รายงานการวิจัย

การจำแนกชนิดของเชื้อบิดในไก่ด้วยวิธี multiplex PCR
เพื่อนำมาใช้เป็นสเตรนต้นแบบสำหรับการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคบิด
Purification and identification of *Eimeria* spp. in chicken by multiplex PCR and establish a pure line of *Eimeria* spp. by using single-oocyst isolation

คณะผู้วิจัย

วิภาพร จารุจารีต Wipaporn Jarujareet
คมปกร ตาณะสุต Khompakorn Thanasut

คณะสัตวแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย
งบวิจัยทุนรายได้ประจำปี พ.ศ. ๒๕๖๓

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบประมาณเงินรายได้ประจำปี ๒๕๖๓ เป็นงานวิจัยพื้นฐานเพื่อก่อให้เกิดองค์ความรู้ที่จะนำไปสู่การหาแนวทางในการป้องกันและรักษาโรคบิดในไก่ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนั้นงานวิจัยนี้ยังสามารถสร้าง pure-line ของเชื้อบิดในไก่สำหรับเป็นสเตรนต้นแบบในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคบิดต่อไป

ขอขอบคุณ ผู้ร่วมวิจัย นักศึกษา และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของแผนกปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือต่าง ๆ เป็นอย่างดีตลอดมาจนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี

วิภาพร จารุจารีต

๒ กันยายน ๒๕๖๔

การจำแนกชนิดของเชื้อบิดในไก่ด้วยวิธี multiplex PCR เพื่อนำมาใช้เป็นสเตรนต้นแบบสำหรับการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคบิด

วิภาพร จารุจารีต[๑] และ คมปกร ตาณะสุต[๑]

บทคัดย่อ

โรคบิดในไก่เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อโปรโตซัวในสกุล *Eimeria* ซึ่งส่งผลกระทบและก่อให้เกิดความสูญเสียต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่เป็นอย่างมาก โดยปกติแล้วการติดเชื้อในธรรมชาติส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อร่วมกันของ *Eimeria* หลายชนิด การวินิจฉัยแยกแยะเชื้อบิดที่มีความไวความถูกต้องและความจำเพาะมากกว่าวิธีปฏิบัติโดยทั่วไปจึงมีความสำคัญต่อการจัดการควบคุมและป้องกันโรค การศึกษาทางระบาดวิทยา รวมไปถึงการพัฒนาวัคซีน การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการจำแนกชนิดและสร้าง pure-line ของเชื้อ *E. acervulina* และ *E. tenella* โดยใช้วิธี single-oocyst isolation และได้มีการตรวจวินิจฉัยเพื่อยืนยันว่าชนิดของ *Eimeria* ที่พบและนำมาสร้างเป็น pure-line นั้นมีแค่ชนิด *E. acervulina* และ *E. tenella* โดยใช้การศึกษาทางสัณฐานวิทยา การศึกษารอยโรคทางมหพยาธิวิทยา และมัลติแพล็กซ์พีซีอาร์ ผลการตรวจด้วยวิธีมัลติแพล็กซ์พีซีอาร์ยืนยันพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *E. acervulina* และ *E. tenella* เท่านั้น

คำสำคัญ: โรคบิดในไก่ การตรวจหาเชื้อ การจำแนกชนิด มัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ วัคซีน

---

[๑] คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช

Purification and identification of *Eimeria* spp. in chicken by multiplex PCR and establish a pure line of *Eimeria* spp. by using single-oocyst isolation

Wipaporn Jarujareet[1] and Khompakorn Thanasut[1]

Abstract

Chicken coccidiosis caused by intracellular protozoa parasites belonging to the genus *Eimeria* remains one of the economically most important diseases in the poultry production. Natural infection by *Eimeria* are generally mixed with more than one species. Identification and purification of these species in the infected chicken has important implications for diagnosis and disease management, for epidemiology and biology studies as well as creation of new vaccines. In this study, a pure-line of *E. acervulina* and *E. tenella* oocysts were established by using single-oocyst passage in chickens. The purity of *E. acervulina* and *E. tenella* oocysts was confirmed base on morphology, gross lesions and multiplex PCR. DNA sample from the single oocyst infection showed the presence of only two specific amplifications of DNA of *E. acervulina* and *E. tenella.*

Keywords: Chicken coccidiosis, Detection, Identification, Multiplex PCR, Vaccine

[1] Faculty of Veterinary Science Rajamangala University of Technology Srivijaya, Nakhon Si Thammarat

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทนำ	๑
๑. ที่มาและความสำคัญของปัญหา	๑
๒. ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	๑
๓. สมมติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	๓
๔. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	๓
๕. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	๓
วิธีการดำเนินงานวิจัย	๔
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล	๘
สรุปผลการวิจัย	๑๑
บรรณานุกรม	๑๒

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
๑	ตารางเปรียบเทียบคุณลักษณะที่แตกต่างกันของเชื้อบิดที่ก่อโรคในไก่ (Diagnostic characteristics of *Eimeria* spp. in chicken)	๕
๒	Forward และ Reverse ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ multiplex PCR	๖
๓	ผลการตรวจหาโอโอซีสต์ด้วยวิธี sugar centrifugal flotation	๘
๔	การพัฒนาของ endogenous stage ของเชื้อบิดภายในเซลล์ลำไส้ส่วนต่าง ๆ	๑๐

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
๑	แสดงรูปร่างขนาดและลักษณะของโอโอซีสต์ที่ตรวจเจอที่กำลังขยาย ๒๐๐x	๘
๒	แสดงลักษณะของจุดสีขาว เรียงตามขวางเหมือนขั้นบันไดบริเวณ duodenal loop	๙
๓	แสดงจุดเลือดออก cecal core และการหนาตัวขึ้นของผนังลำไส้ส่วน caecum	๙
๔	Gel electrophoresis การตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *E. tenella* และ *E. acervulina* ด้วยวิธี multiplex PCR	๑๐

