

DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).201911045

柔嫩艾美耳球虫感染对罗曼粉鸡盲肠组织 病理学和细胞免疫相关基因的影响*

闫志强, 付文贵, 陈春林, 唐红梅, 郑 华, 朱买勋, 翟少钦**
(重庆市畜牧科学院, 重庆 402460)

摘要:【目的】明确柔嫩艾美耳球虫感染对罗曼粉鸡盲肠组织病理学和细胞免疫相关基因 mRNA 表达量的影响。【方法】将 100 只鸡随机分为空白组、感染 I、II、III 和 IV 组, 每组 20 只, 感染 I、II、III 和 IV 组分别口服 3×10^4 、 2×10^4 、 1×10^4 和 0.5×10^4 个孢子化鸡柔嫩艾美耳球虫卵囊, 空白组口服相同体积的生理盐水。试验结束时, 剖解试验鸡, 采集盲肠制作病理切片, 观察组织病理学变化并进行评分; 采用荧光定量 PCR 方法检测盲肠 *IL-2*、*IL-17*、*TGF-β1* 和 *IFN-γ* 基因 mRNA 表达量。【结果】感染 I、II 和 III 组试验鸡黏膜层破坏严重, 出血明显, 大量炎性细胞浸润, 腺上皮细胞内见大量虫体, 病理损伤评分为重度损伤; 感染柔嫩艾美耳球虫第 5、7 天, 感染组盲肠组织 *IL-2*、*IL-17*、*TGF-β1* 和 *IFN-γ* 基因 mRNA 表达量均升高, 与空白组相比差异极显著 ($P < 0.01$)。【结论】不同剂量的柔嫩艾美耳球虫可造成鸡盲肠组织不同程度损伤, 且能上调盲肠组织 *IL-2*、*IL-17*、*TGF-β1* 和 *IFN-γ* 基因的表达。

关键词: 柔嫩艾美耳球虫; 盲肠; 组织病理学; 基因表达

中图分类号: S 852.7 文献标志码: A 文章编号: 1004-390X (2020) 05-0789-07

Effect of *Eimeria tenella* Infection on the Histopathology and Cellular Immunity-related Gene Expression in Cecum of Roman Chicken

YAN Zhiqiang, FU Wengui, CHEN Chunlin, TANG Hongmei, ZHENG Hua,
ZHU Maixun, ZHAI Shaoqin
(Chongqing Academy of Animal Sciences, Chongqing 402460, China)

Abstract: [Purpose] To determine the effect of *Eimeria tenella* infection on the histopathology and mRNA expression of cellular immunity related genes in Roman powder chickens. [Method] 100 chickens were randomly divided into blank control group, infected group I, II, III and IV, 20 in each group, and infected group I, II, III and IV were orally administered 3×10^4 , 2×10^4 , 1×10^4 and 0.5×10^4 spores of chicken *E. tenella* oocysts, the blank control group orally the same volume of normal saline, at the end of the test, dissection test chicken, collecting cecum to make pathological sections, observe histopathological changes and score. At the same time, the mRNA expression levels of *IL-2*, *IL-17*, *TGF-β1* and *IFN-γ* genes in the cecum were detected by real-time PCR. [Results] In the infected

收稿日期: 2019-11-21 修回日期: 2020-05-21 网络首发时间: 2020-09-02 12:13:31

*基金项目: 重庆市自然科学基金项目 (cstc2019jcyj-msxmX0061); 重庆市现代山地特色高效农业技术体系 (2018 [5] 号)。

作者简介: 闫志强 (1989—), 男, 河南洛阳人, 硕士, 助理研究员, 主要从事中兽医药研究。

E-mail: 18883359161@163.com

**通信作者 Corresponding author: 翟少钦 (1973—), 女, 四川绵阳人, 硕士, 副研究员, 主要从事中兽医药研究。E-mail: zhaishaoqin@126.com

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20200901.1524.001.html>



group I, II and III, the mucosal layer of the test group was severely damaged and the bleeding was obvious. A large number of inflammatory cells infiltrated, and a large number of worms were found in the glandular epithelial cells. The pathological damage score was severely injured; after infection with *E. tenella*. The expression of *IL-2*, *IL-17*, *TGF- β 1* and *IFN- γ* mRNA in the cecal tissue of the infected group increased at the 5th and 7th days and the difference was significant compared with the blank group ($P < 0.01$). [**Conclusion**] Different doses of *E. tenella* can cause different degrees of damage to chicken cecal tissue, and can induce the expression of *IL-2*, *IL-17*, *TGF- β 1* and *IFN- γ* genes in cecal tissue.

