



**HAL**  
open science

## Vaccins anticoccidiens. Bilan et perspectives

P. Yvore, P. Pery, Fabrice Laurent, M. Bessay

► **To cite this version:**

P. Yvore, P. Pery, Fabrice Laurent, M. Bessay. Vaccins anticoccidiens. Bilan et perspectives. Veterinary Research, 1993, 24 (3), pp.229-250. hal-02711036

**HAL Id: hal-02711036**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02711036>**

Submitted on 1 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## Article de synthèse

# Vaccins anticoccidiens. Bilan et perspectives

P Yvore <sup>1,\*</sup>, P Pery <sup>2</sup>, F Laurent <sup>2</sup>, M Bessay <sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRA, station de pathologie aviaire et de parasitologie, 37380 Nouzilly,;

<sup>2</sup> station de virologie et d'immunologie moléculaire, 78350 Jouy-en-Josas, France

(Reçu le 27 octobre 1992; accepté le 14 janvier 1993)

**Résumé** — La coccidiose est un problème majeur en élevage. Actuellement, la chimioprévention permet de contrôler ces parasitoses. Cependant, depuis quelques années, la recherche de vaccins, spécialement vis-à-vis des coccidioses du poulet, s'est développée du fait de l'apparition fréquente de souches chimiorésistantes. Différentes méthodes ont été envisagées : contamination contrôlée par des souches virulentes, atténuation de souches par des méthodes physiques ou biologiques, étude d'antigènes vaccinaux. On voit actuellement apparaître des vaccins vivants composés de souches atténuées par sélection génétique. Dans un plus long terme on peut espérer disposer de vaccins obtenus par génie génétique.

**parasitologie / coccidioses / vaccin**

**Summary** — **Anticoccidial vaccines: review and prospects.** *Coccidiosis are a major problem for the poultry industry. Currently, the diseases are controlled by drug chemoprevention, but the development of chemoresistant strains has for several years incited investigators to search for a vaccine. Several methods were investigated: oocyst administration at low and controlled doses, administration of strains which had been attenuated by physical or biochemical means, immunization with extracted or recombinant antigens. For some years to come genetically selected precocious live strains of Eimeria which are now commercially available will be useful as vaccines; but in the future, genetically engineered antigens will provide new opportunities for a successful vaccination.*

**parasitology / coccidiosis / vaccine**

---

\* Correspondance et tirés à part

## INTRODUCTION

En 1937, Albanese et Smetana considéraient que la recherche de substances chimiques anticoccidiennes était «futile». Seules des mesures préventives devaient être mises en jeu et, après avoir montré l'activité des rayons X sur les coccidies, ces auteurs préconisaient une irradiation des aliments, dans un but prophylactique.

On peut pourtant affirmer que, sans les anticoccidiens, l'aviculture industrielle n'aurait jamais pu atteindre le degré de développement actuel. Cependant, les coccidies restent un problème important, imparfaitement contrôlé, et la recherche de nouvelles méthodes de prévention, immunologiques notamment, trouve aisément sa justification. De même, chez les ruminants, les coccidies constituent un problème chez les jeunes à certains moments de leur élevage, et les solutions faisant appel à la chimiothérapie sont très imparfaites.

Tous les anticoccidiens actuellement connus induisent, plus ou moins rapidement, des résistances. La protection devient moins bonne, voire nulle, et les possibilités de changement sont assez limitées. Les nouvelles molécules sont rares et leur mise au point ainsi que leur homologation comme additifs ou comme médicaments sont longues et très onéreuses. Enfin, leur emploi ne doit pas trop augmenter les coûts d'exploitation.

La chimio-prévention n'est pas applicable dans les mêmes conditions pour toutes les productions :

- pour certaines espèces dites «secondaires», aucune homologation ne sera demandée et l'emploi d'anticoccidiens ne peut se faire que sous prescription; la sensibilité de certains animaux peut faire re-

douter des accidents graves; la toxicité de certains ionophores chez la pintade en est un exemple : des doses très bien tolérées par le poulet se sont révélées mortelles pour cet oiseau;

- dans d'autres cas, comme chez la poulette, la demande d'homologation intervient après celle du poulet de chair, souvent des années après, et on ne dispose que d'anticoccidiens relativement anciens, ayant parfois perdu une partie de leur efficacité;

- pour certaines productions, le recours à une chimioprévention est interdit : c'est le cas chez la poule en ponte, du fait de résidus possibles dans les œufs, pour d'autres, poulets «labels» par exemple, le mode d'élevage ne permet pas une chimioprévention complète durant toute la vie de l'animal.

Enfin, on se heurtera de plus en plus à des problèmes de résidus possibles dans les produits destinés à la consommation, et à d'autres, liés à l'environnement.

La recherche de vaccins a intéressé et intéresse de plus en plus d'équipes de recherche. Certes un vaccin antiparasitaire est difficile à mettre au point. Pour l'instant les seuls résultats concrets concernent des vaccins vivants. On peut cependant espérer disposer dans l'avenir d'antigènes vaccinnants. En outre l'animal, dans les conditions normales d'élevage, est pratiquement toujours contaminé par des coccidies. L'immunité n'est jamais totale, elle limite le développement parasitaire à des niveaux compatibles avec la santé de l'animal et sa production. La protection peut donc ne pas être totale. Elle se renforcera dans bien des cas lors des recontaminations naturelles.

Nous tenterons ici de faire une synthèse des recherches réalisées et des résultats obtenus dans ce domaine.

## VACCINS VIVANTS

### Emploi de souches virulentes

#### Souches homologues

##### Le «Coccivac»

Compte tenu du fait qu'une première infection induit une résistance, une méthode de vaccination a été développée par le laboratoire Sterwin, aux Etats-Unis. Elle consiste à administrer aux poulets, à l'âge de 4 à 10 j, dans l'eau de boisson ou dans un aliment humide, un mélange d'oocystes des 8 espèces de coccidies parasites de ces oiseaux (Reid, 1975). A cette contamination contrôlée et modérée s'ajoute parfois un traitement pour éviter un développement parasitaire trop important. Cette méthode ne s'applique qu'à des animaux élevés sur litière car, grâce à la contamination de celle-ci, les animaux peuvent entretenir ou renforcer leur immunité en se recontaminant.

Nous disposons de très peu d'informations sur l'emploi de ce «vaccin». Edgar et Fitz-Coy (1985) ont obtenu avec lui des résultats comparables à ceux de lots recevant une chimioprévention avec un anticoccidien ionophore, le monensin. Le Coccivac présente cependant plusieurs inconvénients : introduction de souches virulentes dans l'élevage, voire d'espèces parasitaires qui n'y figuraient pas; risque de développement d'une coccidiose en cas de rupture de protection à partir des souches vaccinales multipliées et présentes dans la litière. Pour ces raisons, ce «vaccin» n'a jamais, à notre connaissance, été développé en France.

##### Contamination à un âge de moindre sensibilité

Gregory et Catchpole (1989) ont inoculé des lots d'agneaux avec un petit nombre

d'oocystes d'*Eimeria ovinoidalis* ou d'*E. crandallis* (10 000 par animal) à des âges variables. Ils ont constaté avec la première de ces espèces que les agneaux inoculés à 1, 2 ou 4 j n'excrétaient pas d'oocystes. L'excrétion était faible chez ceux inoculés à 7 j. Elle était normale dans les lots contaminés à 14, 21 ou 28 j et s'accompagnait dans ce cas d'une diarrhée, sévère chez les agneaux inoculés le plus tard. La croissance était significativement augmentée chez les animaux inoculés entre 1 et 4 j. Tous les agneaux ont reçu une infection d'épreuve à 42 j d'âge, entraînant des symptômes graves et la mort de 50% des animaux dans un groupe témoin qui n'avait jamais été infecté. Les animaux précédemment infectés ont tous présenté une légère diarrhée, sans conséquences graves.

Avec *E. crandallis*, le développement parasitaire a été normal quel que soit l'âge où a été pratiquée l'infection, mais sans conséquences cliniques apparentes.

La différence de comportement entre les 2 espèces parasitaires est difficile à expliquer et les auteurs se limitent à des hypothèses concernant le rôle du colostrum, du lait maternel ou de l'état physiologique de l'intestin. Il apparaît cependant que plus l'infection est tardive, plus elle engendre de troubles, mais plus l'immunité est importante. La protection est fonction de la capacité de l'organisme à la multiplication parasitaire.

Ces observations ont conduit leurs auteurs à proposer une contamination précoce des agneaux avec *E. ovinoidalis*, considérée comme l'espèce pathogène chez les ovins. La résistance obtenue, si elle n'est pas totale, sera renforcée par les contaminations naturelles ultérieures.

Chez le poulet, Long *et al* (1986) ont montré que, chez des animaux élevés sur grillage, dans des conditions de faible recontamination, une protection suffisante peut être obtenue en administrant un petit

nombre d'oocystes de souches virulentes dans la première semaine de vie.

Au Canada, Lee (1987, 1989) a mis au point un vaccin, l'Immucox, qui s'administre par l'eau de boisson à 4 et 7 j d'âge. C'est un vaccin vivant composé de 4 espèces parasites du poulet, *E tenella*, *E acervulina*, *E necatrix* et *E maxima*. L'auteur précise seulement que la vaccination consiste en une administration d'un faible nombre d'oocystes.

#### *Infection continue avec un faible nombre d'oocystes (Trickle infection)*

Joyner et Norton (1973, 1976) ont étudié une technique originale d'immunisation de poulets. Ils ont comparé des lots d'animaux recevant de très faibles doses journalières d'oocystes d'*E tenella*, d'*E acervulina* ou d'*E maxima* pendant plusieurs jours consécutifs. Trois aspects sont à considérer dans leurs résultats.