บทนำ

๑. ที่มาและความสำคัญของปัญหา

โรคบิดในไก่เป็นโรคที่เกิดจากการติดเชื้อโปรโตซัวในสกุล *Eimeria* ซึ่งส่งผลกระทบและก่อให้เกิดความสูญเสียต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่เป็นอย่างมาก (Allen and Fetterer, ๒๐๐๒; Kawahara et al., ๒๐๑๔) โดยทั่วไปการตรวจแยกชนิดเชื้อบิดในไก่เป็นการแยกโดยอาศัยลักษณะรูปร่างของเชื้อบิดและบริเวณตำแหน่งในลำไส้ของไก่ที่ติดเชื้อบิด ซึ่งหลักการนี้พบว่าการตรวจแยกความแตกต่างของชนิดเชื้อบิดในบางครั้งให้ผลไม่น่าเชื่อถือเพราะโดยปกติแล้วการติดเชื้อที่เกิดในธรรมชาติส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อร่วมกันของหลายชนิด (Long and Joyner, ๑๙๘๔) การวินิจฉัยแยกแยะเชื้อบิดที่มีที่มีความไว ความถูกต้องและความจำเพาะมากกว่าวิธีปฏิบัติโดยทั่วไป จึงมีความสำคัญต่อการจัดการควบคุมและป้องกันโรค การศึกษาทางระบาดวิทยารวมไปถึงการพัฒนาวัคซีน

งานวิจัยชิ้นนี้จะทำการตรวจวินิจฉัยแยกแยะเชื้อบิดโดยวิธี multiplex PCR เพราะวิธีนี้สามารถตรวจวินิจฉัยแยกแยะชนิดของเชื้อบิดได้หลายชนิดพร้อมกันในปฏิกิริยาเดียว และการตรวจหานั้นมีความจำเพาะเจาะจงต่อยีนที่แตกต่างกันในแต่ละชนิดของเชื้อบิด นอกจากนี้ในภาคใต้ก็ยังมีการพบการติดเชื้อบิดในไก่อยู่เป็นประจำแต่ยังไม่พบข้อมูลที่รายงานถึงชนิดของเชื้อบิดว่าเกิดจากเชื้อชนิดใด ซึ่งงานวิจัยนี้จะทำให้ทราบถึงข้อมูลการติดเชื้อและชนิดของเชื้อบิดซึ่งจะนำไปสู่การหาแนวทางในการป้องกันและรักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น และนอกจากจะทราบถึงชนิดของเชื้อบิดที่ก่อโรคแล้วงานวิจัยนี้ยังจะทำการแยกเชื้อแต่ละชนิดเพื่อให้ได้ pure-line ที่จะนำมาใช้เป็น สเตรนต้นแบบในการผลิตและพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคบิดในไก่ต่อไปในอนาคต

๒. ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

๒.๑ โรคบิดในไก่ (Chicken coccidiosis)

มีสาเหตุมาจากสัตว์เซลล์เดียวในสกุล *Eimeria* พบได้ ทั้งหมด ๙ ชนิด ได้แก่ *E. acervulina, E. brunetti, E. hagani, E. maxima, E. mitis, E. mivati, E. praecox, E. necatrix* และ *E. tenella* (Tsuji et al., ๑๙๙๗; Vrba et al., ๒๐๑๑; Aziz et al., ๒๐๑๖) โดยเชื้อบิดที่สำคัญ และก่อให้เกิดผลเสียต่อ เศรษฐกิจมี ๗ ชนิด คือ *E. acervulina, E. brunetti, E. maxima, E. mitis, E. praecox, E. necatrix* และ *E. tenella* และชนิดที่มีความสำคัญและก่อโรค รุนแรงมากที่สุดมีอยู่ ๕ ชนิด ตามลำดับความรุนแรงคือ *E. tenella, E. necatrix, E. maxima, E. brunetti* และ *E. acervulina* (Allen and Fetterer, ๒๐๐๒; Kawahara et al., ๒๐๑๔) ซึ่งการเกิดโรคจากเชื้อบิดแต่ละชนิดจะมีความรุนแรงและลักษณะของการเกิดโรคที่แตกต่างกันในแต่ละตำแหน่งของลำไส้ โดย *E. acervulina* เกิดโรคที่ลำไส้เล็กส่วนต้นโดยจะมองเห็นแถบขาวตามขวางลำไส้ซึ่งเกิดจากโอโอซีสต์และผนังลำไส้หนาขึ้น *E. tenella* เกิดโรคที่ไส้ตันโดยจะเกิดเป็นจุดเลือดออก ผนังลำไส้หนาขึ้นเยื่อเมือกเป็นสีขาวและมีลิ่มเลือดติดอยู่และมีเลือดออกปนมากับอุจจาระ *E. necatrix*

เกิดโรคที่ลำไส้เล็กส่วนกลางทำให้เกิดลำไส้โป่งพอง มีจุดสีขาว มีเยื่อเมือกและเลือดปนกับเนื้อตาย และมีเลือดออกปนมากับอุจจาระ *E. maxima* เกิดโรคที่ลำไส้เล็กส่วนกลาง โดยทำให้ผนังลำไส้หนาขึ้น มีเยื่อเมือกปนเลือดและมีเนื้อตาย *E. brunetti* เกิดโรคที่ลำไส้เล็กส่วนปลายไปจนถึงลำไส้ใหญ่ทำให้เกิดเนื้อตายมีเลือดออกและลำไส้อักเสบ *E. praecox* เกิดโรคที่ลำไส้เล็กส่วนต้น รอยโรคไม่แสดงอาการชัดเจนนัก มีเยื่อเมือกหลุดลอก *E. mitis* เกิดโรคที่ลำไส้เล็กส่วนต้นไม่แสดงรอยโรคให้เห็นหรืออาจจะมีเยื่อเมือกหลุดลอก (Johnson and Reid, ๑๙๗๐; Hafez, ๒๐๐๘; Quiroz-Castanneda and Dantan-Gonzalez, ๒๐๑๕) การติดต่อติดผ่านทางการกินโดยเชื้อที่ขับออกมาทางอุจจาระแพร่กระจายไปตามพื้นวัสดุรองพื้นหรือติดไปกับรองเท้าผู้เลี้ยง ระยะฟักตัว ประมาณ ๔ – ๖ วัน อาการไก่ที่ป่วยเป็นโรคบิดจะกินอาหารน้อยลงแต่กินน้ำมากขึ้น หงอยซึม ขนยุ่ง ปีกตก ท้องร่วง มีเลือดปนออกมาในอุจจาระโดยมักจะเห็นเป็นสีแดง น้ำตาล หรือแดงเข้ม