Keywords: *Eimeria tenella*; cecum; histopathology; gene expression

鸡球虫病是由一种或多种艾美耳球虫引起的急性传染病, 以雏鸡最易感染, 发病率高达 50%~70%, 死亡率为 20%~30%, 严重者可高达 80%, 是危害养鸡业最严重的疾病之一。全球每年因鸡球虫病造成高达 30 亿美元经济损失^[1], 中国每年的抗球虫药物费用占鸡病防治费用的三分之一或更高, 而且随着中国集约化养鸡业的迅速发展, 这一数据可能还会急剧上升。目前, 全球有记载的球虫有十几种, 中国发现了 9 种, 致病性较强的有 7 种, 其中以柔嫩艾美耳球虫致病性最强, 该种球虫主要入侵鸡盲肠, 破坏盲肠组织, 引起盲肠充血、肿大和出血等病变, 导致饲料报酬率降低和死亡率增加^[2]。柔嫩艾美耳球虫是细胞内寄生虫, 主要引起宿主细胞免疫应答, 而细胞因子是一类由免疫细胞分泌, 对机体细胞免疫应答的产生和调节起着重要作用的免疫因子。研究发现: 干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-2 (IL-2)、白细胞介素-17 (IL-17) 及转化生长因子- β (TGF- β) 等部分细胞因子在机体抗球虫感染和黏膜修复中发挥着极其重要的作用。因此, 明确球虫感染后主要细胞因子的变化规律对球虫致病机制的研究有重要意义^[3-4]。目前, 对鸡球虫病的研究主要采用口服球虫孢子化卵囊人工复制病理模型^[5-6], 但文献中灌服孢子化卵囊数量不一, 不同卵囊量对鸡盲肠组织的损伤程度及盲肠 *IL-2*、*IL-17*、*TGF- β 1* 和 *IFN- γ* 基因 mRNA 表达量变化研究尚不系统。本研究采用口服柔嫩艾美耳球虫孢子化卵囊感染罗曼粉鸡, 以盲肠组织病变和盲肠 *IL-2*、*IL-17*、*TGF- β 1* 和 *IFN- γ* 基因 mRNA 表达量为考察指标, 以明确罗曼粉鸡在感染柔嫩艾美耳球虫后一段时间内, 盲肠组织的损伤程度和盲肠

组织细胞免疫相关基因表达的变化规律, 为研究鸡球虫的致病机理及药物研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

1 日龄罗曼粉鸡 100 只, 购自重庆永川一品种鸡场, 饲养环境: 甲醛熏蒸消毒和火焰消毒处理, 确保饲养环境中无球虫卵囊, 试验鸡饲养至 16 日龄, 自由饮水采食, 饲喂不含抗球虫药物添加剂的饲料。

1.2 主要试剂与仪器

B511321-UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒 (上海生工), TransStart Green qPCR SuperMix (北京全式金), EasyScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix (北京全式金); 多聚甲醛 (成都市科隆化学品有限公司); RM2235 型石蜡切片机 (Leica); CX22 型光学显微镜 (OLMPUS); Schwingmuhle Tissuelyser II 型高通量组织破碎机 (QIAGEN); LightCycler 96 型荧光定量 PCR 仪 (Roche); Naro drop2000 型微量核酸定量仪 (Thermo)。

1.3 柔嫩艾美耳球虫培养

球虫虫卵由重庆畜牧科学院从自然感染柔嫩艾美耳球虫的罗曼粉鸡粪便分离保存, 使用前灌喂 16 日龄的雏鸡进行复壮, 出现血便时开始收集粪便, 连续收集 3 d。采样饱和食盐水漂浮法收集球虫卵囊, 将收集的柔嫩艾美耳球虫卵囊加入 12 倍体积的 2.5% 重铬酸钾溶液中, 28 ℃ 培养 48~72 h, 对虫卵进行观察, 当孢子化率达 90% 以上停止培养, 收集孢子化卵囊, 备用^[7-8]。

1.4 试验分组及处理

试验鸡饲养至 16 日龄灌喂孢子化卵囊,

100 只健康仔鸡随机分为空白组和感染 I、II、III 和 IV 组，每组 20 只。感染 I、II、III 和 IV 组分别按照 3×10^4 、 2×10^4 、 1×10^4 和 0.5×10^4 个孢子化卵囊灌服，空白组灌服相同体积的生理盐水^[9-10]。

1.5 盲肠石蜡切片的制作及病理损伤评分

灌饲孢子化卵囊第 5 和 7 天每组随机解剖 6 只，观察主要脏器情况，并采取盲肠进行石蜡

切片的制作，制作方法参照文献 [11] 进行。显微镜下观察组织病理学变化，完整地浏览整张组织片，对正常组织或有明显病变部位均采用显微成像系统拍照记录，并对组织病变情况进行评分，依据病理损伤程度及参考文献 [12-13] 制定盲肠组织病理损伤评分参考标准 (表 1)。

表 1 盲肠组织病理损伤评分参考标准
Tab. 1 Reference standard for cecal tissue pathological damage score