#### *La contamination du milieu*

Avec *E tenella*, l'excrétion oocystale totale est faible (environ 750 000 oocystes/animal) dans le lot où les animaux recevaient 5 oocystes/j pendant 28 j. Elle est beaucoup plus importante (environ 7 500 000) avec une dose unique de 140 oocystes. Cependant, la période patente qui est de 9 à 10 j chez les poulets inoculés une seule fois est de plus de 20 j lors d'infections répétées. On retrouve des résultats assez semblables avec *E maxima*.

#### *L'immunité est fonction de l'espèce parasitaire*

On peut obtenir une bonne protection avec 1 oocyste/j pendant 20 j avec *E maxima*; avec *E acervulina*, qui est moins immunogène, il faut des doses de 5 ou même 20 oocystes/j.

#### *L'immunité obtenue n'est pas totale*

Les résultats varient selon l'importance de la dose d'épreuve.

L'immunité obtenue par cette méthode est cependant suffisamment bonne, compte tenu du niveau d'infection que l'on risque de rencontrer dans les élevages, et la contamination du milieu est réduite. Technologiquement, l'administration journalière d'un petit nombre d'oocystes est facile à réaliser, soit dans l'eau soit dans l'aliment. Dans ce dernier cas, il est possible d'incorporer des oocystes enrobés. Ceux-ci sont mis en suspension dans une solution à 12% d'acide alginique et cette suspension tombant dans une solution de chlorure de calcium à 5%, il se forme des «perles» (*beads*). Sous cette forme, les oocystes peuvent être conservés 8 sem dans de bonnes conditions (+ 4 °C et 33% d'humidité relative). D'autres solutions peuvent être employées pour l'enrobage : Davis et Porter (1983) ont proposé une solution de gomme xanthane ou des formules à base de polysaccharides.

Norton et Joyner (1986) ont montré qu'il était possible avec toutes les espèces parasites du poulet d'immuniser les animaux sans conséquence pour ceux-ci et sans contaminer de façon très importante le milieu d'élevage. Cette technique, appelée de sa dénomination anglaise «*Trickle*», pourrait être développée en élevage. Il reste que l'administration d'un tel vaccin entraîne une contamination du milieu d'élevage avec des souches virulentes. Même si cette contamination est faible, nous sommes amenés à faire ici les mêmes remarques que pour le «Coccivac» : contamination du milieu avec des souches virulentes et parfois avec des espèces, qui n'étaient pas présentes dans l'élevage. En outre, il est assez surprenant d'incorporer dans un aliment des éléments pathogènes virulents.

#### **Souches hétérologues**

L'immunité vis-à-vis des coccidioses est très spécifique, même entre espèces para-

sitant le même hôte. Cependant, plusieurs auteurs ont montré que la contamination par une espèce pouvait parfois induire une résistance partielle vis-à-vis d'une autre.

Si on inocule à des dindons  $10^6$  oocystes d'*E tenella* ou d'*E acervulina*, espèces parasites du poulet, ou à des poulets des oocystes d'*E adenoides* ou *E meleagrimitis*, parasites du dindon, on constate, 6 h après, la présence de sporozoïtes de chacune de ces espèces dans des cellules intestinales de l'hôte hétérologue avec des localisations qui sont à peu près les mêmes que chez l'hôte normal (Augustine et Danforth, 1986). Il y a donc au moins un début de développement parasitaire chez l'hôte hétérologue. Cela a amené Augustine et Danforth (1989, 1990) à administrer soit *E adenoides* à des poulets, soit *E tenella* à des dindons, et à étudier l'immunité acquise en pratiquant une infection d'épreuve avec l'espèce homologue. Chez le dindon, *E tenella* n'a apparemment pas induit de résistance. Cela peut être dû à la sévérité de l'infection d'épreuve. En revanche, 10 administrations de  $10^6$  oocystes d'*E adenoides* par poulet et par jour sur une période de 12 j induisent un certain degré de résistance vis-à-vis d'une infection d'épreuve par *E tenella* (58 000 oocystes/animal). La résistance est cependant très partielle pour une administration d'un nombre considérable d'oocystes de l'espèce hétérologue.

### **Emploi de souches atténuées**

#### **Souches irradiées**

L'idée de diminuer le pouvoir pathogène d'une souche par irradiation est ancienne. Elle a trouvé son application pratique en helminthologie avec la commercialisation d'un vaccin vis-à-vis de la dictyocaulose bovine basé sur l'emploi de larves de 3<sup>e</sup> stade irradiées.

Différents types d'irradiations ont été essayés sur les oocystes de coccidies : Fish (1932) a exposé des oocystes d'*E tenella* aux rayons ultraviolets; Albanese et Smetana (1937), Waxler (1941) ont essayé les rayons X; Baldelli *et al* (1966a,b,c,d), Abu Ali *et al* (1972) ont employé les rayons gamma.

De ces différentes études, on peut tout d'abord souligner la très grande résistance des oocystes de coccidies à l'irradiation : 0,8 krads tuent tous les vertébrés, en revanche les oocystes sont encore capables d'excyster après une exposition à 75 krads durant 1 h et des oocystes recevant 15 krads à 35 °C produisent une infection chez des rats.

Singh et Gill (1975) ont étudié l'effet des rayons gamma sur les oocystes d'*E necatrix* en employant une source de  $^{60}\text{Co}$ . Sur des oocystes non sporulés, ils constatent qu'à partir de 200 krad les oocystes ne sporulent plus. Par contre une dose de 10 krad n'a apparemment pas d'effet appréciable. Au-dessus de cette dose, on observe progressivement des altérations morphologiques, le zygote se segmente en parties inégales et granuleuses. Sur les oocystes sporulés, une exposition à 40 krad ou plus rend les oocystes pratiquement non infectants et les animaux qui reçoivent ces oocystes sont très sensibles à une infection d'épreuve. Entre 2,5 à 20 krad, les poulets qui reçoivent des oocystes irradiés développent une maladie de moins en moins grave, et présentent une résistance à la réinfection. Par ailleurs, une infection par 50 000 oocystes irradiés à 25 krad est sensiblement comparable à une infection par 1 000 oocystes non irradiés, de même que 50 000 oocystes irradiés à 2,5 krad provoquent les mêmes symptômes que 20 000 non irradiés.

Pour beaucoup d'auteurs, l'irradiation n'atténue pas le pouvoir pathogène et ne

modifie pas le pouvoir immunogène, mais diminue le nombre de parasites viables. Cela peut être rapproché des observations de Bajwa et Gill (1977) qui ont montré que les oocystes provenant d'occystes irradiés, après multiplication chez l'animal, étaient aussi pathogènes, aussi immunogènes et avaient le même pouvoir de multiplication que les oocystes non irradiés.

En dehors de l'action visible sur la sporulation, l'excystation ou le pouvoir infectant, l'irradiation modifie d'autres caractéristiques du parasite. Les sporozoïtes traités sont, par exemple, plus sensibles au milieu d'excystation (trypsine-taurocholate de sodium).

Les avis sur l'action des radiations restent donc très partagés. Pour certains, il semble bien que le parasite puisse conserver aux doses tolérables son pouvoir infectant, mais soit incapable de réaliser tout son cycle biologique (Klimes *et al*, 1972). Pour d'autres, l'irradiation ne fait que diminuer la dose infectante et un développement schizogonique suffisant pour conférer une protection (Singh et Gill, 1975; Cox *et al*, 1977).

Très récemment, Jenkins *et al* (1991) ont réalisé une expérimentation avec des oocystes d'*E acervulina* traités par des rayons X. Ils obtiennent une protection significative des animaux en les infectant avec des oocystes traités à 10, 15 ou 20 krad. Les lésions intestinales constituaient le critère d'évaluation de la résistance. Contrairement aux auteurs précédents, ils observent une action de l'irradiation dès 10 krad. Le développement parasitaire est très réduit, il est pratiquement nul à partir de 30 krad; 15 krad constituent la dose optimale. Cependant, la protection obtenue est très partielle. En outre, si les sporozoïtes traités sont capables d'infecter les cellules intestinales, l'irradiation semble empêcher le développement ultérieur. A 30 krad, les sporozoïtes sont encore ca-

pables d'envahir les cellules, mais incapables d'induire la moindre résistance. Les auteurs sont amenés à penser que les antigènes des sporozoïtes pourraient avoir leur structure modifiée par l'irradiation à des doses supérieures à 15 krad. Cette dose pourrait aussi empêcher la formation de produits du métabolisme. On sait que le traitement de cellules eucaryotes par les rayons gamma à faibles doses inhibe la répllication de l'ADN et arrête la division cellulaire, et qu'à fortes doses, les fonctions métaboliques sont détruites; 15 et 30 krad pourraient représenter ces 2 stades biologiques.

Quand à l'application pratique de ces méthodes pour l'obtention de vaccins, les opinions des auteurs sont très partagées. Beaucoup restent sceptiques. Il semble bien que l'immunité soit fonction des possibilités de développement parasitaire et donc du taux de survie du parasite. Tous les traitements diminuent significativement le développement parasitaire durant la première infection, l'immunité étant inversement proportionnelle au développement parasitaire durant cette infection. Néanmoins, le développement parasitaire pourrait parfois être incomplet : Hein (1963) obtient une immunité avec des sporozoïtes irradiés d'*E tenella*, alors que le parasite n'est pas capable de réaliser complètement la 2<sup>e</sup> schizogonie. Dans la majorité des cas, il semble pourtant qu'il y ait développement complet et les souches issues des parasites irradiés ont toutes la virulence d'une souche normale. Nous retrouvons donc les problèmes évoqués précédemment.

