同种寄生虫的侵袭。

1 体液免疫

负责体液免疫的细胞是B细胞,活化的B淋巴细胞分化为浆细胞,而浆细胞分泌的抗体则是免疫应答的效应产物。研究表明,一般接种卵囊后1周左右,血清中产生IgG和IgM类的特异性抗体。血清中的特异性抗体可与球虫表皮膜抗原结合,由于其刺激作用激活补体。激活补体的不同成分显示了不同的免疫学作用。已证实的作用包括溶解孢子子和裂殖子^[4]。血清抗体还有调理素作用,就是使巨噬细胞捕获、吞噬球虫

基金项目:辽宁省教育厅高校科研计划项目“鸡柔嫩艾美耳球虫(沈阳株)早熟品系选育及免疫原性研究”(2008660)。

第一作者简介:马广鹤,女,1985年出生,辽宁抚顺人,硕士,主要从事动物动物寄生虫病研究。通信地址:110161 辽宁省沈阳农业大学畜牧兽医学院, E-mail: 356449971@163.com。

通讯作者:王建民,男,1969年出生,黑龙江人,副教授,博士,主要从事动物寄生虫病的科研工作。通信地址:110161 辽宁省沈阳农业大学畜牧兽医学院, E-mail: wangjianmincau@163.com。

收稿日期:2010-9-26 **修回日期:**2010-11-09。

的能力增强。含有抗 *E. maxima* 的 IgG 抗体在感染 *E. maxima* 的种蛋的卵黄中被 Smith 等发现。田文霞^[5]等用同日龄高水平母源抗体的雏鸡抗球虫能力较同日龄低水平母源抗体的雏鸡高,而免疫母鸡经鸡蛋传给雏鸡的特异性抗体主要是 IgG,从而证明了血清中 IgG 参与了抗球虫作用,与 Smith 的报道一致。Talebi 等用巨型艾美耳球虫感染鸡后,特异性抗体能够由母体传递到鸡蛋,且母源抗体在子代体内提供持续性的保护力。Pogonka 等^[6]将柔嫩艾美耳球虫 TA4 基因在鼠伤寒沙门氏菌中表达制成的重组疫苗能刺激机体产生很好的体液免疫反应。由此可见,体液免疫在球虫保护性免疫机制中起到非常重要的作用,尤其特异性抗体 IgG 在抵抗球虫感染时起到重要的作用。

2 细胞免疫

细胞免疫在抗球虫病中发挥重要作用。研究结果表明免疫应答的效应基因,主要的是存在于与肠有关的淋巴样组织 T 细胞。细胞免疫反应包括特异性和非特异性活化的 T 细胞产生的免疫效应、巨噬细胞的吞噬作用及 NK 细胞和 K 细胞介导的细胞毒作用,而 T 细胞免疫反应在抵抗球虫病过程起着主导作用。

2.1 T 细胞的作用

依据 T 细胞表面抗原的不同可将 T 细胞划分为 2 个功能亚群:CD8⁺T 细胞(细胞毒型 T 细胞)和 CD4⁺T 细胞(辅助性 T 细胞)。前者与 MHC I 类分子相关识别外来抗原,后者由 MHC II 类分子缔合实现对外来抗原的识别功能。

(1)CD4⁺T 细胞是主要诱导群,其中 Th1 细胞分泌 γ -IFN 和 IL-2, Th2 细胞分泌 IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-10^[7]。实验表明,CD4⁺T 细胞的减少在鸡感染堆型艾美尔球的原发性感染和继发性感染过程中,卵囊的排出量无显著增加^[8]。另外,与原发性感染相比更少的卵囊在继发性感染过程中被排出。结果表明 CD4⁺T 细胞在抵抗堆型艾美尔球虫无明显的免疫作用。另一方面,CD4⁺T 细胞的减少在鸡感染柔嫩艾美尔球虫的结果中,只在原发性感染过程中卵囊的排出增加,而在继发性感染中无明显变化。结果表明,CD4⁺T 细胞在抵抗柔嫩艾美尔球虫原发性感染起重要作用。

