

<b>01/03/13 - Respuesta inmune protectora contra la coccidiosis en la aves: Revisión.</b>
---

Vet. Arg. ? Vol. XXX - Nº 299 ? Marzo 2013.

\*Graciela Beatriz Pascual.

### Resumen.

Esta revisión bibliográfica resume los conocimientos actuales sobre la respuesta inmune protectora contra la coccidiosis en las aves.

La coccidiosis es una infección intestinal causada por parásitos intracelulares, del género *Eimeria*, esta es una de las enfermedades de mayor importancia económica de las aves.

A pesar de que la infección por *Eimeria* promueve una respuesta inmune humoral y una respuesta inmune celular, la inmunidad celular, mediada por varias poblaciones celulares, incluyendo LT, células NK, y macrófagos, sería más importante en la resistencia a la enfermedad.

La penetración de *Eimeria* spp en las células hospedadoras requiere la liberación de las proteínas de los micronemas, una proteína de micronema de *E. tenella* secretada por la interfaz hospedador?Parasito estaría íntimamente involucrada en la invasión celular.

Los esporozoítos serían los más importantes para el desarrollo de la respuesta inmune, aunque la dinámica de la respuesta de anticuerpos, sería similar a los antígenos de esporozoítos y de merozoítos en las aves infectadas con *E. tenella*.

Los esporozoítos luego de penetrar el epitelio migrarían desde la punta de la vellosidad a la cripta transportados por linfocitos intraepiteliales.

Las distintas especies de *Eimeria* inducen la activación de los macrófagos, las que serían las principales células inflamatorias efectoras en la infección. Sin embargo más de un tipo celular estaría involucrado en la inhibición del desarrollo de esporozoítos en la lámina propia de pollos inmunes.

Palabras clave: coccidiosis aviar, *Eimeria*, respuesta inmune, inmunidad.

**Protective immune response against coccidiosis in poultry: review.**

### Summary.

This literature review summarizes current knowledge about the protective immune response against coccidiosis in poultry.

Coccidiosis is an intestinal infection caused by intracellular parasites of the genus *Eimeria*. This is one of the diseases of major economic importance in birds.

While *Eimeria* infection promotes a humoral immune response and cellular immune response, cellular immunity ? mediated by various cellular populations , including

LT, NK cells, and macrophages ? would be most important in disease resistance.

The penetration of *Eimeria* spp. in the host cells requires the release of proteins from the micronemes, a protein of micronema of *e. tenella* secreted by the host-parasite interface which would be intimately involved in cell invasion.

The sporozoites would be within the parasite's life cycle, the most important for the development of the immune response, although the dynamics of antibody response would be similar to the antigens of sporozoites and merozoites in birds infected with *e. tenella*.

The sporozoites penetrate the epithelium and then migrate from the tip of the villus crypt transported by intraepithelial lymphocytes.

The various species of *Eimeria* induce the activation of macrophages, which would be the main inflammatory effector cells in infection. However more than one cell type would be involved in the inhibition of the development of sporozoites in the lamina propria of immune chickens.

keywords: avian coccidiosis, *Eimeria*, immune response, immunity.

\**Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA, Av. San Martín 5285 (1417DSM)*

*gpascual@fvet.uba.ar*

## Introducción.

La coccidiosis es una infección intestinal causada por parásitos intracelulares, pertenecientes al género *Eimeria*, considerada una de las enfermedades de mayor importancia económica de las aves.

Debido a que la invasión de *Eimeria* se produce vía mucosa intestinal, en los pollos el tejido linfoide asociado a intestino (TLAI) juega un rol decisivo como barrera de defensa.

Inmediatamente después de la infección con *Eimeria* spp, los Linfocitos B (LB) comienzan a producir anticuerpos (Ac) específicos, pero su rol en la defensa contra *Eimeria* es discutible ya que una gran evidencia experimental muestra que la inmunidad mediada por células, predominantemente por linfocitos intraepiteliales (LIE) y linfocitos de la lámina propia, representa el principal componente de la inmunidad protectora contra coccidiosis aviar (Lillehoj, H., et al, 2004). Los LT CD8+ y el IFN- $\gamma$  fueron identificados como componentes de la respuesta inmune protectora (Lillehoj, H., 2007).

A pesar de que la infección por *Eimeria* promueve una respuesta inmune humoral y una respuesta inmune celular, la inmunidad celular, mediada por varias poblaciones celulares, incluyendo LT, células NK, y macrófagos, jugaría un rol más importante en la resistencia a la enfermedad (H., Lillehoj, and Trout J., 1996).

Hay evidencias de que LT CD4+ y LIE están involucrados en una infección primaria de *Eimeria* (Lillehoj, H. 1998).

Estudiando la respuesta inmune que induce cada una de las especies de *Eimeria* que afectan más frecuentemente a la producción, *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella*, se observan tanto semejanzas como diferencias.