วิธีป้องกันโรคบิดของฟาร์มไก่ส่วนใหญ่มักทำโดยการใช้ยากันบิด แต่ในขณะเดียวกันก็พบว่าในฟารม์ไก่ที่มีการใช้ยากันบิดยังคงตรวจพบไก่ที่เป็นโรคบิด ดังนั้นการใช้ยากันบิดที่ไม่ได้ผลอาจมีสาเหตุมาจากเชื้อบิดมีการดื้อต่อยาเพิ่มมากขึ้น รวมทั้งมีการจัดการภายในฟาร์มที่ไม่ดี เช่น วัสดุรองนอนชื้นแฉะ ทำให้โอโอซีสต์ (oocyst) สามารถพัฒนาไปเป็นระยะติดโรค (sporulated oocyst) ได้ นอกจากนี้การมีโอโอซีสต์ปนเปื้อนในน้ำและอาหาร การระบายอากาศที่ไม่ดีและความหนาแน่นของการเลี้ยงต่อฝูงมากเกินไปล้วนแล้วแต่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคบิดได้ทั้งสิ้น ทำให้มีการนำวัคซีนมาใช้ในการป้องกันโรคบิดเพิ่มมากขึ้น ซึ่งพบว่าได้ผลดีกว่าการใช้ยาต้านบิด การควบคุมโรคบิด ประกอบไปด้วย การป้องกัน การรักษา รวมทั้ง การจัดการฟาร์ม ให้ได้อย่างเหมาะสม ซึ่งปัจจัยต่างๆ เหล่านี้จำเป็นต้องมีวิธีการตรวจวินิจฉัยที่มีความไวและความแม่นยำสูง

๒.๒ การวินิจฉัยแยกแยะชนิดของเชื้อบิดในไก่ (Species identification of *Eimeria* in chicken)

โดยปกติแล้วการวินิจฉัยแยกแยะชนิดของเชื้อบิดนั้นอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ sporulated oocyst ระยะเวลาของการ sporulation ระยะการฟักตัวของโรค ลักษณะของเชื้อภายในเยื่อบุลำไส้ของไก่และตำแหน่งหรือคะแนนรอยโรคที่เกิดขึ้นในลำไส้ แต่อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวข้างต้นจำเป็นต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์เพื่อแยกแยะเนื่องจากลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อบิดแต่ละชนิดมีความใกล้เคียงกันมาก นอกจากนี้การติดเชื้อร่วมกันของโรคบิดหลายชนิดมักก่อให้เกิดปัญญาในการดูรอยโรคที่ลำไส้และก่อให้เกิดความยากลำบากที่จะแยกแยะชนิดของเชื้อบิดที่ถูกต้องและแม่นยำ (Long and Joyner, ๑๙๘๔; Fernandez et al., ๒๐๐๓; Huang et al., ๒๐๐๗; Kumar et al., ๒๐๑๔). การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อบิดที่มีความแม่นยำ (*Eimeria* species specific) ถูกพัฒนาขึ้นบนพื้นฐานของเทคนิค PCR โดยมุ่งเป้าไปยังยีนที่เกี่ยวข้องได้แก่ *E. tenella* ๕S or small subunit rRNAs (Stucki et al., ๑๙๙๓; Tsuji et al., ๑๙๙๗), sporozoite antigen gene EASZ๒๔๐/๑๖๐ (Molloy et al., ๑๙๙๘), internal transcribed spacer-๑ และ ๒ (ITS-๑ and ITS-๒) (Schnitzler et al., ๑๙๙๘, ๑๙๙๙; Woods et al., ๒๐๐๐; Gasser et al., ๒๐๐๑; Lew et al., ๒๐๐๓; Su et al., ๒๐๐๓; Lien et al., ๒๐๐๗). โดยหนึ่งในวิธี PCR ที่ใช้สำหรับแยกชนิดของเชื้อบิดในปัจจุบันคือวิธี multiplex PCR ซึ่งสามารถตรวจแยกแยะชนิดของเชื้อบิดได้โดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่เพียงหนึ่งครั้ง

นอกจากนี้ยังสามารถตรวจวินิฉัยได้ในกรณีที่มี DNA ต้นแบบอยู่น้อย (Fernandez et al., ๒๐๐๓; Haug et al., ๒๐๐๗; Carvalho et al., ๒๐๑๑; Frolich et al., ๒๐๑๓)

๓. สมมติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

โดยธรรมชาติเชื้อบิดที่ก่อให้เกิดโรคในฟาร์มไก่ไม่ได้มีเพียงชนิดเดียวการป้องกันและควบคุมโรคจะต้องใช้วัคซีนที่มีเชื้อบิดชนิดที่จำเพาะต่อเชื้อที่มีการระบาด เพราะวัคซีนป้องกันโรคบิดที่ใช้อยู่ในปัจจุบันไม่สามารถควมคุมโรคข้ามชนิดได้ (species specific) ดังนั้น การวินิจฉัยแยกแยะชนิดของเชื้อบิดที่มีการระบาดจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งต่อการจัดการป้องกัน ควบคุมโรค การศึกษาทางระบาดวิทยารวมไปถึงการพัฒนาวัคซีน

๔. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

๔.๑ เพื่อตรวจวินิจฉัยแยกแยะเชื้อบิดในไก่จากอุจจาระด้วยวิธี multiplex PCR

๔.๒ เพื่อสร้าง pure-line ของเชื้อบิดในไก่สำหรับเป็นสเตรนต้นแบบในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคบิด

๕. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

๕.๑ สามารถจำแนกชนิดของเชื้อบิดที่ก่อโรคในไก่ เพื่อเป็นแนวทางในการใช้ยาและวัคซีนในการป้องกันโรคบิด ต่อไปในอนาคต

๕.๒ ได้ pure-line ของเชื้อบิดในไก่เพื่อนำมาใช้เป็นสเตรนต้นแบบในการพัฒนาวัคซีนป้องกันโรคบิด

๕.๓ สามารถนำผลงานการศึกษาไปใช้ในงานบริการวิชาการแก่เกษตรกรผู้เลี้ยงไก่

วิธีการดำเนินงานวิจัย

๑. การเก็บตัวอย่างอุจจาระไก่

ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างอุจจาระจากฟาร์มไก่เนื้อ ไก่ไข่ ทั้งที่ทราบและไม่ทราบประวัติการระบาดของโรคบิดในเขตพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราช และนำตัวอย่าง อุจจาระไก่ที่เก็บได้ในแต่ละฟาร์มเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิไม่เกิน ๑๐ องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำไปใช้ ในขั้นตอนถัดไป