等级 grade	特征病理描述 description of characteristic pathology	评分 score
正常 normal	盲肠各层组织结构正常，未见明显的组织病理损伤改变	0
轻度 mild	黏膜层上皮细胞轻微脱落坏死，偶见充血或出血，腺上皮细胞内偶见球虫虫体，固有层和黏膜下层见少量的炎性细胞浸润	1
中度 moderate	黏膜层上皮脱落或黏膜层局部缺失，见充血或出血，腺上皮细胞内较多球虫虫体，黏膜固有层和黏膜下层见较多炎性细胞浸润	2
重度 severe	黏膜层较大范围缺失，严重的出血，大量炎性细胞浸润，腺上皮细胞内见大量虫体，盲肠组织结构破坏	3

1.6 荧光定量 PCR 测定相关基因 mRNA 表达

灌饲孢子化卵囊第 5、7 天每组随机解剖 6 只，无菌采集试验鸡盲肠，立即液氮保存，后转至 -80 ℃ 冰箱保存备用。Trizol 法提取鸡组织的总 RNA，按照试剂盒说明书反转录进行 cDNA 的合成，采用 SYBR Green I 染料法进行荧光定量分析。结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法处理。引物序列见表 2。

表 2 引物序列
Tab. 2 Primer sequence

目的基因 gene	引物序列: (5'→3') primer sequence	产物长度/bp amplification size
IFN- γ	F: AACCTTCCTGATGGCGTGAA	137
	R: AAAGTCGGAGGATCCACCAG	
IL-2	F: AGGAGTGACCCAGCAAAGT	169
	R: TTGCATTCACTTCCGGTGTG	
IL-17	F: GAGCCAGGCCGTAACGATT	104
	R: GGGGCTGCATTCTTAATTCA	
TGF- β 1	F: GCGCTGTACAACCAACACAA	98
	R: TTCCGGCCACGTAGTAAAT	
β -actin	F: ATGGCTCCGGTATGTGCAA	142
	R: TGGGCTTCATCACCAACGTA	

1.7 数据处理

试验数据均使用 Excel 进行处理，SPSS 20.0 进行统计分析，采用单因素方法分析和多重比较，试验结果用“mean $\pm$ SD”表示， $P<0.01$ 为差异极显著， $P<0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

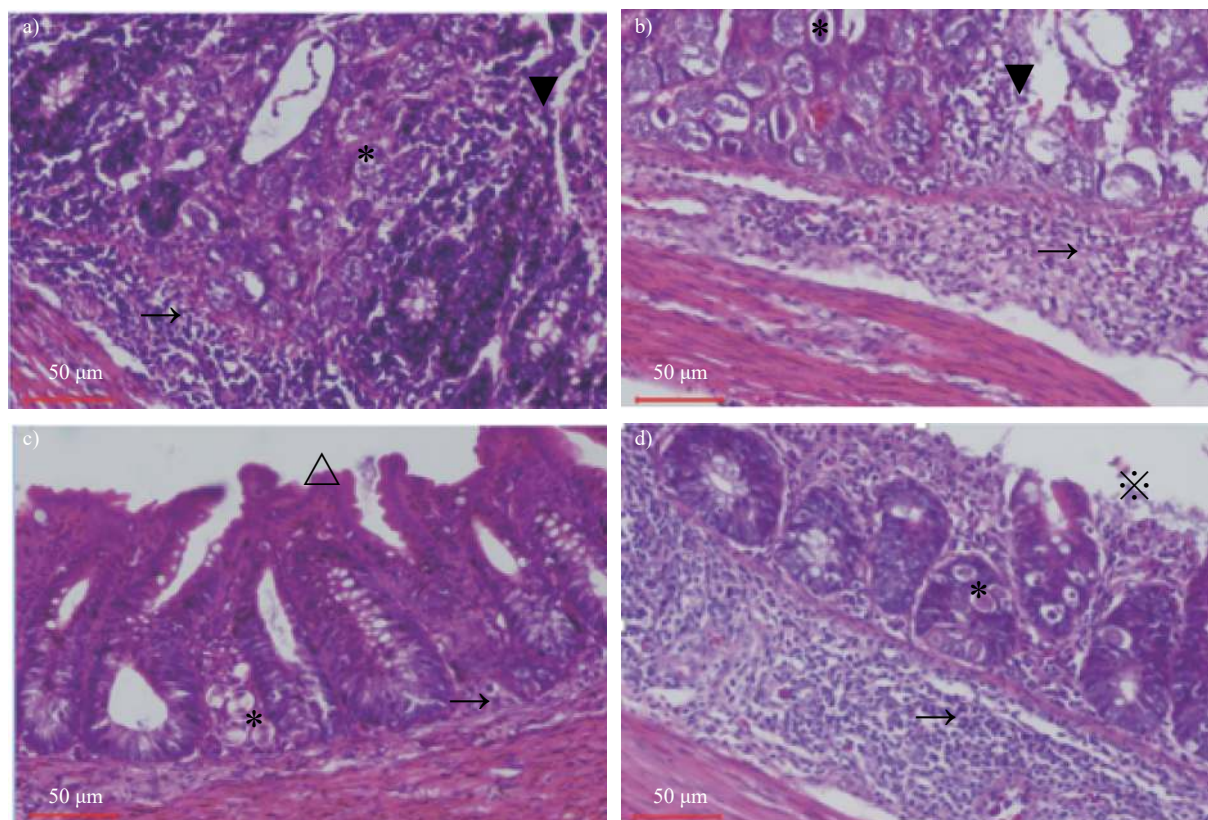
2.1 柔嫩艾美耳球虫对鸡盲肠组织病理学的影响

感染第 5 天，感染组盲肠组织固有层和黏膜下层见较多炎性细胞浸润，腺上皮细胞内可见球虫虫体，黏膜层组织结构损伤，上皮细胞不同程度坏死脱落，其中感染 I、II 组盲肠损伤严重，感染 III 和 IV 组组织损伤较为轻微 (图 1)。