La susceptibilidad a la coccidiosis depende de varios factores incluyendo la especie de *Eimeria*, el estado nutricional de los pollos infectados previo a la exposición, y a la genética del hospedador. Una eficiente respuesta inmune innata protegería contra las infecciones por coccidios (Swaggerty, C. *et al* 2011).

Durante la infección, el sistema inmune puede inhibir el desarrollo parasitario cuando los esporozoítos buscan el sitio de penetración en el epitelio, cuando los esporozoítos están en el epitelio de la vellosidad intestinal entre los LIE y durante el pasaje a través de la lámina propia a las criptas. El pasaje y la presencia de los parásitos en la lámina propia inducen inmunidad. Los esporozoítos parecen ser, dentro del ciclo de vida del parásito, los más importantes para el desarrollo de la respuesta inmune, y los LT citotóxicos serían necesarios para inhibir al parásito (Jeurissen, S., *et al* 1996). No obstante, en cuanto a la dinámica de la respuesta de anticuerpos, según Constantinoiu *et al* (2007), esta sería similar a los Ag de esporozoítos y merozoítos en las aves infectadas con *E. tenella*.

Después de que los pollos ingieren ooquistes de *E. tenella*, los esporozoítos son liberados durante su pasaje por el tracto digestivo y buscan su lugar de penetración. Los coccidios del género *Eimeria* completan su ciclo de vida dentro de las células epiteliales del intestino de los pollos, sin embargo los esporozoítos de *E. tenella* son a veces encontrados en macrófagos o LIE, pero se debe a que el parásito puede ser trasladado dentro de esas células por la lámina propia y tener acceso a las células epiteliales de las criptas (Laurent, F. *et al*, 2001).

*Eimeria* spp parasita distintas regiones del intestino, aunque la razón de esta especificidad es desconocida, Jeurissen, S., *et al* (1996) detectaron utilizando Ac monoclonales anti antígenos (Ag) de *E. tenella*, epitopes de los esporozoítos de *E. tenella* en la superficie de la región apical del epitelio cecal. El Ac monoclonal no reacciona con otra especie de *Eimeria* ni con el epitelio de otra parte del intestino, sugiriendo que el sitio específico del parásito es determinado por moléculas presentes en ambas células, el enterocito y el esporozoíto.

Aunque los esporozoítos de *E. tenella* muestran preferencia por el ciego *in vivo*, invaden *in vitro* cultivos de otros tipos celulares, por lo que se especula que componentes de la luz del ciego son reconocidos por el Ac monoclonal. El hallazgo de epitopes específicos para el sitio de invasión de los esporozoítos de *E. tenella*, apoyó la idea que la molécula receptor pudiera ser candidata a inmunógeno para la elaboración de vacunas basadas en la inhibición de la invasión del parásito (Jeurissen, S., *et al* 1996). Los esfuerzos puestos en clonar genes de *Eimeria* spp para utilizar como potenciales vacunas recombinantes hacen que, genes y proteínas sean investigadas como candidatos a vacuna. La penetración de *Eimeria* spp en las células hospedadoras requiere la liberación de las proteínas de los

micronemas, una proteína de micronema de *E. tenella*, EtMIC2, es secretada por la interfaz de hospedador? Parasito y estaría íntimamente involucrada en la invasión de la célula huésped (Sasai, K, 2008)

### **Respuesta inmune celular.**

Después de que los esporozoítos penetran el epitelio, migran desde la punta de la vellosidad hacia la cripta donde se desarrolla la fase asexual. Los esporozoítos serían transportados a través de la lámina propia por LIE (Rose, M. et al 1984).

Los LIE son las células hospedadoras de los esquizontes de primera generación de *E. dispersa* en pavos y transportan los esporozoítos de *E. tenella* desde la superficie del epitelio a su sitio de replicación dentro de los enterocitos de las criptas cecales de los pollos (Lawn, A., et al.1988).

Sin embargo, durante la infección con *E. tenella* no fueron detectados monocitos, ni macrófagos en el epitelio cecal, pero sí una población de células, no-B, no-T, no-monocito que presentaron CD45. Utilizando anti-esporozoítos y anti-CD45 monoclonales, se vio que incluso cuando los LIE eran abundantes, ellos contenían sólo unos pocos esporozoítos, por lo tanto, según estos resultados, el rol de LIE en el transporte de esporozoítos a través de la lámina propia sería dudoso (Jeurissen, S., et al 1996).

Una vez que los esporozoítos llegan a la lámina propia su distribución dentro de la vellosidad difiere en los pollos inmunizados de los que no lo están. En pollos no inmunizados los esporozoítos pudieron llegar al epitelio de las criptas donde desarrollaron. En pollos inmunes, significativamente menos esporozoítos llegaron a las criptas y la formación de esquizontes fue inhibida, ya que los esporozoítos penetraron la vellosidad epitelial en la misma cantidad en los pollos inmunizados y los no inmunizados. Por lo que Jeurissen, S. et al., (1996) concluyen que los esporozoítos son inhibidos por leucocitos de la lámina propia.