(2)CD8⁺T 细胞具有细胞毒性作用,能破坏受感染的宿主细胞,在抗球虫病中起到了十分重要的作用。CD8⁺T 细胞的减少对堆型艾美尔球虫和柔嫩艾美尔球虫在卵囊排除方面有着重要意义。在理论上,是由于用于运输孢子的 CD8⁺T 细胞数量的减少。然而,CD8⁺T 细胞减少导致在继发感染后更多数量的卵囊排除。这个结果表明,CD8⁺T 细胞在原发性感染时可能

没有影响,但在继发性感染的免疫过程中有着必要的影响^[9]。在艾美尔球虫初级感染阶段的保护性免疫中也被发现,外周血液中 CD8⁺T 细胞的数量在急剧短暂的增加^[8]。因此理论上,它们的机能就像细胞毒性细胞,帮助消灭寄生虫杀死受感染细胞。

T 细胞在保护以抵抗艾美尔球虫的局部介导的细胞因子,如 γ 干扰素(IFN- γ)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α),这些细胞因子在艾美尔球虫感染的宿主体内被检测到。 γ 干扰素(IFN- γ)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)在炎性粘膜中有所提高,显示出它们可以促炎症反应,起到屏障瓦解的作用^[10]。IFN- γ 是在被艾美尔球虫感染的宿主体内产生的,尤其是感染部位。IFN- γ 的缺失或衰竭可以在感染时导致更强的易感性。IFN- γ 通过增强巨噬细胞的吞噬活性及淋巴细胞对靶细胞的特殊细胞毒性,起到免疫调节作用。球虫感染时,IFN- γ 可激活巨噬细胞,增强 MHC I、II 类抗原的表达来调节获得性免疫,提高 K 细胞和 NK 细胞的毒性作用,并促进这些细胞产生自由基,以杀伤球虫或宿主细胞,抵抗球虫感染。还可刺激粒细胞的增殖与分化并增强对肿瘤、细菌、病毒和寄生虫的非特异性免疫反应。

肿瘤坏死因子(TNF),是有活性的巨噬细胞所分泌的一个炎症性的细胞因子。TNF- α 的活动可以在感染鸡的受激的巨噬细胞内和血液内被检测到。治疗受感染的鸡时,TNF- α 的转剧可抑制受感染鸡体重的获得,而多克隆抗体处理的 TNF- α 局部撤销了对获得体重的抑制。这个结果显示 TNF- α 可能在鸡感染球虫病的病理生理学上扮演重要角色。胃肠道的粘膜上皮有一个固有的调节规律,可通过结合分子有选择的渗透网状组织和固有组织。这种结合在初期抵抗肠内微生物的侵入起到一定的作用。由此,我们可以验证肠内上皮淋巴细胞(IEL)中细胞因子的产生以及上皮细胞的机能,得出 IEL 在肠道感染期间保护上皮细胞有一定贡献^[11]。

Yang 等^[12]筛选了一株球虫鸡痘重组病毒 rFPV-Rhomboid。经 CEF 进一步扩增病毒后免疫雏鸡,并监测免疫指标。统计学数据分析显示,重组病毒接种鸡的外周血中 CD4⁺、CD8⁺ 含量显著高于非免疫对照组($P < 0.05$),与对照组相比,重组病毒对鸡的增重效果差异显著($P < 0.05$),对 *E. tenella* 的攻击具有一定的保护作用,对抵抗球虫感染显示出较好的应用前景。Kim 等^[13]给雏鸡口服 *Eimeria maxima* 孢子化卵囊后,发现雏鸡肠上皮内淋巴细胞高水平表达 ChIFN-7、白细胞介素-16(IL-1p)、诱导型一氧化氮合酶等细胞因子,脾内也是这样。这表明鸡 MHC 类抗原是通过控