#### **Action de la température sur le pouvoir pathogène**

En dehors de l'étude de l'influence de la température sur l'irradiation (Conder et Duszinski, 1977) déjà citée, très peu d'au-

teurs ont étudié les possibilités d'un traitement thermique des oocystes. Uricchio (1953) a montré qu'un traitement des oocystes sporulés à 45 °C ou à -5 °C diminue le pouvoir pathogène d'*E. tenella* tout en permettant l'acquisition d'une immunité.

#### Atténuation du pouvoir pathogène par des agents chimiques

Fu et Lee (1976) ont inoculé 330 poulets âgés de 27 j avec environ 1 000 oocystes d'*E. tenella* traités par différents agents chimiques : le cristal violet à 0,05%, l'acriflavine à 1%, le formol à 3%, l'acide carboxylique à 0,5% ou le bleu de méthylène à 0,01%; 10, 20 ou 60 j après l'inoculation, les animaux ont été réinfectés avec une souche virulente de la même espèce. Tous les animaux étaient immunisés et les 3 premières substances semblent les plus actives. On peut se demander si l'immunité ne résulte pas en fait d'un défaut d'activité de la substance chimique et d'une immunisation par des coccidies survivantes et virulentes.

#### Souches modifiées

Deux voies ont été employées pour obtenir des souches modifiées non ou peu pathogènes et immunogènes : l'adaptation à un autre milieu, l'œuf embryonné, ou la sélection de souches à période prépatente plus courte, dites souches «précoces».

##### *Souches adaptées à l'œuf embryonné*

Long (1965, 1966) a montré la possibilité de cultiver sur œuf embryonné certaines espèces d'*Eimeria*. Après 42 passages d'une souche d'*E. tenella*, il constate une diminution significative du pouvoir pathogène pour le poulet, mais cette atténuation disparaît dès le second passage chez l'animal (Long, 1972). Après 62 passages sur œuf embryonné, le parasite ne retrouve

son pouvoir pathogène normal qu'après 9 passages (Long, 1974b). Bedrnik (1984) ne constate, avec une souche de la même espèce, aucune réduction du pouvoir pathogène après 106 passages sur embryons. Cependant, beaucoup d'espèces ne se cultivent pas sur la membrane chorioallantoïde et cette technique d'atténuation ne semble pas devoir se développer.

La souche employée semble conditionner les modifications éventuelles observées. Pour *Eimeria tenella*, (Gore et al, 1983) les passages successifs sur œufs embryonnés n'impliquent pas nécessairement une diminution du pouvoir pathogène. Les mêmes auteurs constatent avec une souche d'*E. necatrix* que la perte de pouvoir pathogène peut s'accompagner d'une diminution du pouvoir immunogène. Il semblerait que la diminution du pouvoir pathogène soit en relation avec une plus petite taille des schizontes et une diminution du nombre des mérozoïtes produits : cela expliquerait aussi la diminution du pouvoir immunogène.

Shirley (1980) avait également observé, avec *E. necatrix*, une diminution lente et progressive du pouvoir immunogène au fur et à mesure des passages. En 1982, Shirley et al ont réalisé à la fois des passages successifs sur œufs embryonnés et une sélection sur la précocité du 21<sup>e</sup> au 40<sup>e</sup> passage. Dès le 23<sup>e</sup>, la récolte d'oocystes pouvait se faire 5 j après l'inoculation des œufs. Au 36<sup>e</sup> passage, ils ont constaté une diminution de la taille de l'embryon. Le pouvoir pathogène pour le poulet de la souche obtenue était diminué et, avec la souche passée 29 fois sur œuf, la diminution persistait après 6 passages sur poulet. On constate également que la diminution du pouvoir pathogène s'accompagne d'une importante diminution du développement parasitaire. La taille des schizontes de seconde génération est réduite. Le pouvoir immunogène, bien que diminué, reste convenable après 22 ou 29 passages. Ce-



pendant, dans ce dernier cas il est nécessaire d'augmenter de 5 fois la dose vaccinale, pour obtenir le même effet protecteur. Après 36 passages, l'immunogénicité a considérablement diminué.

#### *Souches «précoces»*

##### *Existence des souches dites «précoces»*

Lors des premières études, Jeffers (1974, 1975) obtient après 9 passages sur poulet d'une souche d'*E. tenella* (Wis-C), en récoltant les premiers oocystes émis, une nouvelle souche (Wis-F) à période prépatente réduite de 12 h environ. Il constate une diminution du pouvoir pathogène du taux de multiplication, de la taille des oocystes, une stabilité du caractère de «précocité» et un maintien du pouvoir immunogène. Quant au cycle, il est le même pour la

souche d'origine et pour la souche précoce jusqu'à la 72<sup>e</sup> h (tableau I), en revanche il est ensuite beaucoup plus rapide chez la souche précoce lors de la seconde schizogonie. Enfin, si l'on multiplie la souche «précoce» sans pression de sélection durant 25 générations, le taux de multiplication augmente de même que la taille des oocystes, sans que le caractère de précocité ne disparaisse.

Il est apparemment possible d'obtenir des souches précoces avec toutes les espèces étudiées : *E. tenella* (Jeffers, 1974, 1975; Johnson *et al*, 1978; McDougald et Jeffers, 1976a; McDonald *et al*, 1986b), *E. brunetti* (Johnson et Long, 1985; Johnson *et al*, 1986; Shirley *et al*, 1986), *E. maxima* (McDonald *et al*, 1986a; Shirley et Bellatti, 1988), *E. mitis* (McDonald et Shirley, 1984;

**Tableau I.** Comparaison du cycle de 2 souches d'*Eimeria tenella* : souche «normale» Wis-C et souche «précoce» Wis-F (d'après Jeffers, 1975).

Heures	Wis-C	Wis-F
48	1 <sup>re</sup> génération trophozoïtes 1 <sup>re</sup> génération schizontes immatures	
60	1 <sup>re</sup> génération schizontes murs 2 <sup>e</sup> génération trophozoïtes	
72	2 <sup>e</sup> génération schizontes immatures	
84	2 <sup>e</sup> génération schizontes immatures	2 <sup>e</sup> génération schizontes matures
96	2 <sup>e</sup> génération schizontes immatures et matures	2 <sup>e</sup> génération schizontes matures et qq gamètes
108	2 <sup>e</sup> génération schizontes matures	Gamètes et qq oocystes
120	2 <sup>e</sup> génération schizontes matures et qq oocystes	Gamètes et oocystes
144	Gamètes et oocystes	Gamètes et oocystes

McDonald *et al*, 1985; McDonald et Ballingall, 1983b), *E acervulina* (McDonald et Ballingall, 1983a; McDonald *et al*, 1982) et certains travaux portent sur plusieurs espèces (Long et Johnson, 1988; Shirley et Millard, 1986). Nous donnons dans le tableau II un exemple de réduction de la période prépatente. Cette possibilité de sélection a été également démontrée chez des espèces parasitant le lapin (Licois *et al*, 1990).

#### Mode d'obtention des souches précoces

La méthode d'obtention est simple, puisqu'elle consiste à récolter de plus en plus tôt les oocystes produits après inoculation de l'animal hôte normal.

Chez les volailles, cette sélection est très progressive et demande en général un assez grand nombre de passages chez l'hôte (> 10). Au contraire, chez le lapin, la sélection est rapide. Avec *E intestinalis*, Licois *et al* (1990) constatent que la précocité apparaît très rapidement : 6 générations de sélection suffisent, contre plus de 10 pour les espèces aviaires. En outre, certains sporozoïtes de la souche précoce sont dépourvus de corps réfringents, ce qui n'a pas été observé avec les espèces aviaires.

**Tableau II.** Périodes prépatentes (en heures) de souches parentales et « précoces » de 7 espèces d'*Eimeria* parasites du poulet (d'après Long et Johnson, 1988).

Espèce	Souche parentale	Souche précoce
<i>E acervulina</i>	97	72
<i>E brunetti</i>	120	75
<i>E maxima</i>	121	106
<i>E mitis</i>	93	76
<i>E necatrix</i>	138	120
<i>E praecox</i>	83	66
<i>E tenella</i>	121	112

#### Modification du cycle biologique

La précocité s'accompagne de modifications du cycle biologique du parasite chez l'hôte. La localisation ne semble pas affectée, mais le nombre et l'importance des schizogonies sont modifiés. Les modalités sont cependant un peu différentes selon les espèces.

Lors des premières études, Jeffers (1975) avait constaté que, pour *E tenella*, le cycle s'accélérait après la 72<sup>e</sup> heure lors de la second schizogonie. Pour McDougald et Jeffers (1976) il ne fait aucun doute qu'une partie du cycle est supprimé pour la plus grande partie de la population; les schizontes de seconde génération ne sont qu'occasionnellement présents dans les cultures *in vitro* de la souche précoce. Pour d'autres souches (Kawaguchi *et al*, 1988) la 2<sup>e</sup> schizogonie existe, mais les schizontes sont plus petits et contiennent moins de mérozoïtes.

Avec *E necatrix*, Shirley et Bellatti (1984) ne constatent pas d'altérations dans le cycle parasitaire et le taux de multiplication est normal.

Avec *E mitis*, la gamogonie, initiée à partir des mérozoïtes de 4<sup>e</sup> génération pour une souche normale, est généralement produite par ceux de 3<sup>e</sup> génération chez la souche précoce. Les modifications interviennent dès la première schizogonie où la maturation est plus précoce et les schizontes plus petits contiennent moins de mérozoïtes (McDonald et Shirley, 1984).