Comparando la fase asexual de *E. tenella* en pollos inmunizados y controles, y poniendo especial atención a los aspectos cuantitativos y al transporte de esporozoítos dentro de los LIE desde los enterocitos de la superficie a los enterocitos de las criptas, se vio un descenso moderado en el número de parásitos que había inicialmente en la mucosa de los pollos inmunizados, sugiriendo que algunos de los efectos de la inmunidad son ejercidos antes de la penetración en los enterocitos. Pero la reducción en el número de parásitos en desarrollo fue más marcada debido al fracaso en la transferencia de esporozoítos desde los LIE a los enterocitos de las criptas (Rose, M., et al. 1984).

Los macrófagos juegan un importante rol en la respuesta inmune innata y en la respuesta inmune adquirida. Durante el primer día de una infección primaria de *Eimeria* spp macrófagos, granulocitos y linfocitos infiltran masivamente la lámina

propia. Los esporozoítos que no llegaron a las criptas después de las 48 hs de la inoculación intracecal fueron detectados dentro o rodeado de macrófagos (Jeurissen, S. et al., 1996).

La primera línea de defensa contra *Eimeria* es proporcionada por las células epiteliales infectadas y las células más cercanas en contacto, como LIE y fibroblastos.

La inflamación observada en el intestino infectado por *Eimeria* está asociada con infiltración de macrófagos y LT, acompañada por edema y espesamiento de la mucosa (Laurent, F. et al, 2001).

Después de una infección primaria y secundaria con *Eimeria acervulina* se vio que aumentaba el porcentaje de LIE ?? en el duodeno.

La IL-1 estimula la secreción de quimioquinas por fibroblastos, macrófagos y células epiteliales, que pueden entonces atraer células inflamatorias como macrófagos, heterófilos y linfocitos, amplificando así la respuesta inmune.

En pollos inmunizados contra *E. tenella*, macrófagos y otros leucocitos infiltran el ciego más rápidamente que en pollos no inmunizados (Dalloul, R., et al, 2007).

Cuando la infección producida no es mortal, *Eimeria* induce protección inmunitaria contra un posterior desafío; la protección es específica para la especie que la produjo y no habría protección cruzada entre las distintas especies de *Eimeria*.

*E. maxima* se caracteriza por la alta inmunogenicidad, cuando se produce la primera infección sólo unos pocos ooquistes inducen protección inmunitaria completa a posteriores desafíos homólogos. Por el contrario, muchos más ooquistes de *E. acervulina* y *E. tenella* son necesarios para inducir niveles comparables de protección (Dalloul, R., et al, 2007, Lillehoj, H., et al 2007).

La activación de los macrófagos es uno de los primeros eventos inducidos por las distintas especies de *Eimeria*. La citoquina proinflamatoria IL-1 fue altamente inducida por las tres especies.

La IL-1 es secretada por macrófagos y otras células activadas y regula la producción de otras quimioquinas y citoquinas como la OPN, amplificando la respuesta inmune. La MIP-1? y la K203 (una proteína del pollo de 68 aminoácidos) que pertenecen a la familia CC-quimioquinas, están normalmente involucradas en el reclutamiento de macrófagos. Los macrófagos serían las principales células inflamatorias efectoras en el sitio de infección de *Eimeria* (Dalloul, R., et al, 2007, Lillehoj, H., et al, 2007).

Otras investigaciones obtienen similares resultados, sugiriendo que los macrófagos, son las principales células efectoras inflamatorias en infecciones con *Eimeria*.

El Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es una citoquina proinflamatoria que juega un importante papel en la defensa del hospedador contra varios microorganismos, incluidos parásitos protozoarios. Además hay microorganismos que expresan una proteína similar a MIF, aunque su papel en la

patogénesis de la enfermedad no es bien conocido. Al comparar una proteína codificada de *Eimeria* MIF (EMIF) con una de pollo MIF (CMIF) sobre la base de sus propiedades estructurales, inmunológicas y biológicas, Jang *et al* (2011), concluyen que EMIF y CMIF median roles inmunoreguladores distintos, tanto *in vitro* como *in vivo* en pollos a pesar de compartir propiedades estructurales y antigénicas comunes. Dada su capacidad para aumentar la protección contra la infección experimental de *Eimeria*, EMIF recombinante podría ser un potencial candidato vacunal. Asimismo CMIF recombinantes pueden ser aplicables a otras enfermedades de las aves de corral basado en su capacidad de afectar la migración de leucocitos.

También la OPN se describe como un importante componente de la respuesta celular temprana, realza la respuesta Th1 e inhibe la Th2. Una expresión temprana de citoquinas Th1 es crítica en una respuesta protectora contra una infección intracelular.