感染第 7 天，感染组盲肠组织黏膜上皮层细胞大量溶解、坏死、脱落、出血入肠腔，黏膜层腺上皮细胞内大量的不同分化阶段球虫，黏膜下层大量炎性细胞浸润和轻度充血出血，固有层和肌层可见以淋巴细胞为主的炎性细胞浸润。感染 I、II、III 组盲肠损伤严重，感染 IV 组组织损伤相对轻微 (图 2)。

2.2 柔嫩艾美耳球虫对鸡盲肠组织病理损伤程度评分

依据表 1 盲肠组织病理损伤评分参考标准，球虫感染第 5 天，感染 I 组 33.3% 所检测鸡盲肠组织损伤程度为中度，66.7% 为重度。感染 I、II 组所检测鸡病理组织损伤程度均为重度，感染 III 组所检测鸡病理评分为轻度，感染 IV 组 50% 所检测鸡病理评分为轻度，50% 为中度；感染第 7 天，感染 I、II、III 组所检测鸡盲肠组织损伤程度均为重度，感染 IV 组所检测鸡病理损伤评分均为中度 (表 3)。



注: a) 感染 I 组, 黏膜层细胞内可见大量虫体 (*), 黏膜上皮层及固有层见细胞坏死 (▼), 黏膜层和黏膜下层炎性细胞浸润 (→); b) 感染 II 组, 黏膜层细胞内可见大量虫体 (*), 黏膜层细胞坏死脱落, 结构破坏 (▼), 黏膜层和黏膜下层炎性细胞浸润 (→); c) 感染 III 组, 黏膜层结构较完整, 黏膜上皮未见坏死脱落 (△), 固有层中仍可见虫体 (*) 及少量炎性细胞浸润 (→); d) 感染 IV 组, 黏膜层上皮破坏, 细胞可见坏死脱落 (*), 固有层中可见少量虫体 (*), 黏膜层和黏膜下层可见大量炎性细胞浸润 (→)。

Note: a) infection group I, a large number of worms can be seen in the cells of the mucosal layer (*), cell necrosis is seen in the mucosal epithelium and lamina propria, and the structure is severely damaged (▼), infiltration of inflammatory cells in the mucosa and submucosa (→); b) infection group II, a large number of worms are seen in the mucosal layer cells (*), the mucosal layer cells are necrotic and shed, the structure is damaged (▼), and the mucosal layer and submucosal layer are infiltrated by inflammatory cells (→); c) infection group III, the mucosal layer structure is relatively complete, no necrosis and shedding (△) are observed in the mucosal epithelium, and worm bodies (*) and a small amount of inflammatory cell infiltration are still visible in the propria (→); d) infection group IV, the epithelium of the mucosal layer is damaged, and the cells is necrosis and shedding (*), a small number of worms (*) are seen in the lamina propria, and a large number of inflammatory cells infiltrate in the mucosal layer and submucosa (→).

图 1 感染第 5 天各组试验鸡盲肠病理变化 (HE, 200×)

Fig. 1 Pathological changes in cecal of chickens in each group on 5 days post infection (HE, 200×)