Avec *E maxima*, McDonald *et al* (1986a) ne retrouvent pas une accélération de la maturation des premiers schizontes, mais il semble que, pour la souche précoce, le cycle comporte une génération de schizontes de moins que chez la souche parentale.

Le phénomène est le même pour *E acervulina* (McDonald *et al*, 1982) où, jusqu'à la 66<sup>e</sup> h, le cycle est apparemment

identique pour les souches précoces ou parentales. A ce moment, apparaissent les gamétocytes chez la souche précoce. Ces gamétocytes initiés vers la 80<sup>e</sup> h par les mérozoïtes de 4<sup>e</sup> génération chez la souche normale, sont initiés par les mérozoïtes de 3<sup>e</sup> génération chez la souche précoce.

Les caractères communs aux différentes souches précoces sont, à quelques exceptions près :

- obtention des stades sexués après un nombre réduit de schizogonies; l'une des générations de schizontes est supprimée ou réduite en importance et en durée;
- schizontes plus petits et contenant moins de mérozoïtes.

Ces modifications du cycle biologique expliquent la réduction importante du nombre d'ocystes produits par les souches précoces.

Au stade oocyste, on ne constate pas de modifications notables de la morphologie pour les espèces parasitant les volailles. Tout au plus certains auteurs constatent une réduction de la taille des oocystes. Chez les espèces parasitant le lapin au contraire, si les oocystes non sporulés sont identiques, des différences apparaissent après la sporulation, en particulier pour le globule réfringent du sporozoïte, qui peut être soit d'une taille supérieure à la normale, soit absent chez *E intestinalis* (Licois *et al*, 1990). Il semble que, dans ce cas, le facteur de précocité affecte la sporogonie.

#### *Taux de multiplication*

Le taux de multiplication des souches précoces est en général très inférieur à celui de la souche mère. Si on diminue la pression de sélection, le taux de multiplication augmente sans que le caractère de précocité ne soit affecté.

#### *Pouvoir pathogène*

Dans tous les cas, le pouvoir pathogène est réduit. On ne relève aucune mortalité, même avec des doses d'ocystes importantes. Les lésions sont nulles ou faibles. Le gain de poids n'est affecté que pour des niveaux d'infection relativement élevés. Cependant, nous avons constaté que ces souches précoces, administrées à des poulets à faibles doses, induisent une décoloration plasmatique très significative et temporaire 6 j après l'infection des animaux (résultat non publié). Cette modification est passagère, elle signe la multiplication parasitaire. Cette coloration est mesurée par colorimétrie directe à 480 nm, longueur d'onde correspondant aux pigments caroténoïdes. Comme nous l'avons montré ainsi que d'autres auteurs, une infection très faible obtenue avec quelques centaines d'ocystes d'espèces à localisations intestinales suffit pour provoquer une décoloration plasmatique. La sensibilité de ce critère explique la modification observée, par ailleurs sans conséquences pour la santé ou les performances des animaux.

#### *Induction d'une immunité*

Il existe des différences immunologiques entre les différents stades parasitaires. Les stades de multiplication asexuée sont très immunogènes (Rose et Hesketh, 1976), contrairement au sporozoïte ou aux stades sexués qui le sont moins (Long et Millard, 1968; Jeffers et Long, 1985; Rose et Hesketh, 1976). Le caractère de précocité étant en rapport avec une diminution des stades asexués, on pouvait craindre une perte de pouvoir immunogène. En réalité, les nombreuses études réalisées démontrent qu'il n'y a généralement pas de différence significative entre le pouvoir immunogène des souches normales et des souches précoces en se basant sur les scores lésionnels et la croissance. Cela

s'explique par le fait que la première génération de schizontes, non modifiée chez les souches précoces, est plus immunogène que les suivantes (McDonald *et al*, 1986b).

Si on poursuit la sélection sur la précocité, on peut cependant constater une certaine baisse de l'induction de la résistance. Le choix des souches pour un vaccin représente donc un compromis entre la perte de virulence et le maintien de l'immunogénicité.

Bien que ce problème soit encore peu étudié, il est démontré qu'il existe des variations antigéniques entre souches d'une même espèce. Un exemple (tableau III) en a été donné par Shirley (1989) chez *E. maxima*.

#### Stabilité

Le caractère de précocité se conserve après plusieurs passages en l'absence de pression de sélection pour la précocité.

#### Obtention de vaccins

Nous pouvons donc disposer de souches stables, non pathogènes, immunogènes de toutes les espèces parasitant le poulet. Il est ainsi possible d'envisager la préparation de vaccins vivants.

Shirley et Millard (1986), Evans *et al* (1989), Bushell *et al* (1989), Shirley (1989) ont essayé une association de souches précoces de 7 espèces parasitant le poulet. L'administration se fait dans l'eau de boisson, à un âge compris entre 4 et 9 j. Ils ont constaté, en l'absence de conséquences sur la santé et sur les performances des animaux, une bonne protection vis-à-vis d'infections d'épreuves relativement sévères. Un tel vaccin est actuellement homologué sous le nom de Paracox dans quelques pays européens, et une procédure d'homologation est engagée en France et dans d'autres pays. D'autres vaccins sont également à l'étude, associant parfois des souches précoces et des souches adaptées à l'œuf embryonné (Bedrnik et Jurkovic, 1987).

Deux problèmes restent cependant mal résolus.

*Les souches, d'une part, ne possèdent pas de marqueurs.*

Elles ne se différencient des souches virulentes que par leur caractère de précocité. Quelques recherches ont été faites sur ce sujet, mais n'ont pas apporté pour l'instant de solution pratique (Sutton *et al*, 1986). En cas de rupture de protection, acciden-

**Tableau III.** Immunité croisée entre souches précoces (CP et MFP) et souches de terrain ou de laboratoire d'*Eimeria maxima* (immunisation par 50 oocystes de souche précoce; infection d'épreuve par 500 oocystes des souches de terrain ou de laboratoire) (d'après Shirley, 1989).

Souche terrain ou laboratoire	Souche CP		Souche MFP	
	Excrétion oocystale (millions)	Protection (%)	Excrétion oocystale (millions)	Protection (%)
Chichester	6	90	23	13
Houghton	40	22	9	14
Lond Road	40	32	9	56
Thrapston	50	21	15	63
Watton	40	25	<0,01	99
Weybridge			<0,01	99

telle ou due à d'autres infections, il sera difficile de démontrer que la souche à l'origine de la maladie n'est pas la souche vaccinale.

*D'autre part, on sait qu'il existe des variations antigéniques entre souches de même espèce.*

Joyner, en 1969, puis plus récemment Shirley (1989), ont constaté des différences entre souches d'*E acervulina*. La diversité la plus marquée a été constatée chez *E maxima* (Long, 1974a). Shirley et Bellatti (1988) ont ainsi sélectionné une seconde souche d'*E maxima* qui figure avec celle qu'ils avaient obtenue précédemment dans le vaccin proposé.

*Enfin, il est impératif que les aliments soient exempts de toute trace d'anticoccidien.*

Leur présence, même en quantité limitée, empêcherait la multiplication du parasite et, par voie de conséquence, l'acquisition de la résistance.

## ANTIGÈNES VACCINANTS

Les recherches dans ce domaine sont de plus en plus nombreuses. Malgré l'enjeu économique générateur de confidentialité, une partie des résultats nous est connue grâce à des publications.

Murray *et al* (1986) ont montré que contrairement à ce qui avait été affirmé précédemment (Rose, 1982), il était possible d'induire une résistance avec des extraits de parasites tués. En administrant plusieurs fois à des poulets, à une semaine d'intervalle, par voie orale ou par injection intramusculaire, des extraits protéiques de sporozoïtes d'*E tenella*, ces auteurs obtiennent une protection partielle vis-à-vis d'une réinfection par la même espèce (tableau IV). Cependant, cette résistance est étroitement spécifique. Avec *E acervulina* cette spécificité de la résistance est moins étroite : on constate, après l'ad-

ministration d'extraits protéiques de cette espèce, l'induction d'un certain degré d'immunité vis-à-vis d'*E tenella* et d'*E maxima*. L'immunité obtenue persiste au moins 5 semaines après la dernière immunisation. La résistance est fonction de l'importance de l'infection d'épreuve.

Ces résultats encourageants ont engagé de nombreux auteurs à rechercher des antigènes vaccinaux.

Grâce à l'apparition de la technologie des anticorps monoclonaux, des résultats importants ont été obtenus. Les anticorps monoclonaux correspondant aux antigènes étudiés empêchent, en général, la pénétration ou le développement du parasite dans des cellules *in vitro*. Ils sont également employés pour la détermination et la caractérisation de la localisation de l'antigène soit par immunofluorescence soit par immunomarquage en microscopie électronique.

Outre les tests de protection réalisés sur animaux, un certain nombre de tests *in vitro* ont été utilisés pour l'étude des caractères antigéniques des protéines obtenues. L'un des plus fiables est la prolifération lymphoblastique. Il semble bien que

**Tableau IV.** Moyenne des lésions caecales (3 expérimentations) après immunisation par administration en intramusculaire d'un extrait protéique de sporozoïtes d'*Eimeria tenella* à 2, 9 et 16 j d'âge et infection d'épreuve (10 000 oocystes/animal) à 23 j (d'après Murray *et al*, 1986).