Por lo tanto factores que estimulan citoquinas Th1 e inhiben citoquinas Th2 pueden funcionar como poderosos moduladores de la inmunidad mediada por células.

En otras investigaciones, utilizando RT-PCR cuantitativa, observaron que muchas citoquinas implicadas en Th1 y Th2 fueron inducidas simultáneamente después de la infección, reflejando la complejidad de la respuesta inmune local inducida por *Eimeria* en el intestino. (Lillehoj, H., et al, 2007).

El IFN- $\gamma$  aparece rápidamente en infecciones con *E. tenella* pero no en las producidas por las otras dos especies. Los niveles de IFN- $\gamma$  aumentan en respuesta a infecciones con *E. tenella in vitro* e *in vivo* (Dalloul, R., et al, 2007) e inhibe el desarrollo intracelular de *Eimeria tenella in vitro* e *in vivo* (Lillehoj, H., 2007).

El IFN- $\gamma$  es un factor principal en el desarrollo de resistencia a *Eimeria*, como inhibidor del desarrollo de *E. tenella in vitro* y reducción de la producción de ooquistes y de la pérdida de ganancia de peso en infecciones de *E. acervulina* (Laurent, F., et al 2001).

Byrnes, S, et al (1993) estudiando la producción de IFN durante los primeros 20 días postinfección con *Eimeria*, encontraron que entre los 10 y 15 días pi no fue significativa la diferencia en la producción de IFN por los LT de pollos infectados y no infectados. En el día 20 pi la producción de IFN por los LT de pollos infectados fue significativamente mayor que la de pollos no infectados. Esto indicaría que el IFN podría ser una de las citoquinas producidas más tardíamente.

Sin embargo, Juárez Estrada, M. *et al*, (1999) evaluaron el IFN secretado durante la infección experimental primaria con *E. tenella*, observando que el IFN del grupo desafiado alcanzó un pico al día 5 pi, que difirió del grupo testigo, bajó ligeramente al día 7 pi y se incrementó al día 9 pi.

Otras citoquinas y quimioquinas muestran expresiones diferentes a las especies de *Eimeria*. La IL-18, un tipo de citoquina Th1, fue inducida a las 18 hs en *E. acervulina* y *E. tenella* y después de las 48 hs en respuesta a la exposición de *E.*

*maxima* (Dalloul, R., et al, 2007).

También se vio que la MIP-1 $\alpha$  hizo un pico a las 18 hs en respuesta a esporozoítos de *E. acervulina* y *E. tenella*, pico que en *E. maxima* se produjo a las 4 hs. (Dalloul, R., et al, 2007).

Otras moléculas involucradas en la respuesta inmune de la mucosa, además de las citoquinas son las prostaglandinas. Su síntesis a partir del ácido araquidónico depende de la actividad de la COX-2. Altos niveles de COX-2 pueden inducirse en macrófagos y en células del epitelio intestinal por estimulación de IL-1 y TNF. La producción de prostaglandina podría ocurrir en respuesta a *E. tenella* y a *E. acervulina* (Laurent, F., et al. 2001).

Siete días después de la infección con *E. tenella*, se vio que aumentó la expresión de IL-1. Además las CC-quimioquinas, K203 y la MIP-1 $\alpha$  se encontraron en el ciego infectado, pero no CXC-quimioquinas, IL-8 y K60. Sin embargo, estas CXC-quimioquinas fueron expresadas en altos niveles en extractos de ciego no infectados.

Los niveles de IFN- $\gamma$  aumentaron mucho durante la infección con *E. tenella*, mientras que la COX-2 mostró un leve incremento. La presencia de gran cantidad de IFN- $\gamma$  en la mucosa es capaz de estimular la síntesis de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias.

Mientras la MIP-1 $\alpha$ , el IFN- $\gamma$  y la NOS mostraron niveles similares en el ciego y en el yeyuno, IL-1, COX-2, K60, K203, y especialmente IL-8 se expresaron más en el ciego. Los niveles de citoquinas alcanzados fueron dependientes de la dosis de oocistos inoculados.

Las CC-quimioquinas K203 y MIP-1 $\alpha$  expresadas durante la infección con *E. tenella*, sugiere un rol para estas moléculas en la respuesta inmune de la mucosa intestinal (Laurent, F., et al, 2001).

En la respuesta inmune a coccidiosis, un nuevo péptido secretado por LT y células NK con actividad antiparasitaria fue identificado como NK lysin. Por RT-PCR de genes de NK lysin se revelaron altos niveles de transcripción en los LIE y células esplénicas pero bajos niveles en linfocitos tímicos (Hong, Y. H., 2006, Lillehoj, H., 2007). Además los niveles de transcripción de NK lysin aumentaron en LIE intestinales tras la infección con *Eimeria*. Detectados a los 3 a 4 días pi con *E. máxima* y *E. tenella* y, 7 a 8 días pi con *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella* (Hong, Y. H., 2006).