๒. การตรวจหาและเก็บโอโอซีสต์ของเชื้อบิดในตัวอย่างอุจจาระ

๒.๑ การตรวจหาโอโอซีสต์ด้วยวิธี sugar centrifugal flotation

นำตัวอย่างอุจจาระของไก่ที่เก็บได้ในแต่ละฟาร์มแยกตรวจหาโอโอซีสต์ด้วยวิธี sugar centrifugal flotation ซึ่งมีวิธีการดังนี้ นำอุจจาระที่ได้ทั้งหมดผสมให้เข้ากันแล้วตักแบ่งอุจจาระมาประมาณ ๑ กรัมผสมกับน้ำประปา ๕๐ มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านตะแกรงสแตนเลสตาถี่ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง ๑๐๐ mesh จากนั้นแบ่งสารละลายปริมาตร ๕ มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองพลาสติกขนาดความจุ ๑๕ มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว ๑,๖๑๐ × g เป็นเวลา ๕ นาที หลังจากปั่นเหวี่ยงเสร็จเทสารละลายส่วนบนทิ้ง จากนั้นเติมสารละลายน้ำตาลและเกลือที่มีค่าความถ่วงจำเพาะ ๑.๒๘ ปริมาตร ๑๐ มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว ๑,๖๑๐ × g เป็นเวลา ๕ นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายน้ำตาลและเกลือจนกระทั่งเต็มปริ่มถึงขอบหลอดทดลอง นำ cover glass ขนาด ๑๘ × ๑๘ มิลลิเมตร วางปิดด้านบน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ ๕ นาที แล้วนำ cover glass มาวางบนแผ่นกระจกสไลด์ตรวจหาโอโอซีสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ที่กำลังขยายเลนส์วัตถุ ๑๐x และ ๔๐x

๒.๒ เก็บโอโอซีสต์ของเชื้อบิดในตัวอย่างอุจจาระ

ในกรณีที่ตรวจเจอโอโอซีสต์จากอุจจาระในไก่ในฟาร์มใดก็จะนำอุจจาระที่เหลือทั้งหมดมาทำการเก็บแยกโอโอซีสต์เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป โดยมีวิธีเก็บโอโอซีสต์ดังนี้ นำอุจจาระที่ได้ทั้งหมดผสมกับน้ำประปาแล้วกรองผ่านตะแกรงสแตนเลสตาถี่ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง ๑๐๐ mesh จากนั้นนำสารละลายที่ผ่านการกรองแล้วมาแบ่งใส่ในหลอดทดลองความจุขนาด ๕๐ มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว ๑,๖๑๐ × g เป็นเวลา ๕ นาที หลังจากปั่นเหวี่ยงเสร็จเทสารละลายส่วนบนทิ้ง จากนั้นเติมสารละลายน้ำตาลและเกลือที่มีค่าความถ่วงจำเพาะ ๑.๒๘ ปริมาตร ๔๐ มิลลิลิตร ลงไปในหลอดทดลองแต่ละหลอดและคนให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว ๑,๖๑๐ × g เป็นเวลา ๕ นาที หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ประมาณ ๑๕ นาที แล้วทำการดูดสารละลายส่วนบนที่มีตะกอนโอโอซีสต์ลอยตัวอยู่ใส่ในหลอดทดลองหลอดใหม่ เทน้ำกลั่นใส่ลงไปแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว ๑,๖๑๐ × g เป็นเวลา ๕ นาที แล้วเทน้ำใสส่วนบนทิ้ง ทำซ้ำขั้นตอนนี้ ๓ ครั้ง เพื่อล้างเอาสารละลายน้ำตาลและเกลือออกจากตะกอนโอโอซีสต์ หลังจากนั้นทำการเติมสารละลายโพแทสเซียมไดโครเมตร ความเข้มข้น ๒.๕ เปอร์เซ็นต์ (๒.๕% $K_2Cr_2O_7$) ลงไปเขย่าให้ตะกอนภายในหลอดกระจายตัวแล้วเทใส่จานแก้วขนาดใหญ่ เก็บไว้ที่อุณภูมิ ๒๕ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๗๒ ชั่วโมง เพื่อทำให้โอโอซีสต์แบ่งตัวพัฒนาเป็น sporulated oocyst แล้วเก็บรักษาไว้ในขวดแก้วที่มีฝาปิด

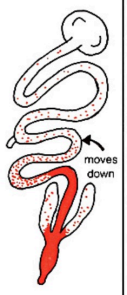
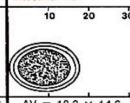
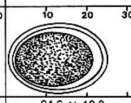
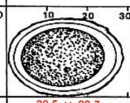
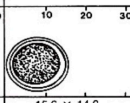
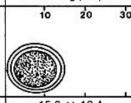
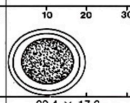
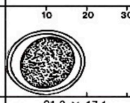
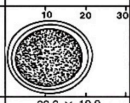
และเก็บในตู้เย็น ๔ องศาเซลเซียส สำหรับใช้เป็น stock หลังจากนั้นก็ตรวจนับจำนวน sporulated oocysts จาก stock ของเชื้อบิด ที่เก็บไว้ใน ๒.๕% $K_2Cr_2O_7$ โดยใช้ McMaster chamber เพื่อหาจำนวนโอโอซีสต์ต่อปริมาตร ๑ มิลลิลิตร ในสารละลาย ๒.๕% $K_2Cr_2O_7$ ก่อนที่จะนำไปศึกษาทางพยาธิวิทยาและจำแนกชนิดของเชื้อบิดโดยวิธี multiplex PCR ให้นำโอโอซีสต์ตามจำนวนที่ต้องการใช้มาปั่นล้างด้วยน้ำกลั่น ๓ ครั้ง เพื่อเอาสารละลาย ๒.๕% $K_2Cr_2O_7$ ออก

๓. การจำแนกชนิดของเชื้อบิด

๓.๑ การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ (morphology)

ทำการวัดขนาด บันทึกรูปร่าง ของโอโอซีสต์ที่ตรวจเจอในข้อ ๒.๑ แล้วนำไปเปรียบเทียบเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อบิดที่พบแบบคร่าว ๆ โดยอ้างอิงจากตารางที่ ๑ (Peek, ๒๐๑๐)

ตารางที่ ๑ ตารางเปรียบเทียบคุณลักษณะที่แตกต่างกันของเชื้อบิดที่ก่อโรคในไก่ (Diagnostic characteristics of *Eimeria* spp. in chicken) (Peek, ๒๐๑๐)