$\mu\text{g}$ de protéines	Moyenne des lésions
10	1,08 $\pm$ 0,09*
1	1,93 $\pm$ 0,41*
0,1	2,40 $\pm$ 0,13*
Témoins	3,33 $\pm$ 0,09

\* Différence significative avec le lot témoin.

les cellules T jouent un rôle majeur dans la résistance de l'hôte et la spécificité du parasite (Rose, 1987). Kogut et Eirmann (1991) ont montré que la cyclosporine A permettait le développement d'*Eimeria* chez des hôtes non spécifiques. On peut penser que les lymphocytes T empêchent le développement chez un hôte non spécifique. En outre, un antigène de surface de sporozoïte d'*E. acervulina*, obtenu par Jenkins *et al* (1988) active les lymphocytes T provenant de poulets immunisés mais n'est pas reconnu par le sérum immun.

Dans les conditions d'infections naturelles, il est admis que les schizontes sont plus immunogènes que les sporozoïtes. Cependant, des expériences ont pu montrer que ces derniers, ou des protéines qui en sont issues, pouvaient induire une résistance. Si beaucoup d'études ont fait appel à ce stade parasitaire, c'est sans doute du fait de la facilité d'obtention et de purification des sporozoïtes. En outre, il est intéressant de rechercher une immunité vis-à-vis des premiers stades de développement chez l'hôte. Pour les autres stades, des techniques sont maintenant au point pour la purification et la séparation des stades schizontes et mérozoïtes par flottaison en percoll (Geysen *et al*, 1991), et pour les stades sexués (Pugatsch *et al*, 1989). Une immunité vis-à-vis des stades sexués pourrait permettre une approche épidémiologique en empêchant ou en réduisant, chez les animaux immunisés, l'excrétion d'oocystes et donc la contamination du milieu d'élevage.

#### **Antigènes actuellement individualisés**

Différents types d'antigènes ont été étudiés : des antigènes de surface des sporozoïtes ou des mérozoïtes, des antigènes internes essentiellement localisés dans le corps réfringent, les rhoptries ou les micronèmes. Quelques travaux portent sur les gamètes.

*In vitro*, des anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes de surface de sporozoïtes d'*E. tenella* inhibent la pénétration et le développement de ces sporozoïtes dans des cellules de rein de poulet en culture (Danforth, 1983; Augustine et Danforth, 1985).

Augustine et Danforth (1987) ont obtenu avec 4 espèces de coccidies, 2 de poulet et 2 de dindon, après immunisation de souris, 7 anticorps monoclonaux réagissant avec des antigènes de surface de sporozoïtes. Un seul n'est pas spécifique de l'espèce qui a permis de l'obtenir. Il reconnaît un épitope particulier commun à plusieurs espèces. Les anticorps d'*E. tenella* inhibent la pénétration des sporozoïtes *in vitro*. En 1989, les mêmes auteurs ont obtenu un anticorps monoclonal qui réagit avec une protéine p28 du corps réfringent du sporozoïte. Un autre anticorps monoclonal obtenu par Crane *et al* (1988) correspond à un antigène de surface de sporozoïte d'*E. tenella*. Il provoque *in vitro* une agglutination des parasites et leur lyse lorsqu'il est employé en présence de complément; en injection il protège partiellement les poulets.

#### **Pouvoir immunogène**

Rhalem *et al* (1989) ont extrait un certain nombre de protéines de surface des sporozoïtes d'*E. falciformis*, parasite de la souris; 5 des 7 protéines solubilisées sont reconnues par des sérums de souris infectées. Ces protéines membranaires induisent *in vitro* une prolifération lymphocytaire de cellules immunes. Incorporées dans des liposomes et administrées 3 fois par voie orale à 2 j d'intervalle (20 µg d'antigène à chaque fois), elles induisent une immunité très importante vis-à-vis d'une infection d'épreuve pratiquée 15 j après la dernière immunisation (excrétion de 2 100 ooc/g chez les animaux immunisés, contre

36 000 chez les témoins au jour 7 après l'infection). Cette immunisation a provoqué une synthèse d'anticorps dirigés contre au moins 2 protéines de 180 et 27 kDa.

Pour les coccidies du poulet, un certain nombre d'antigènes recombinants ont pu être isolés et caractérisés. En général, les techniques utilisées sont assez classiques: constitution d'une banque d'ADN complémentaire, emploi de différents vecteurs ( $\lambda$ gt11, amp<sup>3</sup>), expression dans *Escherichia coli* et criblage de la banque à l'aide d'anticorps.

Actuellement, un certain nombre de clones d'ADNc codant pour des antigènes de sporozoïtes ou de mérozoïtes ont été isolés (environ 13 publiés à ce jour). Certains stimulent les cellules T *in vitro* et sont capables de conférer une protection partielle *in vivo* (Jenkins *et al*, 1988; Kim *et al*, 1989).

Danforth *et al* (1989) ont obtenu une protéine de fusion contenant un antigène d'oocystes d'*E tenella* de 31 kDa (5401) qui administré, associé à de l'adjuvant de Freund, à des poulets âgés de 4 sem, induit une résistance partielle à la réinfection. Cela montre la possibilité d'obtenir une résistance, mais dans la pratique un tel antigène ne pourrait être employé, compte tenu de l'âge des animaux au moment de l'administration et de l'emploi de l'adjuvant de Freund.

Brothers *et al* (1988) ont caractérisé et obtenu la synthèse par *E coli* d'un antigène de surface de sporozoïte d'*E tenella*. Cette protéine de 25 kDa contient 2 polypeptides de 17 et 8 kDa liés par un pont disulfure. Plus récemment, Karkhanis *et al* (1991) ont obtenu des fractions protéiques voisines mais différentes par sonication d'oocystes sporulés ou de sporozoïtes de la même espèce. La fraction V, correspondant à des polypeptides de 26 kDa (oocystes) et 22 kDa (sporozoïtes) réduit, *in vivo*, l'importance des lésions lors d'infec-

tion d'épreuve. Cette fraction V est constituée de 87 à 90% de protéines, 7 à 10% d'hydrates de carbone et 2 à 3% de lipides. Le polypeptide de sporozoïte de 22 kDa peut n'être que le résultat d'une dégradation par protéolyse du p26. Contrairement à l'antigène de Brothers *et al* (1988), la fraction V serait donc constituée d'une seule chaîne protéique.

Miller *et al* (1989a et b), Boghal *et al* (1989) ont étudié un clone d'ADNc dérivé d'oocystes sporulés d'*E tenella* et exprimé dans *E coli*. Cet antigène potentiel (GX3262) présente des caractéristiques intéressantes :

- il est reconnu par un anticorps monoclonal dirigé contre les sporozoïtes d'*E acervulina*;
- il stimule, *in vitro*, la prolifération des lymphocytes T d'animaux immunisés;
- administré 3 fois à la dose de 100  $\mu$ g à des animaux à l'âge de 1, 7 et 21 j, il induit une résistance; celle-ci est également obtenue en administrant une seule fois à l'âge de 2 j des *E coli* tués par la chaleur pour une dose d'antigène correspondant à 100  $\mu$ g, suivie d'une administration à 10 j de 25 oocystes d'*E tenella*;
- une seule administration de l'équivalent de 25  $\mu$ g de protéine GX3262 en *E coli* inactivés réduit de 71% les lésions produites par une inoculation d'oocystes d'*E acervulina* et une réadministration de 100  $\mu$ g d'antigène 8 j après la première vaccination protège 91% des animaux lors de l'infection d'épreuve;
- enfin, une protection vis-à-vis des 2 espèces est obtenue avec une administration d'*E coli* vivants pour un équivalent de 10  $\mu$ g d'antigène.

Cet antigène semble un candidat potentiel intéressant pour un vaccin.

Crane *et al* (1991) ont isolé un antigène recombinant d'un poids moléculaire d'environ 36 kDa (CheY-SO7'). Ce type d'anti-

gène est présent dans les 7 espèces parasitant le poulet. Au contraire du précédent (GX3262) une seule administration de 10 ng, sans emploi d'adjuvant, à l'âge de 2 j, protège les animaux vis-à-vis des 4 espèces majeures de coccidies : *E tenella*, *E acervulina*, *E necatrix* et *E maxima*. Cet antigène est localisé sur le corps réfringent. Ces résultats ajoutés à ceux de Danforth et Augustine (1989) montrent l'importance de ce corps réfringent dans la schizogonie.

Certains antigènes isolés sont communs à plusieurs stades parasitaires. Ko *et al* (1990) ont caractérisé un antigène de poids moléculaire compris entre 10 et 12 kDa présent chez les sporozoïtes, les oocystes et les schizontes. L'anticorps monoclonal correspondant inhibe le développement du parasite *in vitro*.

Récemment, Tomley *et al* (1991) ont détecté chez des sporozoïtes et des mérozoïtes d'*E tenella* une famille d'antigènes localisés au niveau des micronèmes pour le sporozoïte et l'expression a pu être obtenue dans un virus recombinant de variole aviaire, produisant un antigène d'environ 110-112 kDa.

Jenkins *et al* (1990) ont étudié des protéines de surface et de rhoptries sur les mérozoïtes d'*E acervulina*. Ces protéines activent les lymphocytes T de poulets immuns. Par immunofluorescence, ces auteurs ont montré leur localisation sur les rhoptries et à la surface des sporozoïtes, particulièrement dans la partie antérieure.

Les gamétocytes sont immunogènes (Wallach *et al*, 1989; Pugatsch *et al*, 1989). Deux antigènes ont été isolés de ce stade chez *E maxima* et étudiés. Leurs poids moléculaires respectifs sont de 56 et 83 kDa (Wallach *et al*, 1989; Mencher *et al*, 1989). Plus récemment, Fried *et al* (1992) ont cloné un gène d'expression codant pour une protéine spécifique du macrogamète d'*E maxima*, d'un poids moléculaire de 230 kDa.