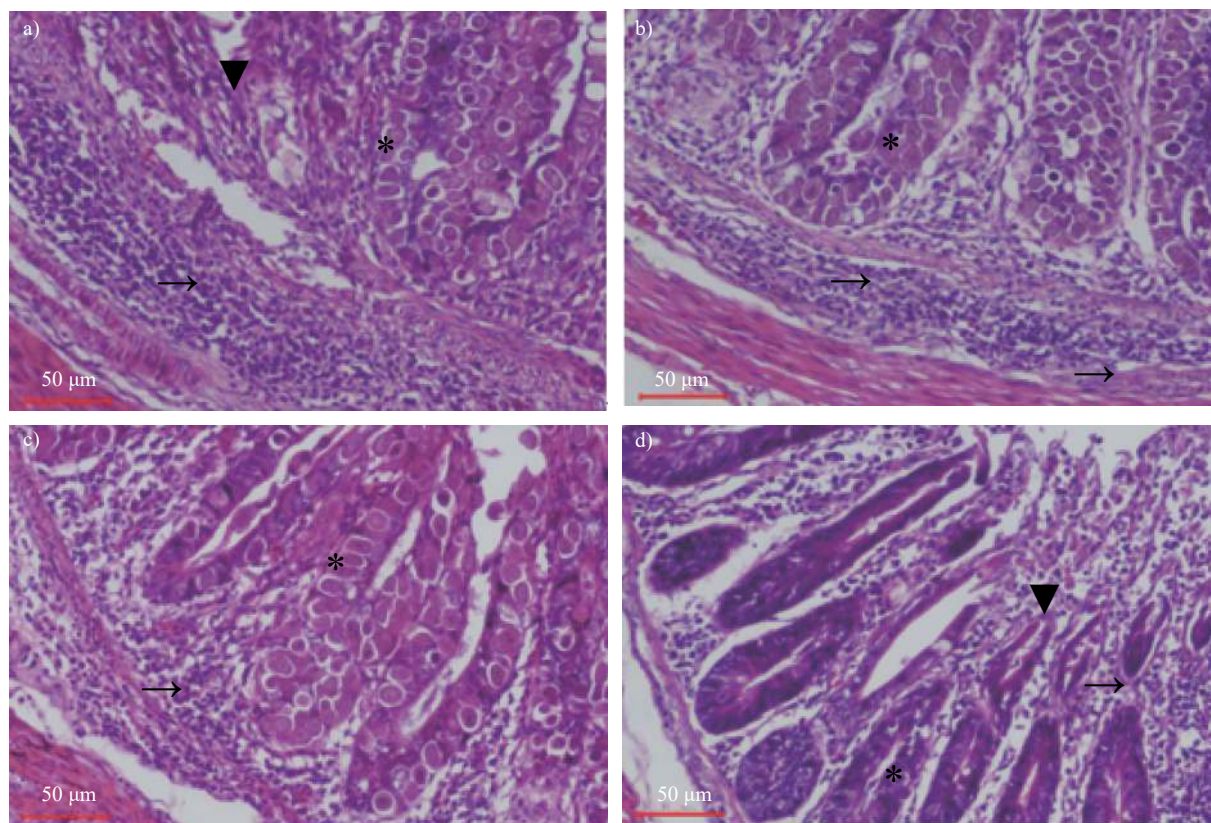
2.3 柔嫩艾美耳球虫对鸡盲肠组织相关基因 mRNA 表达量的影响

柔嫩艾美耳球虫感染第 5、7 天, 感染组盲肠组织 *IL-2*、*IL-17*、*TGF-β1*、*IFN-γ* 基因 mRNA 表达量均升高, 与空白组相比差异极显著 ($P < 0.01$)。柔嫩艾美耳球虫感染第 7 天, 感染 I、II 组盲肠组织 *IL-2*、*IL-17*、*TGF-β1* 基因 mRNA 表达量与感染第 5 天相比降低, 感染 III、IV 组与感染第 5 天相比升高, 感染组盲肠组织 *IFN-γ* 基因 mRNA 表达量持续升高 (图 3)。

3 讨论

盲肠是鸡最重要的消化器官之一, 亦是柔嫩

艾美耳球虫侵害的主要器官, 鸡摄入孢子化卵囊后, 在肌胃、胰酶及胆汁的作用下, 释放出子孢子, 子孢子入侵盲肠上皮细胞, 并进行裂殖生殖, 产生大量裂殖子, 裂殖子在释放过程中损伤盲肠上皮细胞, 造成血管破裂, 肠黏膜组织受损^[14-15]。本研究结果显示: 感染第 5 天, 感染组黏膜层少量细胞坏死脱落, 固有层有少量炎性细胞浸润, 盲肠组织损伤相对轻微。感染第 7 天, 感染 I、II、III 组试验鸡黏膜层破坏严重, 出血明显, 大量炎性细胞浸润, 腺上皮细胞内见大量虫体, 依据盲肠病理损伤评分为重度损伤, 表明在一定时间内盲肠组织损伤程度随感染时间增长逐渐严重, 与文献报道^[12] 相符。此外, 提示不同



注: a) 感染 I 组, 上皮细胞内见大量虫体, 黏膜下层、固有层和肌层有大量炎性细胞浸润, 黏膜层局部结构破坏, 细胞坏死 (▼); b) 感染 II 组, 上皮细胞内见大量虫体 (*), 黏膜下层、固有层结构被破坏, 肌层有炎性细胞浸润 (→); c) 感染 III 组, 上皮细胞内见大量虫体 (*), 黏膜下层、固有层和肌层较多炎性细胞浸润 (→); d) 感染 IV 组, 上皮细胞内可见少量虫体 (*), 黏膜下层和固有层有炎性细胞浸润 (→), 固有层结构破坏 (▼)。

Note: a) infection group I, a large number of worms were found in the epithelial cells, and there were a large number of inflammatory cells infiltrating the submucosa, lamina propria and muscle, local structure of mucosal layer is damaged, and cell necrosis (▼); b) infection group II, a large number of worms are seen in the epithelial cells (*), the submucosa and lamina propria are destroyed, and inflammatory cells infiltrate the muscle layer (→); c) infection group III, a large number of worms are seen in the epithelial cells (*), and there are more inflammatory cells infiltration in the submucosa, lamina propria, and muscle (→); d) infection group IV, there are a few worms in the epithelial cells (*), inflammatory cell infiltration in the submucosa and lamina propria (→), and the lamina propria structure is damaged (▼).