DIFFERENTIAL CHARACTERISTICS FOR 9 SPECIES OF CHICKEN COCCIDIA ◉ — DIAGNOSTIC CHARACTERISTICS IN RED									SPECIES OF DOUBTFUL VALIDITY
CHARACTERISTICS	*E. acervulina*	*E. brunetti*	*E. maxima*	*E. mitis* †	*E. mivati* ‡	*E. necatrix*	*E. praecox*	*E. tenella*	*E. hagani*
ZONE PARASITIZED									
MACROSCOPIC LESIONS	light infection: whitish round lesions sometimes in ladder-like streaks heavy infection: plaques coalescing, thickened intestinal wall	coagulation necrosis mucoid, bloody enteritis in lower intestine	thickened walls, mucoid, blood - tinged exudate, petechiae	no discrete lesions in intestine, mucoid exudate	light infection: rounded plaques of oocysts heavy infection: thickened walls coalescing plaques	ballooning, white spots (schizonts), petechiae, mucoid blood - filled exudate	no lesions, mucoid exudate	onset: hemorrhage into lumen later: thickening, whitish mucosa, cores clotted blood	pinhead hemorrhages petechiae
MILLIMICRONS OOCYSTS REDRAWN FROM ORIGINALS									non available
LENGTH × WIDTH μ LENGTH = WIDTH =	AV = 18.3 × 14.6 17.7 - 20.2 13.7 - 16.3	24.6 × 18.8 20.7 - 30.3 18.1 - 24.2	30.5 × 20.7 21.5 - 42.5 16.5 - 29.8	15.6 × 14.2 11.7 - 18.7 11.0 - 18.0	15.6 × 13.4 11.1 - 19.9 10.5 - 16.2	20.4 × 17.2 13.2 - 22.7 11.3 - 18.3	21.3 × 17.1 19.8 - 24.7 15.7 - 19.8	22.0 × 19.0 19.5 - 26.0 16.5 - 22.8	19.1 × 17.6 15.8 - 20.9 14.3 - 19.5
OOCYST SHAPE AND INDEX-LENGTH/WIDTH	ovoid 1.25	ovoid 1.31	ovoid 1.47	subspherical 1.09	ellipsoid to broadly ovoid 1.16	oblong ovoid 1.19	ovoidal 1.24	ovoid 1.16	broadly ovoid 1.08
SCHIZONT, MAX IN MICRONS	10.3	30.0	9.4	15.1	17.3	65.9	20	54.0	
PARASITE LOCATION IN TISSUE SECTIONS	epithelial	2nd generation schizonts subepithelial	gametocytes subepithelial	epithelial	epithelial	2nd generation schizonts subepithelial	epithelial	2nd generation schizonts subepithelial	epithelial
MINIMUM PREPATENT PERIOD-HR	97	120	121	93	93	138	83	115	99
SPORULATION TIME MINIMUM (HR)	17	18	30	15	12	18	12	18	18

๓.๒ การศึกษาทางพยาธิวิทยา (pathology)

นำโอโอซีสต์ที่ได้จากขั้นตอน ๒.๒ มาใช้ในการป้อนไก่ทดลองที่มีอายุ ๑ สัปดาห์ จำนวน ๑๕ ตัว เพื่อศึกษาตำแหน่งและลักษณะของรอยโรคทางพยาธิวิทยา (pathology) ที่เกิดขึ้น โดยทำการป้อนโอโอซีสต์ ปริมาณ ๓,๐๐๐ โอโอซีสต์ต่อไก่ ๑ ตัว หลังจากป้อนเชื้อบิดเป็นเวลา ๗ วัน ก็ทำการ Euthanized ไก่ตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง โดย euthanized ด้วยวิธีฉีดแอลกอฮอล์เข้าบริเวณกระดูกข้อต่อคอหรือสมองไก่ ทำความสะอาดตัวไก่ด้วย ๗๐% แอลกอฮอล์

ต่อจากนั้นผ่าเปิดบริเวณช่องท้องนำเฉพาะลำไส้และไส้ตันออกมา แล้วทำการแบ่งลำไส้ออกเป็น ๒ ส่วน โดยแบ่งครึ่งบริเวณรอยเหลือของถุงไข่แดง แล้วแบ่งครึ่งลำไส้แต่ละส่วนอีกครั้ง ดังนั้นจะได้ลำไส้ทั้งหมด ๕ ส่วน คือ ลำไส้ส่วนต้น ๑ ส่วน ลำไส้ส่วนกลาง ๒ ส่วน ลำไส้ส่วนท้าย ๑ ส่วน และไส้ตัน ๑ ส่วน โดยนำลำไส้แต่ละส่วนมาตรวจหารอยโรคและขูดเนื้อเยื่อจากผนังลำไส้มาตรวจหาโอโอซีสต์ด้วยวิธี sugar centrifugal flotation

๓.๓ การจำแนกชนิดของเชื้อบิดโดยวิธี multiplex PCR

สกัด DNA จากโอโอซีสต์ของเชื้อบิด โดยนำตัวอย่างจากข้อ ๒.๒ มา ๑ มิลลิลิตร และเติม glass beads ขนาด ๕๐๐ ไมโครเมตร ในอัตราส่วน ๑:๑ (สารละสายโอโอซีสต์ ๑ ส่วน: glass beads ๑ ส่วน) แล้วนำไป vortex เพื่อทำให้ผนังโอโอซีสต์แตกจากนั้นนำสารละลายโอโอซีสต์มาสกัด DNA โดยใช้ InstaGene™ Matrix DNA extraction kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., California, United states) ตามขั้นตอนและวิธีการที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิตชุด kit จากนั้นนำ DNA ที่สกัดได้มาทำ multiplex PCR โดยในหลอด PCR ประกอบไปด้วย ๑๐๐ นาโนกรัมของ DNA template, ๐.๒ มิลลิโมลของ dNTP แต่ละตัว, ๑ ไมโครโมลของ forward primer และ ๐.๕ ไมโครโมลของ reverse primer แต่ละตัว (รายละเอียดของ primer ที่ใช้จะแสดงไว้ในตารางที่ ๒), ๐.๐๒๕ U ของ Ex Tag polymerase (TaKaRa Ex Taq®, Takara Bio, Shiga, Japan) และ reaction buffer ที่บริษัทผู้ผลิตให้มา โปรแกรม PCR ประกอบด้วยขั้นตอน Initial PCR activation ที่ ๙๕ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๐ นาที จำนวน ๑ รอบ หลังจากนั้นเข้าสู่วงรอบของการทำ PCR ที่ทำซ้ำ ๓๐ รอบ ดังนี้ ขั้นตอน Denaturation ๙๘ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๐ วินาที ขั้นตอน Annealing ๕๒.๕ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๓๐ วินาที ขั้นตอน Extention ๗๒ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑ นาที และขั้นตอน final extension ๗๒ องศาเซลเซียส ๑ นาที แล้วคงอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์ PCR ไว้ที่ ๔ องศาเซลเซียส (You, ๒๐๑๔) ต่อจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปวิเคราะห์ โดยวิธี ๑.๕% agarose gel electrophoresis และ TAE buffer (Tris-acetic-EDTA buffer) ที่ความต่างศักดิ์ ๑๐๐ โวลต์ นาน ๓๐ นาที โดยย้อม DNA ด้วย ethidium bromide และถ่ายรูปภายใต้รังสีอัลตร้าไวโอเลต