Nous voyons donc la variété des antigènes actuellement isolés de différentes espèces et de différents stades parasitaires. Les résistances obtenues sont parfois interspécifiques, elles sont cependant toujours partielles, fonction des critères utilisés et sans doute de la dose d'épreuve. Il est incontestable que les nombreuses recherches entreprises semblent devoir aboutir dans un délai plus ou moins long. Ici encore pourrait se poser le problème de variations antigéniques à l'intérieur d'une même espèce, déjà évoqué précédemment et bien démontré pour *E maxima*.

#### MÉTHODES DE VACCINATION

Il ne suffit pas de mettre au point une souche ou un antigène vaccinant, encore faut-il définir des conditions de présentation et des voies d'administration compatibles avec l'élevage. Dans les conditions naturelles il peut être possible d'inoculer un vaccin par voie parentérale le jour de la naissance. Ensuite, la seule voie d'administration envisageable est la voie orale, par l'eau de boisson ou l'aliment.

La voie d'administration la plus souvent préconisée est l'eau de boisson. Cette voie est celle retenue pour les souches précoces. Les oocystes de coccidies sont contenus dans un substrat qui assure leur bonne dispersion et, dans la plupart des cas, on assure la prise vaccinale en supprimant quelques heures auparavant l'alimentation en eau des oiseaux. Grâce au critère très sensible de la coloration plasmatique (résultat non publié), nous avons pu contrôler sur des animaux élevés au sol, la bonne prise du vaccin 6 j après son administration en constatant une décoloration significative du sérum. On pouvait en outre remarquer la faible variation des résultats entre les animaux du lot examiné. Ce type de vaccination s'applique dans la



première semaine de la vie des animaux, ceux-ci devant rapidement être immunisés du fait de l'absence de chimioprévention.

L'aliment est parfois préconisé comme voie d'administration, dans le cas du Trickle notamment. Cela peut être un aliment humide ou un aliment normal dans lequel les oocystes enrobés peuvent être incorporés directement. Cette méthode est facile à appliquer.

Pour les antigènes recombinants, la voie parentérale pourrait être retenue à condition d'être applicable le jour de la naissance. La voie orale peut aussi être utilisée sous des formes particulières : incorporation dans des liposomes par exemple (Rhalem *et al*, 1989) ou des iscoms (Kasangi *et al*, 1992). Par contre, l'emploi d'un vecteur bactérien (*E coli* ou salmonelles) ou viral vivant, s'il est intéressant expérimentalement, est sans doute difficile à appliquer dans la pratique.

Enfin, Ruff *et al* (1988) et Fredericksen *et al* (1989) ont montré qu'il était possible d'obtenir une certaine immunité en administrant des antigènes d'*E tenella* dans l'œuf embryonné.

Différents adjuvants ou associations pourraient assurer une meilleure efficacité au vaccin dans le cas d'antigènes. L'adjuvant de Freund, s'il a donné des résultats au titre expérimental, n'est pas à retenir dans la pratique. La toxine cholérique, lors d'administrations par voie buccale, pourrait permettre d'obtenir une meilleure résistance. Signalons enfin un effet potentialisateur du lévamisole sur l'acquisition de la résistance (Giambrone et Klesius, 1985).

## CONCLUSIONS

Nous ne prétendons pas avoir rassemblé ici toutes les connaissances obtenues dans ce domaine des vaccins anticoccidiens. La bibliographie est très abondante,

nous nous sommes limité à quelques exemples. Par ailleurs, il est certain, en raison de l'enjeu économique, que tous les travaux réalisés ne sont pas publiés.

Parry *et al* (1989) considèrent, sans doute à juste titre, que l'emploi d'extraits antigéniques de parasites tués ne peut être une voie commerciale de vaccination en raison des coûts de production. La production d'antigènes vaccinaux par génie génétique est certainement une voie plus intéressante, et il n'est pas étonnant qu'elle intéresse de nombreuses équipes de recherche. Cependant, chez le poulet, qui représente le marché le plus important pour un vaccin, il faut vacciner contre 7 ou 8 espèces (*E hagai* n'est probablement pas essentielle), et il existe probablement des variants au sein de la même espèce (cela semble le cas au moins pour *E maxima*). Enfin, on peut se demander quel stade parasitaire est le plus intéressant à étudier sous cet aspect. Trouver et produire 7 antigènes ou un antigène commun est certainement un problème très complexe, d'autant plus que le coût du vaccin doit être relativement faible. Il est vraisemblable que les recherches entreprises aboutiront mais cela demandera probablement plusieurs années.

En attendant, il existe une nécessité réelle de disposer d'un vaccin. Dans un avenir proche, nous pouvons espérer disposer de vaccins vivants utilisables pour certaines productions (poulettes, poulet «label»). Les souches virulentes administrées en Trickle ne posent pas de problème sur le plan technologique, puisqu'il est même possible de les administrer par l'aliment. Il reste que, même si elle est limitée, la contamination de l'élevage qui en résulte n'est pas sans danger, surtout avec les techniques de litières permanentes. En outre, nous introduisons ainsi dans les élevages des souches virulentes d'espèces qui n'étaient peut être pas présentes. Il peut d'ailleurs sembler curieux d'introduire

dans l'aliment des organismes pathogènes même à des fins prophylactiques. Enfin, on peut se poser la question de la responsabilité du prescripteur ou du fabricant en cas d'apparition de coccidioses par suite de rupture de protection.

Les souches irradiées ne semblent pas une voie à retenir. Malgré les travaux réalisés, on connaît mal l'effet des irradiations sur le parasite et, pour beaucoup d'auteurs, on aboutit simplement à un vaccin constitué d'un faible nombre de parasites ayant échappé à l'irradiation. En outre, on contamine ici encore le milieu avec des parasites qui ont retrouvé ou conservé toute leur virulence.

Les vaccins vivants à base de souches précoces peuvent certainement, dans un premier temps, mieux résoudre le problème. La contamination du milieu, même avec des espèces inconnues de l'élevage, se fait à partir de souches non ou très peu virulentes, et dont la stabilité a été démontrée. Leur administration ne pose pas de problème. Il reste cependant que ces vaccins sont probablement à réserver à certaines productions. Nous ne disposons pas des coûts de production, mais ils sont nécessairement élevés, compte tenu de la nécessité d'entretenir sur animaux 7 ou 9 souches différentes, peu prolifiques, à l'abri des contaminations.

Enfin, avec les vaccins vivants, on peut toujours craindre la présence accidentelle d'anticoccidiens dans l'aliment même à dose réduite. Il en résulterait une multiplication parasitaire réduite ou nulle et l'absence d'immunité.

Pour tous ces vaccins, il est nécessaire d'évaluer l'efficacité. Cela pose un double problème : quel degré d'immunité doit-on obtenir et par quels critères peut-on évaluer convenablement la résistance. Pour notre part, nous pensons qu'une immunité partielle, suffisante pour empêcher l'apparition de maladie ou de baisses de produc-

tion, est suffisante. Il serait utopique de rechercher l'éradication du parasitisme. Les critères employés sont en général les lésions et l'excrétion oocystale, d'autres critères pourraient être pris en compte : hématocrite dans le cas d'*E. tenella*, coloration sérique pour les espèces à localisation intestinale par exemple, en gardant à l'esprit que des modifications réduites sont compatibles avec une bonne vaccination. On constate par exemple que des lésions peuvent exister sans manifestations cliniques ou réduction de la production.

Le domaine de ces vaccins anticoccidiens est en pleine évolution. La cible privilégiée est le poulet, du fait de l'impact économique. C'est probablement dans cet élevage qu'apparaîtront les premiers vaccins antiparasitaires modernes.

## RÉFÉRENCES

- Albanese AA, Smetana H (1937) Studies on the effect of X rays on the pathogenicity of *Eimeria tenella*. *Am J Hyg* 26, 27-39
- Abu Ali N, Binnerts WT, Klimes B (1972) Immunization by irradiated *Eimeria acervulina*. *J Protozool* 19, 177-180
- Augustine PC, Danforth HD (1985) Effects of hybridoma antibodies on invasion of cultured cells by sporozoites of *Eimeria*. *Avian Dis* 29, 1212-1223
- Augustine PC, Danforth HD (1986) A studies of the dynamics of the invasion of immunized birds by *Eimeria* sporozoites. *Avian Dis* 30, 347-351
- Augustine PC, Danforth HD (1987) Use of the monoclonal antibodies to study surface antigens of *Eimeria* sporozoites. *Proc Helminthol Soc Wash* 54, 207-211
- Augustine PC, Danforth HD (1989) Chickens repeatedly inoculated with *Eimeria adenoeides* sporozoites develop immunity to *E. tenella* challenge. In: *Coccidia and intestinal coccidiomorphs* (P Yvoré, ed) Vth International Coccidiosis Conference, Tours (France) 17-20 October 1989 *Colloq INRA* 49, 609-614

