นิพนธ์ต้นฉบับ

การวิเคราะห์ยีน 18S rRNA เพื่อพัฒนาเทคนิค PCR-RFLP ในการแยกชนิดโอโอซีสต์ของเชื้อบิด *Eimeria* spp. ในไก่

ศิลมน ชูศักดิ์แสงทอง วรพร สุขุมาวาสี สุดจิตต์ จุ่งพิวัฒน์ นารีรัตน์ วิเศษกุล*

Abstract

Silamon Choosaksangthong Woraporn Sukhumavas Sudjit Chungpivat Nareerat Viseshakul*

THE CHARACTERIZATION OF THE 18S rRNA GENE USING A PCR-RFLP IN ORDER TO DEVELOP A DIFFERENTIAL DIAGNOSTIC TOOL FOR AVIAN *EIMERIA* SPP.

Avian coccidiosis is a protozoan disease which can be caused by at least 7 species of the genus *Eimeria*. Species of *Eimeria* in chicken are distinguished by their distinct morphology and where sites the parasotes are deposited in the small intestine of the infected birds. The criteria for *Eimeria* species differentiation when the disease occures is sometimes unreliable. Based on 422 base pairs derived from the 3 prime-region of the 18S rRNA gene, containing polymorphic DNA sequences of *Eimeria*, the technique of PCR-RFLP (Polymerase chain reaction and Restriction fragment length polymorphisms) has been developed to identify species-specific DNA profiles of *Eimeria acervulina, E. maxima, E. necatrix and E. tenella.* PCR-RFLP can differentiate between *Eimeria* species containing in the isolate, *Eimeria* CB38 identifying at least 3 species; *E. maxima, E. necatrix* and *E. tenella. Eimeria* CB38 is an isolate from chicken coccidiosis collected from Cholburi, a province of Thailand, which had never been indentified prior to this study. *Eimeria in Immucox*®(I), the live-attenuated vaccine, were also used as controls in this study. The PCR sensitivity for *Eimeria* CB38 was at 0.12 oocysts and the PCR-RFLP sensitivity was at 8 oocysts. The molecular diagnosis of the 18S rRNA gene characterization of *Eimeria* spp. has proven to be useful in identifying at least 4 of the 7 species of chicken *Eimeria*.

Keywords : *Eimeria* spp., Oocysts, PCR-RFLP, 18S rRNA gene

Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Patumwan, Bangkok 10330. Thailand.
***Corresponding author**
หน่วยปรสิตวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
*ผู้รับผิดชอบบทความ

บทคัดย่อ

ศิลมน ชูศักดิ์แสงทอง วรพร สุขุมาวาสี สุดจิตต์ จุ่งพิวัฒน์ นารีรัตน์ วิเศษกุล*

การวิเคราะห์ยีน 18S rRNA เพื่อพัฒนาเทคนิค PCR-RFLP ในการแยกชนิดโอโอซีสต์ของเชื้อบิด *Eimeria* spp. ในไก่

โรคบิดในไก่ เป็นโรคโปรโตซัวที่มีสาเหตุมาจากเชื้อบิดอย่างน้อย 7 ชนิด ของสกุล *Eimeria* โดยทั่วไปพื้นฐานของการตรวจแยกชนิดเชื้อบิดในไก่เป็นการแยกจากลักษณะรูปร่างของเชื้อบิดและบริเวณตำแหน่งการก่อโรคในลำไส้เล็กของไก่ที่ติดเชื้อบิด ซึ่งจากหลักการนี้พบว่าการตรวจแยกความแตกต่างชนิดของเชื้อบิดในบางครั้งให้ผลไม่น่าเชื่อถือ จึงได้มีการนำเทคนิค PCR-RFLP หรือ Polymerase chain reaction and Restriction fragment length polymorphisms มาแยกเชื้อบิดโดยใช้บริเวณ 3 ไพรม์ ของ 18S rRNA gene ซึ่งเป็นบริเวณที่แสดงความหลากหลายของเชื้อบิดชนิดต่างๆ โดยมีผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 422 bp ในการศึกษาครั้งนี้ได้มีการพัฒนาเทคนิคขึ้นเพื่อนำมาใช้ในการแยกความจำเพาะของเชื้อบิด ได้แก่ *Eimeria acervulina, E. maxima, E. necatrix* และ *E. tenella* พบว่าเทคนิค PCR-RFLP สามารถแยกความแตกต่างชนิดของเชื้อบิดจาก *Eimeria* CB38 ที่ได้จากไก่จังหวัดชลบุรีของประเทศไทยที่ยังไม่เคยมีการนำมาแยกเชื้อบิดมาก่อน ได้ 3 ชนิด คือ *E. maxima, E. necatrix* และ *E. tenella* โดยนำเชื้อบิดจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox®(I) มาใช้เป็นเชื้อบิดกลุ่มควบคุม โดยเทคนิค PCR ให้ความไวที่ทดสอบได้จาก *Eimeria* CB38 อยู่ที่ 0.12 โอโอซีสต์ และความไวของเทคนิค PCR-RFLP อยู่ที่ 8 โอโอซีสต์ ดังนั้นเทคนิค PCR-RFLP ที่ใช้ในการศึกษานี้ สามารถนำไปใช้แยกชนิดเชื้อบิด ที่มีความแตกต่างของลำดับเบสของ 18S rRNA gene ได้อย่างน้อย 4 ชนิด