制局部和全身与免疫有关的细胞因子的基因表达来增强鸡抗球虫的作用。Ding 等^[14]用纯化的重组蛋白(3-IE)与 IL-1、IL-2、IL-6、IL-8、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18 或 IFN- γ 一起免疫鸡胚,结果表明免疫 18 日龄鸡胚,能增强小鸡孵出后对 *E.acervulina* 感染的抵抗力。Swinkels 等^[15]用 *E.acervulina* 分别一次性感染快速生长型和慢速生长型两品种雏鸡,应用实时定量 PCR 技术研究二者 T 细胞免疫反应的差异,结果显示感染后第 4 天生长快速型鸡群球虫感染量低于生长慢型鸡群,并且十二指肠处的 IFN- γ 、IL-8 含量明显增加;感染后 5 天时,小肠处球虫 DNA 含量达到高峰;十二指肠处,两处理组 CD4⁺T 细胞含量没有变化,而生长快型处理组的 CD8⁺T 细胞含量明显增加。进而证明了细胞免疫中 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞含量变化与鸡体生长性能有关。鸡胚内免疫 EtMIC2 蛋白也能诱导较高的抗体反应,卵囊攻击后与对照组相比,卵囊产量降低,体重增加。进一步用重组 EtMIC2 蛋白和细胞因子(IL-8、IL-16、TGF-p4 和淋巴细胞趋化因子)联合免疫,结果发现联合免疫比单独用重组蛋白 EtMIC2 免疫效果好^[16]。Zhang 等^[17]将 *E. tenella* DNA 疫苗 pcDNA4.0(c)-pEtK2-IL-2 对鸡进行胸部肌肉免疫注射。实验数据表明,该 DNA 疫苗对 *E.tenella* 感染具有完全免疫保护作用,而对 *E.maxima*、*E.a cervulina*、*E.necatrix* 的感染具有部分交叉保护力。Yan^[18]等利用重组 *E.tenella* 作为疫苗载体表达外源抗原,试验结果将为 *E.tenella* 和禽类其他寄生虫的细胞生物学研究和细胞内病原的活疫苗递药系统方面提供了有效的途径。

2.2 巨噬细胞的作用

巨噬细胞是由 T 淋巴细胞激活,其免疫血清能增强巨噬细胞对柔嫩艾美耳球虫孢子的吞噬作用并且损害孢子。活化的巨噬细胞来源于不同炎症性的细胞因子,以调节细胞的免疫应答。

2.3 自然杀伤性(NK)细胞的作用

在肠内建立宿主细胞防御,NK 细胞是首选的细胞系,因为它最靠近抗原位置,鸡肠上皮内淋巴细胞(IELs)中一个亚群 NK 细胞介导自然细胞毒活性,提示它是构成肠道免疫的重要承担者。自然杀伤性(NK)细胞在原发性感染早期增加,起到免疫监督的作用^[19]。

3 展望

总之,鸡球虫保护性免疫通过多种机制起作用,其中占主导地位的是细胞免疫,其它免疫机制从不同方面辅助机体的免疫反应。经过国内外学者的不断努力,人们在鸡球虫的免疫原性、宿主免疫应答、球虫保护性抗原等方面都取得了一定的进展。今后的主要研