图2 感染第7天各组试验鸡盲肠病理变化 (HE, 200×)

Fig. 2 Pathological changes in cecal of chickens in each group on 7 days post infection (HE, 200×)

剂量的卵囊感染均可造成盲肠组织损伤, 在 $0.5 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$ 感染量内, 感染量越大, 盲肠组织损伤越严重。

TGF- β 是一类功能复杂的多肽类细胞因子, 可通过上调肠道上皮细胞紧密连接蛋白的表达, 促进肠黏膜修复。同时, TGF- β 可上调肠黏膜细胞中抗凋亡蛋白的表达, 降低肠黏膜细胞的凋亡, 进而维持肠道的完整性^[16-17]。IL-17 是 T 细胞来源细胞因子, 在抗球虫感染过程中发挥着抗感染和免疫调节、减少盲肠组织损伤等作用^[18-19]。研究表明: 感染第 5 天, 试验鸡的盲肠组织 TGF- β 和 IL-17 基因表达量显著升高, 感染第 7 天, 感染 I、II 组盲肠组织 TGF- β 和 IL-17 基因表达量相比感染第 5 天时降低, 感染 III、IV 组

持续升高。推测盲肠组织在受损时, 机体可通过上调 TGF- β 和 IL-17 基因的表达进行自我修复, 但 TGF- β 和 IL-17 在机体防御球虫和降低肠道损伤时存在着最高临界值, 当组织损伤超过一定程度时, 机体自我修复功能受阻, TGF- β 和 IL-17 修复肠道黏膜的作用降低, TGF- β 和 IL-17 基因 mRNA 表达量与盲肠组织损伤随感染时间增长逐渐严重的结果相符, 同时, 提示在柔嫩艾美耳球虫人工感染鸡时应选择适当的感染剂量。

IL-2 是免疫系统的一类细胞生长因子, 主要介导细胞免疫, 诱导杀伤性 T 细胞、自然杀伤细胞和淋巴因子激活的杀伤细胞等多种杀伤细胞的分化和效应功能, 并诱导杀伤细胞产生 TNF- α 等细胞因子, 在鸡球虫感染中起重要作用^[20-21]。

表 3 柔嫩艾美耳球虫对鸡盲肠病理损伤评分

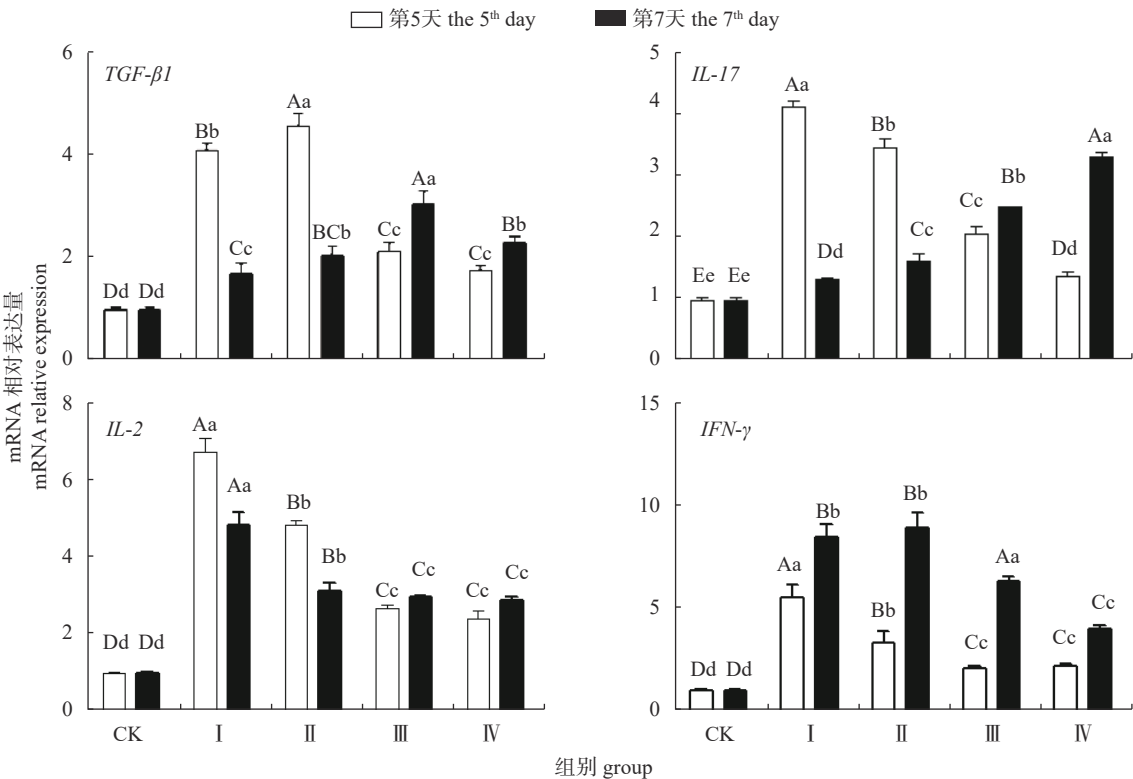
Tab. 3 Scoring of cecal pathological damage in chickens with *E. tenella* %