- Augustine PC, Danforth HD (1990) Avian *Eimeria*: Invasion in foreign host birds and generation of partial immunity against coccidiosis. *Avian Dis* 34, 196-202
- Bajwa RS, Gill BS (1977) Effect of irradiation (gamma rays) on the biology of *Eimeria tenella* oocysts. *Ann Rech Vét* 8, 181-186
- Baldelli H, Asdrubali G, Bagliomini A, Frescura T, Massa D (1966a) Studio degli effetti delle radiazioni gamma sui coccidi dei polli. I. Effetti delle radiazioni gamma sulla sporulazione di oocisti di *Eimeria tenella*. *Atti Soc Ital Sci Vet* 20, 701-704
- Baldelli H, Asdrubali G, Bagliomini A, Frescura T, Massa D (1966b) Studio degli effetti delle radiazioni gamma sui coccidi dei polli. II. Potere infettante e immunizzante di oocisti di *Eimeria tenella* irradiate prima della sporulazione. *Atti Soc Ital Sci Vet* 20, 705-708
- Baldelli H, Asdrubali G, Bagliomini A, Frescura T, Massa D (1966c) Studio degli effetti delle radiazioni gamma sui coccidi dei polli. III. Potere infettante di oocisti di *Eimeria tenella* irradiate dopo la sporulazione. *Atti Soc Ital Sci Vet* 20, 709-712
- Baldelli H, Asdrubali G, Bagliomini A, Frescura T, Massa D (1966d) Studio degli effetti delle radiazioni gamma sui coccidi dei polli. IV. Potere immunizzante di oocisti di *Eimeria tenella* irradiate dopo la sporulazione. *Atti Soc Ital Sci Vet* 20, 713-716
- Bedrnik P (1984) The pathogenicity of an embryo-adapted line of *Eimeria tenella*. *Arch Gefluegelkde* 48, 209-215
- Bedrnik P, Jurkovic P (1987) Prevention of coccidiosis with the aid of a low pathogenicity strain of *Eimeria tenella*. *Biol Chem Zivocisne Vyroby-Vet* 23, 143-151
- Boghal BS, Miller GA, Anderson AC, Jessee EJ, Strausberg R, McCandliss R, Strausberg S (1989) Vaccinations of chickens with recombinant *Eimeria tenella* antigen alone or in combination with a subclinical exposure induces cross protective immunity against coccidiosis. In: *Recent Advances in Avian Immunology Research* (BS Bhogal, G Koch, eds) AR Liss, New York, 131-146
- Brothers VM, Kuhn I, Paul LS, Gabe JD, Andrews WH, Sias SR, McCaman MT, Dragon EA, Files JG (1988) Characterization of a surface antigen of *Eimeria tenella* sporozoites and synthesis from a cloned cDNA in *Escherichia coli*. *Mol Biochem Parasitol* 28, 235-248
- Bushell JE, Harding RB, Evans NA, Shirley MW (1989) Coccidiosis control in chickens using a live attenuated vaccine. II. Field trial results. In: *Coccidia and intestinal coccidimorphs* (P Yvoré, ed) Vth International Coccidiosis Conference, Tours (France), 17-20 October 1989. *Colloq INRA* 49, 689-692
- Conder GA, Duszynski DW (1977) The effect of heat and Cobalt-60 gamma-radiation on excystation of rat coccidium, *Eimeria nieschulzi* Dieben, 1924. *J Protozool* 24, 177-181
- Cox AB, Duncan S, Levy CK (1977) *Eimeria falcififormis*: Effects of <sup>60</sup>Co irradiation on infectivity and immunogenicity of sporulated oocysts. *J Parasitol* 63, 927-929
- Crane MSJ, Murray PK, Gnozzio MJ, McDonald TT (1988) Passive protection of chickens against *Eimeria tenella* infection by monoclonal antibody. *Infect Immun* 56, 972-976
- Crane MSJ, Goggin B, Pellegrino RM, Ravino OJ, Lange C, Karkhanis YD, Kirk Ke, Chakraborty PR (1991) Cross-protection against four species of chicken coccidia with a single recombinant antigen. *Infect Immun* 59, 1271-1277
- Danforth HD (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
- Danforth HD, Augustine PC (1989) *Eimeria tenella*: Use of a monoclonal antibody in determining the intracellular fate of the refractile body organelles and on the effect on *in vitro* development. *Exp Parasitol* 68, 1-7
- Danforth HD, Augustine PC, Ruff MD, McCandliss R, Strausberg RL, Likel M (1989) Genetically engineered antigen confers partial protection against avian coccidial parasites. *Poultry Sci* 68, 1643-1652
- Davies PJ, Porter P (1983) *Eimeria tenella*: control of parasitic behaviour through mucosal immunity and in feed immunization. In: *The secretory system* (JR McGhee, J Messtecky, eds) *Ann N Y Acad Sci* 409, 810-811
- Edgar SA, Fitz-Coy SH (1985) Efficacy of Coccivac D plus three anticoccidial drugs versus monensin in broiler chickens. *Poultry Sci* 64, 18

- Evans NA, Harding RB, Roberts B, Shirley MW (1989) Coccidiosis control in chickens using a live attenuated vaccine. I. Experimental studies. In: *Coccidia and intestinal coccidomorphs* (P Yvoré, ed) Vth International Coccidiosis Conference, Tours (France), 17-20 October 1989. *Colloq INRA* 49, 683-688
- Fish FF (1932) Some factors in the control of coccidiosis of poultry. *J Am Vet Med Assoc* 80, 543-559
- Fredericksen TL, Thaxton JP, Gildersleeve RP, Rowe DG, Ruff MD, Strohle DA, Danforth HD (1989) *In ovo* administration of a potential recombinant coccidial antigen vaccine in poultry. In: *Coccidia and intestinal coccidomorphs* (P Yvoré, ed) Vth International Coccidiosis Conference, Tours (France), 17-20 October 1989. *Colloq INRA* 49, 655-660
- Fried M, Mencher D, Sarshalom O, Wallach M (1992) Developmental gene expression of a 230-kilodalton macrogamete-specific protein of avian coccidial parasite, *Eimeria maxima*. *Mol Biochem Parasitol* 51, 251-262
- Fu HM, Lee YC (1976) Immunological studies on chemically attenuated oocysts of chicken caecal coccidia. *J Chinese Soc Vet Sci* 2, 51-55
- Giambrone JJ, Klesius PH (1985) Effect of levamisole on the response of broilers to coccidiosis vaccination. *Poultry Sci* 64, 1083-1089
- Geysen J, Ausma J, Van den Bossche H (1991) Simultaneous purification of merozoites and schizonts of *Eimeria tenella* (Apicomplexa) by percoll flotation and assessment of cell viability with a double fluorescent dye assay. *J Parasitol* 77, 989-993
- Gore TC, Long PL, Kogut M, Joyce Johnson (1983) Attenuation of *Eimeria necatrix* and *E. tenella* of US origin by serial embryo passage. *Avian Dis* 27, 569-576
- Gregory MW, Catchpole J (1989) Ovine coccidiosis: Heavy infection in young lambs increases resistance without causing disease. *Vet Rec* 124, 458-451
- Hein H (1963) Vaccination against infection with *Eimeria tenella* in broiler chickens. *Proc XVII World Vet Congr* 2, 1443-1452
- Jeffers TK (1974) Immunization against *Eimeria tenella* using an attenuated strain. 15th World's Poultry Congress, New Orleans, USA, 105-107
- Jeffers TK (1975) Attenuation of *Eimeria tenella* through selection for precociousness. *J Parasitol* 61, 1083-1090
- Jeffers TK, Long PL (1985) *Eimeria tenella*: immunogenicity of arrested sporozoites in chickens. *Exp Parasitol* 60, 175-180
- Jenkins MC, Lillehoj HS, Dame JB (1988) *Eimeria acervulina*: DNA cloning and characterization of recombinant sporozoite and merozoite antigens. *Exp Parasitol* 66, 96-107
- Jenkins MC, Lillehoj HS, Barta JR, Danforth HD, Strohle DA (1990) *Eimeria acervulina*: cloning of a cDNA encoding an immunogenic region of several related merozoite surface and rhoptry proteins. *Exp Parasitol* 70, 353-362
- Jenkins MC, Augustine PC, Barta JR, Castle MD, Danforth HD (1991) Development of resistance to coccidiosis in absence of merogonic development using X-irradiated *Eimeria acervulina* oocysts. *Exp Parasitol* 72, 285-293
- Johnson JK, Long PL (1985) The pathogenicity and immunogenicity of a precocious strain of *Eimeria brunetti*. *Poultry Sci* 64, 123
- Johnson J, Reid WM, Jeffers TK (1978) Immunization studies with attenuated strains of *Eimeria tenella* in floor pens. *Poultry Sci* 57, 1148
- Johnson JK, Long PL, McKenzie ME (1986) The pathogenicity, immunogenicity and endogenous development of a precocious line of *Eimeria brunetti*. *Avian Pathol* 15, 697-704
- Joyner LP (1969) Immunological variation between two strains of *Eimeria acervulina*. *Parasitology* 59, 725-732
- Joyner LP, Norton CC (1973) The immunity arising from continuous low-level infection with *Eimeria tenella*. *Parasitology* 67, 333-340
- Joyner LP, Norton CC (1976) The immunity arising from continuous low-level infection with *Eimeria maxima* and *Eimeria acervulina*. *Parasitology* 72, 115-125
- Karkhanis YD, Nollstadt KA, Bhogal BS, Ravino O, Pellegrino R, Crane MS, Murray PK, Turner MJ (1991) Purification and characterization of a protective antigen from *Eimeria tenella*. *Infect Immun* 59, 983-989
- Kasangi M, Rhalem A, Pery P (1992) Mucosal immunization of mice with the major surface protein of *Eimeria falciformis* sporozoites after its entrapment in iscoms. In: *Proc VIth*