究方向应集中在球虫共同保护性抗原的筛选及构建新型疫苗等方面。随着生物科技的不断发展,相信在不久的将来在免疫预防球虫病方面一定会取得突破性进展。

参考文献

- [1] 郝桂英,古小彬,周忆航.中药防治鸡球虫病的研究进展[J].安徽农业科学,2008,36(5):1866-1867.
- [2] 陈进喜,陈汉忠,谢婷等.鸡球虫活疫苗类型及其研究进展[J].广西农业生物科技,2007,27(2):171-176.
- [3] Susana Refega, Fabienne Girard-Misguich, Christiane Bourdieu. Gene discovery in *Eimeria tenella* by immunoscreening cDNA expression libraries of sporozoites and schizonts with chicken intestinal antibodies[J]. *Veterinary Parasitology*,2003,113:19-33.
- [4] Jeurissen S H, Claassen E,Boonstra-Blom A G, et al. Immunocytochemical techniques to investigate the pathogenesis of infectious micro-organisms and the concurrent immune response of the host[J]. *Dev Comp Immunol*,2000,24(2-3):141-151.
- [5] 田文霞,张树方,郑明学等.柔嫩艾美耳球虫(*Etenella*)感染鸡 IgG 生成细胞及血清 IgG 变化[J].畜牧兽医科技信息,2008,(06):28-30.
- [6] Pogonka T, Klotz C, Kovács F. A single dose of recombinant *Salmonella typhimurium* induces specific humoral immune responses against heterologous *Eimeria tenella* antigens in chicken [J]. *Int J Parasitol*,2003,33(1):81-88.
- [7] Hong Y H, Lillehoj H S, Lee S H. Analysis of chicken cytokine and chemokine gene expression following *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections[J]. *Vet Immunol Immunopathol*,2006,114(3-4):209-223.
- [8] Breed D G J, Dorrestein J, Vermeulen A N. Immunity to *Eimeria tenella* in chickens phenotypical and functional changes in peripheral blood T-cell subsets[J]. *Avian Dis*,1996,40:37-48.
- [9] Trout J M, Lillehoj H S. Tlymphocyte roles during *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections[J]. *Veterinary immunology and immunopathology*,1996,53:163-172.
- [10] Yun C H, Lillehoj H S, Zhu J, et al. Kinetic differences in intestinal and systemic interferon-gamma and antigen-specific antibodies in chickens experimentally infected with *Eimeria maxima*[J]. *Avian Dis*,2000,44(2):305-312.
- [11] Kyoko Inagaki-Ohara, Fitriya Nurannisa Dewi, Hajime Hisaeda. Intestinal Intraepithelial Lymphocytes Sustain the Epithelial Barrier Function against *Eimeria vermiciformis* Infection[J]. *Infection and immunity*,2006,74(9):5292-5301.
- [12] YANG Gui-lian, LI Jian-hua, ZHANG Xi-chen, et al. *E imeria tenella*: const ruction of a recombin ant fowlpox virus expres sing rhomb oid gene and its protective efficacy against homologous infection[J]. *Experimental Parasi tology*,2008,119(1):30-36.
- [13] Kim D K, Lillehoj H S, Hong Y H, et al. Immune-related gene expression in two B-complex disparate genetically inbred fayoumi chicken lines following *eimeria maxima* infection[J]. *Poultry Science*,2008,87:433-443.
- [14] Ding X, Lillehoj H S, Quiroz M A, et al. Proteetive immunity

-
- against *Eimeria acervulina* Following in ovo immunization with a recombinant subunit vaccine and cytokine genes[J]. *Infect Immun*, 2004, 72: 6939-6944.
- [15] Swinkels W J, Post J, Cornelissen J B, et al. Immune responses to an *Eimeria acervulina* infection in different broilers lines[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2007, 117(15): 26-34.
- [16] Pogonka T, Klotz C, Kovács F. A single dose of recombinant *Salmonella typhimurium* induces specific humoral immune responses against heterologous *Eimeria tenella* antigens in chicken [J]. *Int J Parasitol*, 2003, 33(1): 81-88.
- [17] ZHANG Bu-cai, LI Xiang-ru, XU Li-xin, et al. Cross-protection of *Eimeria tenella* DNA vaccine pCDNA4. 0(c)2 pETK2-IL-2 against other *Eimeria* species[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2008, 38(01): 34-37.
- [18] YAN Wen-chao, LIU Xian-yong, SHI Tuan-yuan, et al. Stable transfection of *Eimeria tenella*: constitutive expression of the YFP-YFP molecule throughout the life cycle[J]. *International Journal for Parasitology*, 2009, 39(1): 109-117.
- [19] Allen P C, Fetterer R H. Recent Advances in Biology and Immunobiology of *Eimeria* Species and in Diagnosis and Control of Infection with These Coccidian Parasites of Poultry[J]. *Clinical microbiology reviews*, 2002, 15(1): 58-65.