感染后时间/d infection time	组别 group	评分 score			
		0	1	2	3
5	CK	100	—	—	—
	I	—	—	33.3	66.7
	II	—	—	—	100
	III	—	100	—	—
	IV	—	50	50	—
7	CK	100	—	—	—
	I	—	—	—	100
	II	—	—	—	100
	III	—	—	—	100
	IV	—	—	100	—

注：CK为空白对照；I、II、III和IV为感染组。
Note: CK means blank control group; I, II, III and IV mean the infected groups.

本研究结果表明：感染第 5 天，试验鸡的盲肠组织 *IL-2* 基因表达量显著升高，感染第 7 天，感染 I、II 组盲肠组织 *IL-2* 基因表达量相比感染第 5 天时降低，感染 III、IV 组持续升高。推测 *IL-2* 在机体防御球虫感染时存在着最高临界值，当感染超过一定程度时，机体细胞免疫功能受阻，*IL-2* 诱导杀伤细胞分化和效应的作用降低。

IFN-γ 是水溶性二聚体细胞因子，由活化 T 细胞和自然杀伤细胞产生，具有抗病毒、抗肿瘤和抗寄生虫感染的生物活性，在机体免疫调节中发挥重要作用。据报道，*IFN-γ* 被认为在抵抗球虫感染中最为重要的细胞因子，在鸡球虫感染中抑制孢子在盲肠上皮细胞内的繁殖。研究结果表明：感染 7 d 内，试验鸡的盲肠组织 *IFN-γ* 基因 mRNA 表达量持续升高，*IFN-γ* 基因 mRNA 表达量与感染剂量、感染时间及盲肠组织损伤程度呈正相关，与文献^[22-25]报道一致。



注：同一时间不同组别相比，不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)，不同大写字母表示差异极显著 ($P<0.01$)。
Note: Among different groups in the same time different small letters indicate significant difference ($P<0.05$), different capital letters indicate extremely significant difference ($P<0.01$).

图 3 各试验组盲肠组织 *IL-2*、*IL-17*、*TGF-β1* 和 *IFN-γ* 基因 mRNA 相对表达量比较

Fig. 3 Comparison of mRNA expression levels of *IL-2*, *IL-17*, *TGF-β1* and *IFN-γ* mRNA in cecal tissues of each experimental group

[参考文献]