ตารางที่ ๒ Forward และ Reverse ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ multiplex PCR (You, ๒๐๑๔)

Primer	Oligonucleotide sequence (๕'-๓')	Amplicon size (bp)	Specify
Forward	GTTGCGTAAATAGAGCCCTCT		*Eimeria* spp.
Reverse	ACCAATGCAGAACGCTCCAG	๑๕๒ bp	*Eimeria maxima*
	CAAAAGGTGGCAATGATGCT	๒๘๑ bp	*Eimeria acervulina*
	GTTCCAAGCAGCATGTAACG	๕๕๔ bp	*Eimeria tenella*
	GATCAGTCTCATCATAATTCTCGCG	๔๕๐ bp	*Eimeria necatrix*

bp = base pairs

๓.๔ การ purification ของเชื้อบิดแต่ละชนิดที่จำแนกได้โดยวิธี single-oocyst isolation

นำตัวอย่างจากข้อ ๒.๒ มาทำให้เจือจางกับน้ำกลั่นให้มีปริมาณ ๒๐๐ โอโอซีสต์ต่อ ๑ มิลลิลิตร จากนั้นก็เทสารละลายเจลที่ความเข้มข้น ๒% ลงบนแผ่นสไลด์แก้วให้ทั่วแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา ๑๐ นาทีให้เจลแข็งตัว จากนั้นก็หยดสารละลายโอโอซีสต์ที่ทำการเจือจางไว้ปริมาตร ๑๐๐ ไมโครลิตร ลงบนชั้นเจล และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนสารละลายโอโอซีสต์หยุดลอยตัว หลังจากนั้นนำสไลด์แก้วไปส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างที่กำลังขยาย ๑๐x และ ๔๐x จากนั้นทำการตัดแยกโอโอซีสต์มาเพียง ๑ โอโอซีสต์ แล้วนำไปป้อนให้ไก่ทดลองอายุ ๑ สัปดาห์ จำนวน ๑๕ ตัว เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณโอโอซีสต์ หลังจากป้อนเชื้อบิดเป็นเวลา ๗ วัน ก็ทำการ Euthanized ไก่ ตามที่ได้อธิบายไปแล้วในข้อ ๓.๒ จากนั้นทำการเก็บโอโอซีสต์จากลำไส้แต่ละส่วนของไก่มาทำตามขั้นตอนในข้อ ๒.๒ ตามด้วยขั้นตอนการจำแนกชนิดของเชื้อบิดโดยวิธี multiplex PCR ที่ได้กล่าวไปแล้วในข้อ ๓.๓

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

๑. การตรวจหาโอโอซีสต์ด้วยวิธี sugar centrifugal flotation

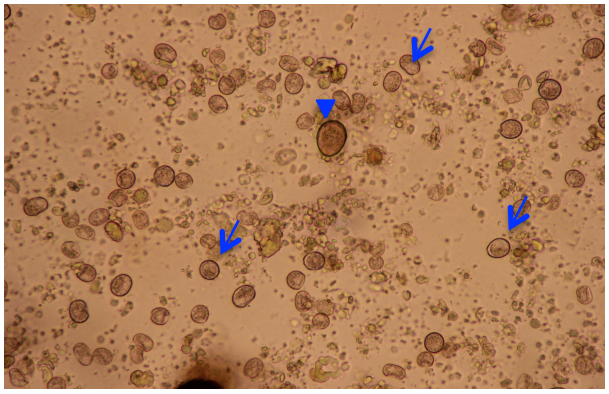
ผลจากการตรวจอุจจาระจำนวน ๑๕๘ ตัวอย่างจากฟาร์มไก่เนื้อ ไก่ไข่ ในเขตพื้นที่ต่าง ๆ จำนวน ๘ ฟาร์ม พบโอโอซีสต์ของเชื้อบิดจำนวน ๓๔ ตัวอย่าง ซึ่งรายละเอียดของผลการตรวจแสดงในตารางที่ ๓

ฟาร์ม	ผลการตรวจ[a]
ควนดินแดง	๐/๒๕
พรุบัว	๐/๓๕
ร่อนพิบูลย์	๐/๑๖
ทุ่งสัง	๑๒/๑๘
ท่ายาง	๑๒/๑๒
จันดี	๐/๒๔
นาบอน	๑๐/๒๕
ปากพนัง	๐/๓

[a] จำนวนตัวอย่างที่ตรวจเจอโอโอซีสต์/จำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่ตรวจ

๒. การจำแนกชนิดของเชื้อบิดโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ (morphology)

ทำการวัดขนาด บันทึกรูปร่าง ของโอโอซีสต์ที่ตรวจเจอ (ภาพที่ ๑) ซึ่งเมื่อแยกกลุ่มตามขนาดของโอโอซีสต์จะสามารถแยกได้เป็น โอโอซีสต์ขนาดกลางมีขนาด (กว้าง x ยาว) เฉลี่ยเท่ากับ ๑๘.๖ x ๒๔.๙ ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของโอโอซีสต์ชนิด *E. tenella, E. necatrix* และ *E. brunetti E.* และโอโอซีสต์ขนาดเล็กมีขนาด (กว้าง x ยาว) เฉลี่ยเท่ากับ ๑๔.๖ x ๑๗.๘ ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของโอโอซีสต์ชนิด *E. acervulina, E. mivati* และ *E. mitis* (Peek, ๒๐๑๐)



ภาพที่ ๑ แสดงรูปร่างขนาดและลักษณะของโอโอซีสต์ที่ตรวจเจอที่กำลังขยาย ๒๐๐X หัวลูกศรแสดงโอโอซีสต์ขนาดกลาง ลูกศรแสดงโอโอซีสต์ขนาดเล็ก

๓. การจำแนกชนิดของเชื้อบิดโดยการศึกษาทางพยาธิวิทยา (pathology)