El rol de los LT en la protección contra coccidiosis fue bien estudiado en pollos inmunosuprimidos con ciclosporina A, betametasona, dexametasona, timectomía y Ac monoclonales contra CD8+ o ??.

El número de LIE CD3+ aumenta en la mucosa del yeyuno infectada con *E. maxima*. Siete días después de la infección se observó el reclutamiento de células CD3+ en la lámina propia y el epitelio del yeyuno infectado con *E. maxima*. LIE CD3+ aislados del yeyuno infectado produjeron más IFN- $\gamma$  que los LIE CD3+

aislados del yeyuno no infectado (Laurent, F., et al, 2001).

En la infección con *E. maxima* LT CD4+ y CD8+ fueron observados en el intestino, siendo mayor la proporción de CD8+ (Lillehoj, H., et al, 2004).

El IFN- $\gamma$  induce la expresión de NOS en varios tipos de células, incluyendo células epiteliales y macrófagos, y es más importante durante la infección con *E. tenella* que con *E. maxima*. Durante la infección con *E. maxima*, niveles de nitrito y nitrato alcanzan valores pico alrededor de los 6 días postinoculación. Esto podría contribuir a las hemorragias observadas frecuentemente después de una infección con *E. tenella*, por la vasodilatación causada en el ciego (Laurent, F., et al, 2001).

Durante la infección con *E. tenella*, se vio que la proporción de CD4+ en los LIE del ciego aumentó en el día 8 postinfección, y CD8+ aumentó en el día 6 y 8 postinfección. Mientras la proporción de LT CD4+ disminuye en el bazo en el día 8 postinfección, y CD8+ disminuye en la sangre en el día 6 (Lillehoj, H., et al, 2004).

En las primeras 48 hs de una infección primaria de *E. tenella* aumenta la cantidad de LT CD4+ superando a los LT CD8+. Si bien un gran número de estas células fueron detectadas, éstas no estaban en contacto cercano con esporozoítos. LT CD4+ fueron más tarde detectados en áreas abundantemente infectadas donde desarrollaron numerosos esquizontes, indicando que esas células juegan un rol en la inducción de la inmunidad (Jeurissen, S. et al., 1996).

En contraste al sistema inmune de pollos no inmunizados, incapaces de inhibir el ciclo de vida de *E. tenella*, el sistema inmune de pollos infectados repetidamente puede bloquear casi completamente la proliferación de los parásitos.

Mientras en el ciego de pollos no inmunizados, el número de LT CD4+ aumenta significativamente dos días después de una primera infección con *E. tenella*, en pollos inmunes infiltran la lámina propia principalmente LT CD4+ y CD8+ (Lillehoj, H., et al, 2004). Durante la infección, en pollos inmunes, los leucocitos infiltran rápidamente la lámina propia, encontrándose allí más LT CD8+ que CD4+ próximos a esporozoítos. Algunos esporozoítos fueron detectados dentro o próximos a macrófagos en la lámina propia de pollos inmunizados, pero significativamente más esporozoítos son encontrados dentro o próximos a LT, especialmente CD8+. Estos resultados indican que más de un tipo celular está envuelto en la inhibición del desarrollo de esporozoítos en la lámina propia de pollos inmunes. Los LT CD8+ podrían inhibir el desarrollo de esporozoítos directa o indirectamente por producción de citoquinas que activan otras células (Jeurissen, S. et al., 1996).

En la coccidiosis, la eliminación selectiva de LT CD8+ por medio de anti-CD8+ resultó en exacerbación de la enfermedad, con aumento de eliminación de ooquistes después de la infección con *E. tenella* o *E. acervulina* (Lillehoj, H., et al, 2004).

Comparaciones entre estudios *in vivo* y estudios *in vitro* revelaron que el IFN- $\gamma$  y el FNT- $\gamma$  son inducidos después de la infección de *Eimeria*. Revelaron además la importancia de los LT CD8+ en la inmunidad protectora contra la coccidiosis aviar



(Lillehoj, H. 1998). Después de la infección con *E. maxima*, LT CD4+ y CD8+ participan en la respuesta inmune, siendo mayor la participación de LT CD8+ (Lillehoj, H., et al, 2004).

Después del desafío con *E. acervulina* se observó un significativo aumento en la proporción de CD4+ y CD8+ en los LIE duodenales desde los 4 a 8 días postinfección. En contraste, la proporción de LT CD8+ disminuye significativamente en la sangre y en el bazo en el día 4 y 6 postinfección (Lillehoj, H., et al, 2004).

Después de una segunda infección con *E. acervulina*, aumentan significativamente en el duodeno los LT CD8+ (Lillehoj & Bacon, 1991; Lillehoj, 1994), que también estarían implicados en el transporte de los esporozoítos de *E. acervulina* al sitio de desarrollo (Lillehoj, H., et al, 2004).