- European Multicollloquium Parasitol Sept 7-11, The Hague, The Netherlands*
- Kawaguchi H, Konishi T, Nakamura T (1988) Characteristics of a precocious line of *Eimeria tenella*: pathogenicity and endogenous development. *Jpn J Vet Sci* 50, 445-452
- Kim KS, Jenkins MC, Lillehoj HS (1989) Immunization of chickens with live *Escherichia coli* expressing *Eimeria acervulina* merozoite recombinant antigen induces partial protection against coccidiosis. *Infect Immun* 57, 2434-2440
- Klimes B, Tanielan Z, Abu Ali N (1972) Excystation and development in cell culture of irradiated oocysts of *Eimeria tenella*. *J Protozool* 19, 500-504
- Ko C, Smith II CK, McDonell (1990) Identification and characterization of a target antigen of a monoclonal antibody directed against *Eimeria tenella* merozoites. *Mol Biochem Parasitol* 41, 53-64
- Kogut MH, Eirmann L (1991) The effect of cyclosporine A on the development of *Eimeria* in non specific hosts. *Int J Parasitol* 21, 979-983
- Lee EH (1987) Vaccination against coccidiosis in commercial roaster chickens. *Can Vet J* 28, 434-436
- Lee EH (1989) Control of coccidiosis in broiler chickens by vaccination. Field trial comparison between «Immucox» (coccidiosis vaccine) and halofuginone, salinomycin program in Texas, USA. In: *Coccidia and intestinal coccidiomorphs* (P Yvoré, ed) Vth International Coccidiosis Conference, Tours (France) 17-20 October 1989. *Colloq INRA* 49, 661-666
- Licois D, Coudert P, Boivin M, Drouet-Viard F, Provot F (1990) Selection and characterization of a precocious line of *Eimeria intestinalis*, an intestinal rabbit coccidia. *Parasitol Res* 76, 192-198
- Long PL (1965) Development of *Eimeria tenella* in avian embryos. *Nature* 208, 509-510
- Long PL (1966) The growth of some species of *Eimeria* in avian embryos. *Parasitology* 56, 575-581
- Long PL (1972) *Eimeria tenella*: Reproduction, pathogenicity and immunogenicity of a strain maintained in chick embryos by serial passage. *J Comp Pathol Ther* 82, 429-437
- Long PL (1974a) Experimental infection of chickens with two species of *Eimeria* isolated from the Malaysian jungle fowl. *Parasitology* 69, 337-347
- Long PL (1974b) Further studies on the pathogenicity and immunogenicity of an embryo-adapted strain of *Eimeria tenella*. *Avian Pathol* 3, 255-268
- Long PL, Millard BJ (1968) *Eimeria*: Effect of meticlorpindol and methylbenzoquate on endogenous stages in the chicken. *Exp Parasitol* 23, 331-338
- Long PL, Johnson JK (1988) *Eimeria* of American chickens: characteristics of six attenuated strains produced by selection of precocious development. *Avian Pathol* 7, 305-314
- Long PL, Johnson J, McKenzie ME, Perry E, Crane MStJ, Murray PK (1986) Immunization of young broiler with low level infections of *Eimeria tenella*, *E acervulina* or *E maxima*. *Avian Pathol* 15, 271-278
- Mc Donald V, Ballingall S (1983a) Further investigation of the pathogenicity, immunogenicity and stability of precocious *Eimeria acervulina*. *Parasitology* 86, 361-369
- Mc Donald V, Ballingall S (1983b) Attenuation of *Eimeria mivati* (= *mitis*) by selection for precocious development. *Parasitology* 86, 371-379
- McDonald V, Shirley MW (1984) *Eimeria mitis* a comparison of the endogenous developmental stages of a line selected for early maturation of the parent strain. *Parasitology* 88, 37-44
- McDonald V, Ballingall S, Shirley MW (1982) A preliminary study of the nature of infection and immunity in chickens given an attenuated line of *Eimeria acervulina*. *Parasitology* 84, 21-30
- McDonald V, Shirley MW, Chapman HD (1985) Attenuation of *Eimeria* species: further characterization of two lines of *Eimeria mitis*. *Res Vet Sci* 39, 328-332
- McDonald V, Shirley MW, Bellatti MA (1986a) *Eimeria maxima*: characteristics of attenuated lines obtained by selection for precocious development in the chicken. *Exp Parasitol* 61, 192-200
- McDonald V, Rose ME, Jeffers TK (1986b) *Eimeria tenella*: immunogenicity for the first generation of schizogony. *Parasitology* 93, 1-7

- McDougald LR, Jeffers TK (1976) Comparative *in vitro* development of precocious and normal strains of *Eimeria tenella* (Coccidia). *J Protozool* 23, 530-534
- Mencher D, Pugatsch T, Wallach M (1989) Antigenic proteins of *Eimeria maxima* gametocytes: cell-free translation and detection with recovered chicken serum. *Exp Parasitol* 68, 40-48
- Miller GA, Bhogal BS, McCandliss R, Strausberg RL, Jessee EJ, Anderson AC, Fuchs CK, Nagle J, Likel MH, Strasser JM, Strausberg S (1989a) Characterization and vaccine potential of a novel recombinant coccidial antigen. *Inf Immun* 57, 2014-2020
- Miller GA, Bhogal BS, Anderson AC, Jessee EJ, McCandliss R, Strasser JM, Strausberg S, Strausberg R (1989b) Application of a novel recombinant *Eimeria tenella* antigen in a vaccine to protect broiler chickens from coccidiosis. *Recent Adv Avian Immunol Res* (307) 117-130
- Murray PK, Bhogal BS, Crane MStJ, McDonald TT (1986) *Eimeria tenella*. *In vivo* immunization studies with sporozoite antigen. *Research in Avian Coccidiosis. Proceeding of the Georgia Coccidiosis Conference*, 18-20 Nov 1985, 564-573
- Norton CC, Joyner LP (1986) Avian coccidiosis: the administration of encapsulated oocysts. *Parasitology* 92, 499-510
- Parry SH, Barratt MEJ, Davis PJ, Jones S (1989) Theoretical and practical aspects of vaccination against coccidiosis. In: *Coccidia and intestinal coccidiomorphs* (P Yvoré, ed) Vth International Coccidiosis Conference, Tours (France) 17-20 October 1989. *Colloq INRA* 49, 617-632
- Pugatsch T, Mencher D, Wallach M (1989) *Eimeria maxima*: isolation of gametocytes and their immunogenicity in mice, rabbit and chickens. *Exp Parasitol* 68, 127-134
- Reid WM (1975) Progress in the control of coccidiosis with anticoccidials and planned immunization. *Am J Vet Res* 36, 593-596
- Rhalem A, Bekhti K, Bourdieu C, Luffau G, Pery P (1989) Vaccination de la souris contre la coccidiose murine par ingestion de protéines de surface d'*Eimeria falciformis* incorporées dans des liposomes. *CR Acad Sci Paris* 309, 19-23
- Rose ME (1982) Host immune response. In: *The Biology of the Coccidia* (PL Long, ed). University Park Press, Baltimore, 329-371
- Rose ME (1987) *Eimeria, Isospora and Cryptosporidium*. In: *Immunology, Immunopathology and Immunoprophylaxis of Parasitic Infections, vol III: Protozoa* (EJS Soulsby, ed) CRC Press Inc, Boca Raton, 275-312
- Rose ME, Hesketh P (1976) Immunity to coccidiosis: stages of the life cycle of *Eimeria maxima* which induce, and are affected by, the response of the host. *Parasitology* 73, 25-37
- Ruff MD, Fredericksen TL, Thaxton JP, Strohle DA, Danforth HD, Gildersleeve RP (1988) *In ovo* vaccination against *Eimeria tenella*. *Poultry Sci* 67 (suppl 1) 147
- Shirley MW (1980) *Eimeria necatrix*: the development and characteristics of an egg-adapted (attenuated) line. *Parasitology* 81, 525-535
- Shirley MW (1989) Development of a live attenuated vaccine against coccidiosis in poultry. *Parasite Immunol* 11, 117-124
- Shirley MW, Bellatti MA (1984) *Eimeria necatrix*: selection and characteristics of a precocious (and attenuated) line. *Avian Pathol* 13, 657-668
- Shirley MW, Millard BJ (1986) Studies of the immunogenicity of seven attenuated lines of *Eimeria* given as a mixture to chickens. *Avian Pathol* 15, 629-638
- Shirley MW, Bellatti MA (1988) Live attenuated coccidiosis vaccine: selection of a second precocious line of *Eimeria maxima*. *Res Vet Sci* 44, 25-28
- Shirley MW, Bellatti MA, Millard BJ (1982) An egg-adapted (attenuated) line of *Eimeria necatrix*: further studies on its reproduction, pathogenicity and immunogenicity. *Parasitology* 84, 215-226
- Shirley MW, McDonald V, Bellatti MA (1986) *Eimeria brunetti*: selection and characteristics of a precocious (and attenuated) line. *Avian Pathol* 15, 705-717
- Singh J, Gill BS (1975) Effect of gamma-irradiation on oocysts of *Eimeria necatrix*. *Parasitology* 71, 117-124
- Sutton CA, Shirley MW, McDonald V (1986) Genetic recombination of markers for precocious development, arprinocid resistance

- and isoenzymes of glucose phosphate isomerase in *Eimeria acervulina*. *J Parasitol* 72, 965-967
- Tomley FM, Clarke Le, Kawazoe U, Dijkema R, Kok JJ (1991) Sequence of the gene encoding an immunodominant microneme protein of *Eimeria tenella*. *Mol Biochem Parasitol* 49, 277-288
- Uricchio WA (1953) The feeding of artificially altered oocysts of *Eimeria tenella* as a means of establishing immunity to cecal coccidiosis in chickens. *Proc Helminthol Soc Wash* 20, 77-83
- Wallach MG, Mencher D, Yarus S, Pillemer G, Halabi A, Pugatsch T (1989) *Eimeria maxima*: identification of gametocyte protein antigens. *Exp Parasitol* 68, 49-56
- Waxler SH (1941) Immunization against cecal coccidiosis in chickens by the use of X-ray attenuated oocysts. *J Am Vet Med Assoc* 99, 481-485