พบรอยโรคที่เป็นจุดสีขาวเรียงตามขวางลักษณะเหมือนขั้นบันไดตรงบริเวณเยื่อบุผิวของลำไส้เล็กส่วนต้นตั้งแต่ duodenal loop ลงมา (ภาพที่ ๒) นอกจากนั้นยังพบว่ามีจุดเลือดออกที่บริเวณผนังของไส้ตัน (caecum) พบการหนาตัวขึ้นของผนังของไส้ตันและพบ caecal core (ภาพที่ ๓) ซึ่งจากตำแหน่งและลักษณะของรอยโรคที่พบสามารถที่จะจำแนกชนิดของเชื้อบิดได้เป็นเชื้อ *E. acervulina* ซึ่งจะทำให้เกิดรอยโรคที่บริเวณลำไส้เล็กส่วนต้น และ *E. tenella* ซึ่งจะทำให้เกิดรอยโรคที่บริเวณไส้ตัน (มานพ, ๒๕๔๕)

จากการศึกษาการพัฒนา endogenous stage ของเชื้อภายในเซลล์ลำไส้ส่วนต่าง ๆ โดยวิธี histophathology พบว่ามีเชื้ออยู่ในลำไส้ ๒ ส่วนคือที่ลำไส้เล็กส่วนต้นและไส้ตัน โดยที่บริเวณ epithelium ของลำไส้เล็กส่วนต้น ที่เวลา ๒๔ ๗๒ ๙๖ และ ๑๒๐ ชั่วโมง หลังจากป้อนเชื้อจะพบระยะ trophozoites, immature schizont, gametocytes และ oocyst ตามลำดับ และที่บริเวณ epithelium ของไส้ตันที่เวลา ๔๘ ๙๖ และ ๑๒๐ ชั่วโมง หลังจากป้อนเชื้อจะพบระยะ trophozoites, gametocytes และ oocyst ตามลำดับ (ตารางที่ ๔)

ภาพที่ ๒ แสดงลักษณะของจุดสีขาว เรียงตามขวางเหมือนขั้นบันไดบริเวณ duodenal loop

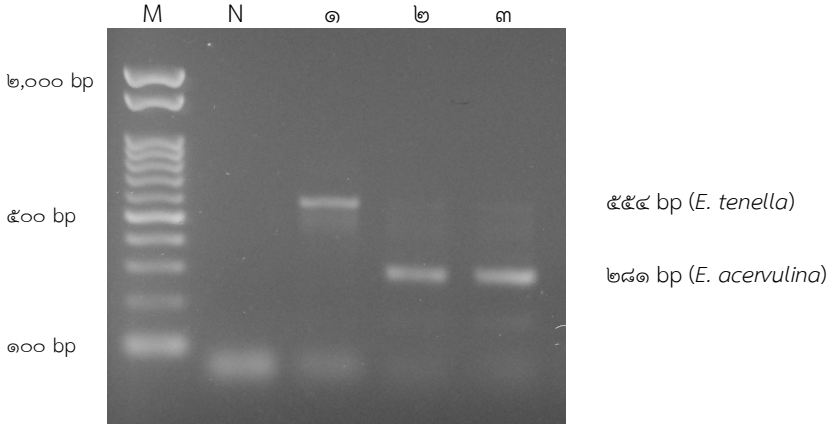
ภาพที่ ๓ แสดงจุดเลือดออก cecal core และการหนาตัวขึ้นของผนังลำไส้ส่วน caecum

ตารางที่ ๔ การพัฒนาของ endogenous stage ของเชื้อบิดภายในเซลล์ลำไส้ส่วนต่าง ๆ

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	การพัฒนาที่พบ				
	Duodenum	Proximal jejunum	Distal jejunum	Ileum	Caecum
๒๔	Trophozoites	-	-	-	
๔๘	Trophozoites	-	-	-	Trophozoites
๗๒	Immature schizont	-	-	-	Trophozoites
๙๖	Macrogametocytes	-	-	-	Macrogametocytes
๑๒๐	Oocyst	-	-	-	Oocyst
๑๔๔	Oocyst	-	-	-	Oocyst
๑๖๘	Oocyst	-	-	-	Oocyst

๔. การจำแนกชนิดของเชื้อบิดโดยวิธี multiplex PCR

จากผลการตรวจโอโอซีสต์ขนาดกลางด้วยวิธี multiplex PCR พบ PCR product ขนาด ๕๕๔ เบส ซึ่งตรงกับลำดับเบสของ *E. tenella* ส่วนผลการตรวจของโอโอซีสต์ขนาดเล็ก พบ PCR product ขนาด ๒๘๑ เบส ซึ่งตรงกับลำดับเบสของ *E. acervulina* (ภาพที่ ๔)



ภาพที่ ๔ Gel electrophoresis การตรวจพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *E. tenella* และ *E. acervulina* ด้วยวิธี multiplex PCR โดย M คือ marker ขนาด ๑๐๐ bp N คือ negative control และ ๑ คือตัวอย่าง oocyst ขนาดกลาง ๒ และ ๓ คือตัวอย่าง oocyst ขนาดเล็ก

สรุปผลการวิจัย

๑. จากผลการตรวจหาโอโอซีสต์ของเชื้อบิดในไก่ในพื้นที่จังหวัดนครศรีธรรมราชนั้นเป็นการติดเชื้อแบบ multiple infection เพราะเมื่อทำการจำแนกชนิดของเชื้อบิด โดยการวัดขนาด บันทึกรูปร่างของโอโอซีสต์ที่พบ พบว่ามีโอโอซีสต์ ๒ ขนาดคือ ขนาดเล็กมีขนาดเฉลี่ย กว้าง x ยาว เท่ากับ ๑๔.๖ x ๑๗.๘ ไมโครเมตร และขนาดกลางมีขนาดเฉลี่ย กว้าง x ยาว เท่ากับ ๑๘.๖ x ๒๔.๙ ไมโครเมตร ซึ่งโอโอซีสต์ขนาดเล็กที่พบนั้นมีขนาดใกล้เคียงกันกับขนาดของโอโอซีสต์ของเชื้อ *E. acervulina*, *E. mitis*, และ *E. mivati* ส่วนโอโอซีสต์ขนาดกลางที่พบนั้นมีขนาดใกล้เคียงกันกับขนาดของโอโอซีสต์ ชนิด *E. tenella* และ *E. brunetti* แต่การจะยืนยันว่าเป็นเชื้อบิดชนิดใดนั้นควรมีการพิจารณาองค์ประกอบอื่น ๆ ร่วมด้วยเช่น รอยโรคทางพยาธิวิทยา (pathology) ที่เกิดขึ้นจากเชื้อบิดบริเวณลำไส้ทั้ง ๔ ส่วน