El rol de LT CD4+ en coccidiosis puede involucrar la producción de citoquinas solubles como el IFN- $\gamma$ . Utilizando RT-PCR se observó el incremento de la expresión de IFN- $\gamma$  mRNA en los linfocitos de las tonsilas cecales en pollos infectados con *E. tenella* (Lillehoj, H., et al, 2004).

### **Respuesta Inmune Humoral.**

El rol de los Ac en la protección contra coccidios es controversial. Los resultados de la bursectomía no sugieren un rol protector para Ac circulantes en una primera infección (Rose & Long, 1970; Lillehoj, 1987) y la transferencia pasiva de Ac específicos protege sólo en algunos casos (Girard, F. et al. 1997).

Lee, S., et al (2009) demostraron que al alimentar a pollitos con una dieta con yema de huevo hiperinmune, Ig Y (Ig G) contra *E. tenella* y *E. maxima*, se les provee una significativa protección contra coccidiosis y que esta inmunización pasiva estratégica puede interrumpir el ciclo de vida de *Eimeria sp.*

Además, Ac producidos localmente en el intestino, Ig A, después de una infección de *Eimeria spp* podrían proteger contra la enfermedad. La síntesis de Ig A aumenta después de la infección con *E. tenella* e inhibe la invasión de esporozoítos y su desarrollo en cultivos celulares.

Una alta concentración de Ig A en la vesícula biliar se acompaña de bajo número de esporozoítos en pollos inmunizados. Sugiriendo que la Ig A es parte de la respuesta inmune que protege contra *Eimeria* (Girard, F. et al. 1997).

Los títulos de Ac en el suero son una evidencia clara de una exposición previa con coccidios y desarrollaría en paralelo con la inmunidad celular. Mediante un Elisa fueron medidos los niveles de Ac en el suero contra Ag soluble de ooquistes de *E.*

*tenella*, observando que sueros de aves reproductoras de 10, 23, 37 y 43 semanas de edad eran positivos con títulos de Ac uniformemente altos. Además, sueros de pollitos parrilleros mostraron al nacimiento títulos altos de Ac maternas que disminuyeron, hasta niveles casi no detectables, a las tres semanas de edad. Pollitos de dos semanas de edad tuvieron respuestas variables a una única infección con *E. tenella*. Los títulos fueron elevados en los días 8 a 10 después de la infección y generalmente aumentaron hacia el día 24. Una reinfección semanal en pollos parrilleros de dos semanas de edad produjo títulos de Ac en proporción al número de ooquistes por dosis recibida (Gilbert, M., et al, 1988).

Según experiencias de Constantinoiu *et al* (2007), Ac de aves infectadas con *E. tenella* reaccionaron de manera similar con Ag de esporozoítos que con Ag de merozoítos, sugiriendo que la mayoría de los antígenos son comunes a las dos etapas del ciclo de vida. La dinámica de la respuesta de anticuerpos a los Ag de merozoítos y esporozoítos en las aves infectadas con *E. tenella* también fue similar. No hubo respuesta detectable de Ac al día 7 pi pero sí una fuerte respuesta de Ac a los Ag de ambos estuvo presente a los 14 días pi hasta aproximadamente 21 días después de la infección primaria, luego disminuyeron ligeramente antes de llegar a una meseta y persistió, presumiblemente debido a la continua exposición como resultado de la reinfección por recirculación de ooquistes.

Lee, K. *et al* (2012) Informan los efectos de los programas anticoccidiales, comúnmente practicados, en el desarrollo de anticuerpos séricos específicos de *Eimeria* y la contaminación con *Eimeria* spp de las camas. Los resultados de ELISA mostraron títulos inicialmente bajos el día 14 que aumentaron linealmente, indicando que el desarrollo de la inmunidad humoral contra la exposición natural a los ooquistes de *Eimeria* presentes en la cama, depende de la edad. Encontraron niveles de títulos de Ac variables entre los distintos programas anticoccidiales utilizados. Asimismo, vieron que no hubo ninguna correlación directa entre los niveles de Ac *Eimeria* específicos y el número de ooquistes presentes en las camas, los que claramente variaron según el programa anticoccidial además de modificarse la proporción de las distintas especies de *Eimeria*.

Una infección primaria de *E. acervulina* dispara una significativa producción de Ac, la Ig M aparece en la primera semana p.i., la Ig A y la Ig G aparecen durante la segunda semana. Se observó que la respuesta Ig A fue de corta duración y la respuesta Ig M específica decreció en las siguientes semanas (Girard, F. et al. 1997).

La amplitud de la producción de Ig específica fue siempre grande en el área parasitada (duodeno) para la Ig A y para la Ig M. La misma cantidad relativa de Ig G específica fue observada en el duodeno y en el ciego. Cada isotipo fue idéntico en el suero, excepto para el ascenso inicial de Ig A durante la primera semana pi. Similar respuesta de Ig M, local y sistémica, fue vista después de una infección de *E. tenella*. Asimismo fue detectada Ig G específica en circulación.