- [1] BLAKE D P, TOMLEY F M. Securing poultry production from the ever-present *Eimeria* challenge[J]. Trends Parasitol, 2014, 30(1): 12. DOI: [10.1016/j.pt.2013.10.003](#).
- [2] 李超, 顾小龙, 卢春霞, 等. 我国鸡球虫病流行病学研究进展[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2018, 25(4): 230. DOI: [10.3969/j.issn.1005-0507.2018.04.006](#).
- [3] 刘剑华, 刘连瑞, 李灵娟, 等. 鸡球虫共同抗原 UCE 免疫原性分析及其对多种球虫感染的免疫保护效果评估[J]. 南京农业大学学报, 2018, 41(3): 496. DOI: [10.7685/jna.201801008](#).
- [4] 李可, 徐小艾, 李秋明, 等. 鸡柔嫩艾美耳球虫对免疫细胞体外增殖及产生的免疫相关分子的影响[J]. 北京农学院学报, 2018, 33(2): 64. DOI: [10.13473/j.cnki.issn.1002-3186.2018.0212](#).
- [5] MO P H, MA Q T, ZHAO X, et al. Apoptotic effects of antimalarial artemisinin on the second generation merozoites of *Eimeria tenella* and parasitized host cells[J]. Veterinary Parasitology, 2014, 206(3/4): 297. DOI: [10.1016/j.vetpar.2014.09.025](#).
- [6] 蔡海莹, 汪丽伟, 徐晓娟, 等. 茶多酚抗柔嫩艾美耳球虫的效果及作用机制[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(3): 427. DOI: [10.16303/j.cnki.1005-4545.2014.03.015](#).
- [7] 赵丽娟. 中药复方制剂对雏鸡人工感染柔嫩艾美耳球虫的疗效研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2018.
- [8] IVAN P F, ELAINE P, SARAH E, et al. Laboratory growth and genetic manipulation of *Eimeria tenella*[J]. Current Protocols in Microbiology, 2019, 53(1): 81. DOI: [10.1002/cpmc.81](#).
- [9] 辛世杰, 王晓慧, 戴国俊, 等. 京海黄鸡柔嫩艾美耳球虫感染对脾脏和盲肠 *IL-6*、*IL-8*、*CCLi2* 基因表达量的影响及其相关性[J]. 浙江农业学报, 2019, 31(1): 39. DOI: [10.3969/j.issn.1004-1524.2019.01.05](#).
- [10] SANTI D U, SUK H C, THAU K C, et al. Anti-coccidial effect of essential oil blends and vitamin D on broiler chickens vaccinated with purified mixture of coccidian oocyst from *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima*[J]. Poultry Science, 2019, 98(7): 2919. DOI: [10.3382/ps/pez040](#).
- [11] 闫志强, 郑华, 朱买勋, 等. 女黄颗粒对免疫抑制模型小鼠脾组织病理及细胞周期的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49(12): 2771. DOI: [10.11843/j.issn.0366-6964.2018.12.027](#).
- [12] 王卉, 于三科, 林青, 等. 日龄和感染量对柔嫩艾美耳球虫感染鸡组织病理学变化的影响[J]. 中国兽医科学, 2008, 38(11): 973. DOI: [10.3969/j.issn.1673-4696.2008.11.011](#).
- [13] 吴家斌, 金丽珠, 吴欢生, 等. 鸡柔嫩艾美耳球虫感染及盲肠组织病理变化观察[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2013, 6(12): 44. DOI: [10.13881/j.cnki.hljxmsy.2013.12.031](#).
- [14] MACDONALD S E, VAN DIEMEN P M, MARTINEAU H, et al. Impact of *Eimeria tenella* coinfection on campylobacter jejuni colonization of the chicken[J]. Infection and immunity, 2019, 87(2): 1. DOI: [10.1128/iai.00772-18](#).
- [15] ZHANG D F, SUN B B, YUE Y Y, et al. Anticoccidial activity of traditional Chinese herbal *Dichroa febrifuga* Lour. extract against *Eimeria tenella* infection in chickens[J]. Parasitology Research, 2012, 111(6): 2229. DOI: [10.1007/s00436-012-3071-y](#).
- [16] SHAFIYA I R, RAJAT G, REENA K K, et al. Immune response and protective efficacy of *Eimeria tenella* recombinant refractile body protein, EtSO7, in chickens[J]. Veterinary Parasitology, 2018, 258(6): 108. DOI: [10.1016/j.vetpar.2018.06.013](#).
- [17] MAHMOUD A L, HEBA M, ABDEL Haleem, et al. Anticoccidial activities of Chitosan on *Eimeria papillata* infected mice[J]. Parasitology Research, 2016, 115(7): 2845. DOI: [10.1007/s00436-016-5035-0](#).
- [18] ZHANG L, LIU R Q, SONG M, et al. *Eimeria tenella*: Interleukin 17 contributes to host immunopathology in the gut during experimental infection[J]. Experimental Parasitology, 2013, 133(2): 121. DOI: [10.1016/j.exppara.2012.11.009](#).
- [19] TRAN D H, DOAN T T, JAVAID A G, et al. Analysis of humoral immune response and cytokines in chickens vaccinated with *Eimeria brunetti* apical membrane antigen-1 (EbAMA1) DNA vaccine[J]. Experimental Parasitology, 2014, 144(5): 65. DOI: [10.1016/j.exppara.2014.04.015](#).
- [20] SONG X K, HUANG X M, YAN R F, et al. Efficacy of chimeric DNA vaccines encoding *Eimeria tenella* 5401 and chicken IFN- γ or IL-2 against coccidiosis in chickens[J]. Experimental Parasitology, 2015, 156(5): 19. DOI: [10.1016/j.exppara.2015.05.003](#).
- [21] WANG D F, ZHOU L L, LI W, et al. Anticoccidial effects of areca nut (*Areca catechu* L.) extract on broiler-icks experimentally infected with *Eimeria tenella*[J]. Experimental Parasitology, 2018, 184(11): 16. DOI: [10.1016/j.exppara.2017.11.002](#).
- [22] LIU J H, LIU L R, LI L J, et al. Protective immunity induced by *Eimeria* common antigen 14-3-3 against *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina* and *Eimeria maxima*[J]. BMC Veterinary Research, 2018, 14(1): 79. DOI: [10.1186/s12917-018-1665-z](#).
- [23] OELSCHLAGER M L, RASHEED M S A, SMITH B N, et al. Effects of *Yucca schidigera*-derived saponin supplementation during a mixed *Eimeria* challenge in broilers[J]. Poultry Science, 2019, 98(8): 3212. DOI: [10.3382/ps/pez051](#).
- [24] 闫鑫磊. 逸出介导的艾美耳球虫清除的分子机制的初步研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2016.
- [25] 尉浩华, 林雨鑫, 王成丽, 等. 京海黄鸡柔嫩艾美耳球虫抗性和易感鸡抗性指标的比较研究[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(5): 740. DOI: [10.16303/j.cnki.1005-4545.2014.05.017](#).

责任编辑: 何承刚