๒. จากผลการศึกษาการจำแนกเชื้อบิดที่พบทางพยาธิวิทยาพบว่าเชื้อบิดที่พบในการศึกษาในครั้งนี้ทำให้เกิดรอยโรคบริเวณลำไส้เล็กส่วนต้นและไส้ตัน ซึ่งเมื่อจำแนกจากตำแหน่งและลักษณะของรอยโรคที่พบสามารถที่จะจำแนกชนิดของเชื้อบิดได้เป็น เชื้อ *E. acervulina* ซึ่งจะทำให้เกิดรอยโรคที่บริเวณลำไส้เล็กส่วนต้น และ *E. tenella* ซึ่งจะทำให้เกิดรอยโรคที่บริเวณไส้ตัน

๓. ผลการตรวจด้วยวิธี multiplex PCR ยืนยันพบสารพันธุกรรมของเชื้อ *E. tenella* และ *E. acervulina*

บรรณานุกรม

มานพ ม่วงใหญ่. ๒๕๔๕. **วิทยาสัตว์เซลล์เดียวทางสัตวแพทย์.** พิมพ์ครั้งที่ ๒. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

Allen, P. C. and Fetterer, R. H. 2002. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. **Clinical Microbiology** 15:58–65.

Aziz, A. E., Orma, O. A., Awadin, W. F. and Seady, Y. E. L. 2016. Effects of supplementation of broiler diets with fish oil and linseed oil on growth performance, cytokine, and cecal histopathological changes in broiler chicken infected by Eimeria tenella. **International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine** 4:12–27.

Carvalho, F. S., Wenceslau, A. A., Teixeira, M. and Albuquerque, G. R. 2011. Molecular diagnosis of *Eimeria* species affecting naturally infected *Gallus gallus*. **Genetics and Molecular Research**. 10:996–1005.

Fernandez, S., Pagotto, A. H., Furtado, M. M., Katsuyama, A. M., Madeira, A. M. and Gruber, A. 2003. A multiplex PCR assay for the simultaneous detection and discrimination of the seven *Eimeria* species that infect domestic fowl. **Parasitology** 127:317–325.

Frölich, S., Farhat, J. and Wallach, M. 2013. Designing strategies for the control of coccidiosis in chickens on poultry farms using modern diagnostic tools. Reports in **Parasitology** 3:1–10.

Gasser, R. B., Woods, W. G., Wood, J. M., Ashdown, L., Richards, G. and Whithear, K.G. 2001. Automated, fluorescence-based approach for the specific diagnosis of chicken coccidiosis. **Electrophoresis** 22:3546–3550.

Hafez, H.M. 2008. Poultry coccidiosis: Prevention and control approach. **European Poultry Science** 72:2–7.

Haug, A., Thebo, P. and Mattsson, J. G. 2007. A simple protocol for molecular identification of *Eimeria* species in field samples. **Veterinary Parasitology** 146:35–45.

Johnson, J. and Reid, W.M. 1970. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. **Experimental Parasitology** 28:30–36.

Kawahara, F., Zhang, G., Suzuki, T., Iwata, A. and Nagamune, K. 2014. Characterization of *Eimeria brunetti* isolated from a poultry farm in japan. **The Journal of Veterinary Medical Science** 76:25–29.

Kumar, S., Garg, R., Moftah, A., Clark, E. L., Macdonald, S. E., Chaudhry, A. S., Sparagano, O., Banerjee, P. S., Kundu, K., Tomley, F. M., Blake, D. P. 2014. An optimized protocol for molecular identification of *Eimeria* from chickens. **Veterinary Parasitology** 199:24–31.

Lew, A. E., Anderson, G. R., Minchin, C. M., Jeston, P. J. and Jorgensen, W. K., 2003. Inter- and intra-strain variation and PCR detection of the internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences of Australian isolates of *Eimeria* species from chickens. **Veterinary Parasitology** 112:33–50.

Lien, Y. Y., Sheu, S. C., Liu, H. J., Chen, S. C., Tsai, M. Y., Luo, S. C., Wu, K. C., Liu, S. S. and Su, H. Y. 2007. Cloning and nucleotide sequencing of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA for three species of *Eimeria* from chickens in Taiwan. **The Veterinary Journal** 173:186–191.

Long, P.L. and Joyner, L.P. 1984. Problems in the identification of species of *Eimeria*. **Journal of Protozoology** 31:535–541.

Molloy, J. B., Eaves, F. W., Jeston, P. J., Minchin, C. M., Stewart, N. P., Lew, A. E. and Jorgensen, W.K. 1998. Detection of *Eimeria acervulina* using the polymerase chain reaction. **Avian Diseases** 42:119–123.

Peek, H. W. 2010. Resistance to anticoccidial drugs: alternative strategies to control coccidiosis in broilers. Dissertation, Utrecht University, pp 12.

Quiroz-Castañeda, R. E. and Dantán-González, E. 2015. Control of avian coccidiosis: future and present natural alternatives. **BioMed Research International** 2015:http://dx.doi.org/10.1155/2015/430610.

Schnitzler, B. E., Thebo, P., Tomley, F., Uggla, A. and Shirley, M. W. 1999. PCR identification of chicken *Eimeria*: a simplified read-out. **Avian Pathology** 28:89–93.

Stucki, U., Braun, R. and Roditi, I. 1993. *Eimeria tenella*: characterization of a 5S ribosomal RNA repeat unit and its use as a species- specific probe. **Experimental Parasitology** 76:68–75.

Su, Y. C., Fei, A. C. and Tsai, F. M. 2003. Differential diagnosis of five avian

Eimeria species by polymerase chain reaction using primers derived from the internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequence. **Veterinary Parasitology** 117: 221–227.

Tsuji, N., Kawazu, S., Ohta, M., Kamio, T. Isobe, T. Shimura K. and Fujisaki, K. 1997. Discrimination of eight chicken *Eimeria* species using the two-step polymerase chain reaction. **Journal of Parasitology** 83:966–970.

Vrba, V., Poplstein, M. and Pakandl, M. 2011. The discovery of the two types of small subunit ribosomal RNA gene in *Eimeria mitis* contests the existence of *E. mivati* as independent species. **Veterinary Parasitology** 183:47–53.

Woods, W. G., Whithear, K. G., Richards, D. G., Anderson, G. R., Jorgensen, W. K. and Gasser, R. B. 2000. Single-strand restriction fragment length polymorphism analysis of the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) for six species of *Eimeria* from chickens in Australia. **International Journal for Parasitology** 30:1019–1023.

You, M. J. 2014. Detection of four important *Eimeria* species by multiplex PCR in a single assay. **Parasitology International** 63:527–532.