Estudios empleando tests de precipitación y neutralización revelaron aumento de Ig A específica en el ciego 7 días pi., con un pico 10 días más tarde que fue asociado con recuperación. Además, empleando tests de inmunofluorescencia y de aglutinación, pudo verse que Ac Ig A específicos en el ciego y bilis, después de una infección con *E. tenella*, pueden unirse a la membrana de los esporozoitos (Girard, F. et al. 1997). Otros resultados muestran considerable cantidad de Ig G específica en el duodeno y en el ciego de pollos infectados con *E. acervulina* o *E. tenella*. Producción que no aparece hasta la segunda semana de infección, mientras la producción de Ig M específica es alta en la primera semana de infección y la respuesta Ig A es limitada a la segunda semana pi. (Girard, F. et al. 1997).

Jeurissen et al. (1989) usando AC monoclonales contra Ig M e Ig A de pollo, encontraron células plasmáticas Ig M+ e Ig A+ en la lámina propia de las vellosidades e Ig M e Ig A en la submucosa tres semanas después de la infección con *E. tenella*.

Otros investigadores detectaron LB Ig M+ en el epitelio intestinal del yeyuno después de una infección de *E. maxima*. Presentando dos picos de proliferación, el primero un día después de la infección y seis días después el segundo. Se detectaron también, células Ig A+ en el epitelio después del segundo desafío con ooquistes 15 días después del periodo prepatente. Como respuesta a *E. tenella* hay producción significativa de Ig A, Ig M e Ig G específicas también en el duodeno, que sugieren que linfocitos estimulados por antígenos parasitarios en la mucosa intestinal, circulan a través del intestino y llegan al sitio intestinal donde *Eimeria* no desarrolla. Esto podría producirse rápidamente después de la infección. Otra posibilidad sería que Ag de membrana sean liberados en el intestino, y que disparen la respuesta inmune en distintas áreas del intestino (Girard, F. et al. 1997).

Frecuentemente se concluye que los Ac juegan sólo un papel menor en la inmunidad protectora contra *Eimeria*. Según Wallach (2010) una explicación es que esta afirmación se refiere a la falta de una necesidad de producción de anticuerpos en el desarrollo de la inmunidad activa, sólo necesaria contra infecciones secundarias ya que la inmunidad celular puede ser muy eficaz en el control del parásito en una primera infección. Al respecto, los resultados de inmunización pasiva y materna para inhibir las infecciones primarias no son considerados adecuados. Una segunda explicación es que los investigadores están decididos a desarrollar una vacuna a subunidades que proporcione resistencia completa y duradera a la infección como la que se obtiene mediante inmunización con ooquistes vivos y esto es difícil lograr utilizando Ac solos.

## **Bibliografía Consultada.**

BYRNES, S., EMERSON, K., KOGUT, M., 1993. **Dynamics of cytokine production during coccidial infections in chickens: colony-stimulating factors and interferon.** Federation of European Microbiological Societies. Immunology & Medical Microbiology. 6(1): 45-52.

CONSTANTINOIU, C.C., MOLLOY, J.B., JORGENSEN, W.K., COLEMAN, G.T. 2007. Development and validation of an ELISA for detecting antibodies to *Eimeria tenella* in chickens. Veterinary Parasitology 150:306-313.

DALLOUL, R., BLISS, T., HONG, Y., BEN-CHOUKHA, I., PARK, D., KEELER, C., LILLEHOJ, H. S. 2007. Unique responses of the avian macrophage to different species of *Eimeria*. Molecular Immunology 44: 558-566.

DEL CACHO, E., SIERRA, M. Y SANCHEZ ACEDO, C., Coccidiosis Aviar (Eimeriosis) en *Parasitología Veterinaria*, Cordero del Campillo, M., Rojo Vázquez, F. 2002. Cap. 42. Mc Graw- Hill. Interamericana.

GILBERT, M., BHANUSHALI, J., AND MCDUGALD, L. 1988. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Coccidiosis in Chickens: Correlation of Antibody Levels with prior Exposure to coccidia in the Laboratory and in the Field. Avian diseases, 32: 688-694.

GIRARD, F., FORT, G. YVORÉ, P. AND QUÉRÉ. 1997. Kinetics of Specific Immunoglobulin A, M and G Production in the Duodenal and Caecal Mucosa of Chickens Infected with *Eimeria acervulina* or *Eimeria tenella*. International Journal for Parasitology. 27 (7): 803-809.

HONG, Y. H., LILLEHOJ, H. S., DALLOUL, R. A., MIN, W., MISKA, K.B., TUO, W., LEE, S. H., HAN, J.Y., LILLEHOJ, E. P. 2006. Veterinary Immunology and Immunopathology 110:339-347.

JANG, S. I., LILLEHOJ, H. S., LEE, S H, KIM, D.K., PAGÉS, M., HONG, Y. H., MIN, W., LILLEHOJ, E.P. 2011. Distinct immunoregulatory properties of macrophage migration inhibitory factors encoded by *Eimeria* parasites and their chicken host. Vaccine 29: 8998-9004.

JEURISSEN S., JANSE E. AND VERMEULEN A. 1989. Lymphoid and non lymphoid-cells in the caecal mucosa of naive and immune chickens related to the development of *Eimeria tenella*. In: Coccidia and Intestinal Coccidiomorphs, Vth International Coccidiosis Conference, Tours, p. 551-556. INRA.

JEURISSEN, S., JANSE, E., VERMEULEN, A., VERVELDE L. 1996. *Eimeria tenella* infections in chickens: aspects of host-parasite interaction. Veterinary Immunology and Immunopathology 54: 231-238.

JUÁREZ ESTRADA, M., HERNÁNDEZ VELASCO, X., TÉLLEZ ISAÍAS, G. 1999. Actividad del interferón proveniente de linfocitos esplénicos de pollo de engorda, durante la infección experimental primaria con *Eimeria tenella*. Vet. Méx. 30(4):297-305.

LAURENT, F., MANCASSOLA, R., LACROIX, S., MENEZES, R. AND NACIRI, M. 2001. Analysis of Chicken Mucosal Immune Response to *Eimeria tenella* and

*Eimeria maxima* Infection by Quantitative Reverse Transcription-PCR. Infect Immun. 69(4): 2527-2534.

LAWN, A., ROSE, M., BRADLEY, J. AND RENNIE, M. 1988. Lymphocytes of the intestinal mucosa of chickens. Cell Tissue Res 251:189-195.

LEE, K. W. , LILLEHOJ, H. S. , JANG, S I., PAGÈS, M., BAUTISTA, D. A, POPE, C. R., RITTER, G. D. , LILLEHOJ, E.P. , NEUMANN, A. P., SIRAGUSA, G. R..

2012. Effects of in ovo vaccination and anticoccidials on the distribution of *Eimeria* spp. in poultry litter and serum antibody titers against coccidia in broiler chickens raised on the used litters. Research in Veterinary Science 93: 177-182.

LEE, S.H., LILLEHOJ, H. S., PARK, D., JANG, S., MORALES,A., GARCÍA, D., LUCIO, E., LARIOS, R., VICTORIA, G., MARRUFO, D., LILLEHOJ, E.. 2009.

Protective effect of hyperimmune egg yolk IgY antibodies against *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima* infections. Veterinary Parasitology 163:123-126.

LILLEHOJ, H. S., AND TROUT, J. M.. 1996. Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. Clin. Microbiol.

Rev.9:349-360.

LILLEHOJ H. S., 1998. Role of T lymphocytes and cytokines in coccidiosis. Int J Parasitol. 8(7):1071-81.

LILLEHOJ, H. S., LILLEHOJ, E.P. 2000 *Avian Diseases*. A Review of Acquired Intestinal Immunity and Vaccination Strategies. 44 (2): 408-425.

LILLEHOJ, H. S., MIN, W. AND DALLOUL, R. 2004. Recent Progress on the Cytokine Regulation of Intestinal Immune Responses to *Eimeria*. Poultry Science 83:611-623.

LILLEHOJ, H. S., KIM, C., KEELER JR., C. AND ZHANG, S. 2007.

Immunogenomic Approaches to Study Host Immunity to Enteric Pathogens. Poultry Science 86:1491-1500.

RATCLIFFE M., 2006. Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development. Dev Comp Immunol. Review. 30 (1-2):101-18.

ROSE, M., LAWN, A., MILLARD, B. 1984. The effect of immunity on the early events in the life-cycle of *Eimeria tenella* in the caecal mucosa of the chicken. Parasitology 88:199-210.

SASAI, K., FETTERER, R., LILLEHOJ, H., MATSUURA, S., CONSTANTINOIU, C., MATSUBAYASHI, M., TANI, H. AND BABA, E. 2008. Characterization of Monoclonal Antibodies that Recognize the *Eimeria tenella* Microneme Protein MIC2. J. Parasitol., 94(6):1432-434.

SWAGGERTY, C., GENOVESE, K., HE, H., DUKE, S. PEVZNER, I AND KOGUT, M., 2011. Broiler breeders with an efficient innate immune response are more resistant to *Eimeria tenella*. Poult Sci 90(5): 1014-1019.

WALLACH, M., 2010. Role of antibody in immunity and control of chicken coccidiosis. Trends in Parasitology 26:382-387.

Wang, J., Adelson, D., Yilmaz, A., Szen, Y. and Zhu, J. 2005. Genomic organization, annotation, and ligand-receptor inferences of chicken chemokines and chemokine receptor genes based on comparative genomics. BMC Genomics 6:45.

---