คำสำคัญ : อัยเมอเรีย สปีชีย์ โอโอซีสต์ พีซีอาร์ อาร์เอฟแอลพี 18เอส อาร์อาร์เอ็นเอ ยีน

บทนำ

โรคบิดในไก่ (Coccidiosis) เป็นโรคสำคัญในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ที่ก่อให้เกิดผลเสียต่อเศรษฐกิจไปทั่วโลก โดยเชื้อบิดที่พบได้บ่อยครั้งมี 7 ชนิด คือ *E. acervulina, E. brunetti, E. maxima, E. mitis, E. necatrix, E. praecox* และ *E. tenella* (Williams, 1998) ในจำนวนนี้ เชื้อบิดชนิดที่มีความสำคัญและก่อให้เกิดโรครุนแรงมากที่สุดมีอยู่ด้วยกัน 4 ชนิด เรียงลำดับตามความสำคัญและความรุนแรงที่ก่อให้เกิดโรคในไก่ ได้แก่ *E. tenella, E. acervulina, E. necatrix* และ *E. maxima* ตามลำดับ (Roberson, 1995) ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยแยกชนิดเชื้อบิดจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อตรวจหาชนิดของเชื้อบิดที่เป็นสาเหตุที่แท้จริงของการเกิดโรคบิด แต่เนื่องจากวิธีการตรวจวินิจฉัยที่นิยมปฏิบัติกันอยู่ไม่ว่าจะเป็นการอ่านตำแหน่งรอยโรคที่ลำไส้ของไก่ที่ติดเชื้อบิด การตรวจแยกชนิดเชื้อบิดตามขนาดของ oocyst และการวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยาของผนังลำไส้ไก่ที่ติดเชื้อบิด (Mattiello et al., 2000) บ่อยครั้งพบว่าผลการตรวจวินิจฉัยให้ผลไม่น่าเชื่อถือ อาจคลาดเคลื่อนได้เนื่องจากเชื้อบิดบางชนิด เช่น oocyst ของเชื้อ *E. tenella* ที่มีรูปร่างและขนาดเท่ากันกับ oocyst ของเชื้อ *E. necatrix* รวมทั้งพยาธิสภาพของเชื้อทั้งสองยังคล้ายคลึงกันและไม่สามารถแยกได้ด้วยการอ่านตำแหน่งรอยโรคที่ลำไส้อีกด้วย (Barta et al., 1997) จึงจำเป็นต้องอาศัยผู้มีความชำนาญสูงในการอ่านพยาธิสภาพเพื่อบอกชนิดของเชื้อได้อย่างถูกต้องแม่นยำ (Long and Joyner, 1984) ดังจะเห็นได้จากการศึกษาของ Idris และคณะ (1997) พบว่าการตรวจวัดขนาดของ oocyst ด้วยกล้องจุลทรรศน์และการให้คะแนนรอยโรคบิดไม่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณและชนิดของเชื้อบิดที่ตรวจพบที่บริเวณลำไส้เล็กในไก่ ซึ่งการให้คะแนนรอยโรคนั้นเป็นการประเมินการติดเชื้อบิดได้ต่ำกว่าการติดเชื้อบิดจริง นอกจากนี้ปัญหาการตรวจวินิจฉัยแยกชนิดของโรคบิดไก่ยังสับสน ในกรณีที่ oocyst ของเชื้อบิดที่สงสัย มีขนาดที่ไม่แตกต่างกัน ด้วยข้อจำกัดของการตรวจวินิจฉัยดังกล่าวข้างต้น ในระยะเวลาหลายปีมานี้ จึงมีการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยแยกชนิดเชื้อบิดหลายวิธีด้วยกัน อาทิ การอาศัยความแตกต่างของเอ็นไซม์ในเชื้อบิด

ได้แก่วิธี Enzyme Electrophoresis (Shirley, 1975; Chapman, 1982.; Kucera, 1991; Johnston and Fernando, 1997) และเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ เช่น เทคนิค Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) (Shirley et al., 1990; Fernando and Pasternak, 1991; Shirley, 1994) เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) (Stucki, et al., 1993) เทคนิค Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD-PCR) (Guo and Johnson, 1995; Johnston and Fernando, 1995; Costa et al., 2001) และเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เป็นต้น (Shirley, 1997)

การศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้เลือกใช้เทคนิค PCR-RFLP ในการตรวจแยกชนิดเชื้อบิด ที่บริเวณ 18S ribosomal RNA gene เพราะยีนนี้สามารถบ่งชี้ถึงสายพันธ์ของเชื้อบิดชนิด *Eimeria* ได้ โดยมีความไวและความจำเพาะสูง ในการนำมาใช้เป็นวิธีสำหรับการตรวจวินิจฉัยโรค (Sangster et al., 2002) ซึ่งจากการศึกษาของ Jinnemen และคณะ (1996) ในการแยกชนิด *Cyclospora* spp. กับ *Eimeria* spp. ในไก่ ด้วยทคนิค PCR-RFLP โดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *MnI* I ที่บริเวณ 18S rRNA gene ซึ่งเชื้อบิดในไก่ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีด้วยกัน 2 ชนิด คือ *E. tenella* 3 สายพันธุ์ และ *E. mitis* 1 สายพันธุ์ พบว่าวิธีนี้ สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *Cyclospora* spp. กับ Eimeria spp. ได้ แต่ไม่สามารถแยกระหว่าง *E. tenella* 3 สายพันธุ์ กับ *E. mitis* 1 สายพันธุ์ ได้รวมทั้งการศึกษาของ Woods และคณะ (2000) พบว่าสามารถใช้ความหลากหลายของ ITS-2 (Internal transcribed spacer-2) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่แยกชนิดเชื้อบิดได้ด้วยเอนไซม์ *Cfo* l, *Sau* 3AI และ *Taq* I ในการแยกชนิดเชื้อบิด *E. acervulina, E. brunetti, E. maxima, E. necatrix, E. praecox* และ *E. tenella* ดังนั้นจุดประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อพัฒนาวิธีการแยกชนิดเชื้อบิด ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ที่บริเวณ 18S rRNA gene ของเชื้อ *Eimeria* เพื่อเป็นประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยแยกชนิดเชื้อบิดอื่นๆ ในไก่หรือในสัตว์อื่นๆ ต่อไปในอนาคต

วัสดุและวิธีการ

เชื้อบิด

เชื้อบิดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ *Eimeria* CB38 ที่เก็บไว้ที่หน่วยปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ.2538 และ วัคซีนเชื้อเป็น Immucox®(I) (Fort Dodge, USA) เชื้อ *Eimeria* CB38 เป็นเชื้อบิดที่ได้จากการขูดเก็บบริเวณไส้ตันของไก่ที่ติดเชื้อ หลังจากนั้นทำให้ oocyst กลายเป็นระยะ sporulated oocyst ด้วย 2.5% $K_2Cr_2O_7$ โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ สำหรับสกัด DNA

การสกัด DNA จากเชื้อบิด *Eimeria* CB38

ทำการสกัด DNA จากเชื้อบิด *Eimeria* CB38 ด้วย lysis buffer-CTAB (Cetyl - Trimethyl Ammonium Bromide) (ปรับปรุงจาก Zhao et al., 2001) โดยนำ sporulated oocyst ประมาณ 10^4 oocyst /200 ul (นับด้วยวิธี McMaster Chamber Method) ทำการล้าง 2.5% $K_2Cr_2O_7$ ออกด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 4 ครั้ง lysis buffer (660 mM EDTA, 1.3% N-lauroylsarcosine, 2 mg/ml proteinase K, pH 9.5) ปริมาตร 60 ul และใช้ glass-bead ขนาด 5.5-6.5 mm จำนวน 1 เม็ดและ glass-bead ขนาด 1 mm จำนวน 20 เม็ด เพื่อทำให้ oocyst และเยื่อหุ้มของ sporocyst แตกออก แช่หลอดทดลองไว้ที่อุณหภูมิ 65°ซ. นาน 2 ชั่วโมง ทำการปั่นนาน 3-4 นาที ทุกๆ 30 นาที และตรวจสอบการแตกของ oocyst และ sporocyst ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างที่กำลังขยาย 400 เท่า เติม CTAB buffer (2% w/v CTAB, 1.4 M NaCl, 0.2% β-mercapto-ethanol, 20 mM EDTA, 100 mM TRIS) ปริมาตร 350 ul และแช่ที่อุณหภูมิ 60°ซ. นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นสกัด DNA ด้วย phenol/chloroform/isoamyl (25:24:1) ในอัตราส่วน 1:1 และตกตะกอน DNA ด้วย 4 M NaCl และ 100% cold ethanol แช่ที่อุณหภูมิ -20°ซ. นานอย่างน้อย 30 นาที แล้วทำการเก็บตะกอน DNA โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ล้างตะกอน DNA บริเวณก้นหลอดด้วย 70% cold ethanol 1 ครั้ง ปั่นเก็บตะกอน DNA และ ละลายตะกอน DNA ในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปริมาตร 200 ul เก็บรักษา DNA นี้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ. จนกว่าจะใช้งาน

ปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

วิธีการเพิ่มปริมาณ DNA ของเชื้อบิด *Eimeria* CB38 ในครั้งนี้ประกอบด้วย forward primer 5'-GAGGGAGCCTGA GAAACGGCT-3' และ reverse primer 5'-CCATGCTGCAG TATTCAGGGC-3' ตรงบริเวณยีน 18S rRNA gene (Genbank accession number U67115, U67117, U67119, U67121) โดยเตรียมปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 25 ul ประกอบด้วย forward และ reverse primer 0.2 uM, ตัวอย่าง DNA 2.5 ul, เอ็นไซม์ Taq Polymerase 0.3 ul (0.5 unit) 0.2 mM dNTPs และบัฟเฟอร์ (10xbuffer = 20 mM Tris-HCl (pH 8.2), 1.5 mM $MgCl_2$,100 mM KCl, 60 mM $(NH_2)SO_4$ และ 0.1%

Triton x-100) แล้วนำหลอดปฏิกิริยาเข้าเครื่อง GeneAmp System 2700 ที่ทำการตั้งโปรแกรมอุณหภูมิและเวลาดังนี้ ที่ Initial PCR activation step 94°ซ. 5 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ 35 รอบโดยใช้อุณหภูมิสำหรับ denaturation step ที่ 94°ซ. 30 วินาที annealing step ที่ 54°ซ. 30 วินาที และ extension step ที่ 72°ซ. 45 วินาที จากนั้นคงอุณหภูมิไว้ที่ final extension step ที่ 72°ซ. นาน 10 นาที แล้วเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ PCR ที่ 4°ซ. จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR มาวิเคราะห์ด้วย 2% agarose gel electrophoresis ย้อม DNA ด้วย ethidium bromide และถ่ายรูปแถบ DNA ภายใต้รังสีอัลตร้าไวโอเลต

การย่อยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Fragment Length Polymorphisms)

ตกตะกอนผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี ethanol precipitation (4 M NaCl และ 100% cold ethanol) แล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20°ซ. นานอย่างน้อย 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เมื่อพบตะกอน DNA บริเวณก้นหลอดล้างตะกอน DNA ให้บริสุทธิ์ด้วย 70% cold ethanol 1 ครั้ง ต่อจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ทำให้ตะกอน DNA แห้ง แล้วจึงเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปริมาตร 5 µl เพื่อละลายตะกอน DNA

ส่วนผสมในการย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ประกอบด้วย ตัวอย่าง DNA 5 µl และเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 1 unit (Promega) ในปริมาตรสุทธิ 10 µl และแช่ที่อุณหภูมิ 37°ซ. นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ถูกย่อยแล้วมาวิเคราะห์ด้วย 2% agarose gel electrophoresis ย้อมสี ethidium bromide ตรวจหาแถบ DNA ภายใต้รังสีอัลตร้าไวโอเลตและถ่ายรูป

การทดสอบความไวของเทคนิค PCR-RFLP

นำ DNA ของ Eimeria CB38 ที่สกัดด้วยวิธี Lysis buffer-CTAB มาทำ 2-fold dilution โดย DNA ที่สกัดได้เริ่มต้นมีจำนวน 10^4 oocyst/200 µl ดังนั้นจำนวนสัมพันธ์ของ oocyst ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR มีดังนี้คือ 62.50, 31.25, 15.63, 7.81, 3.91, 1.96, 0.98, 0.49, 0.24 และ 0.12 oocyst/ 2.5 µl

การทดสอบความจำเพาะของเทคนิค PCR-RFLP

ทำการทดสอบความจำเพาะของเทคนิค โดยนำปรสิตที่พบในระบบทางเดินอาหารของไก่ ได้แก่ *Raillietina cesticillus, Raillietina echinobothrida, Raillietina tetragona, Ascaridia galli, Capillaria* spp., *Gongylonema* spp., *Heterakis gallinae,* และ *Tetrameres* spp. รวมถึง *Trichostronglylus* spp. ที่พบได้ในลำไส้เล็กของแพะ มาสกัด DNA ด้วย lysis buffer-CTAB และใช้เทคนิค PCR-RFLP ในการเตรียมและตรวจหาแถบ DNA เพื่อเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการศึกษาเชื้อบิด *Eimeria* CB38 ด้วยวิธีเดียวกัน

ผลการทดลอง

ผลการทดสอบความไวของเทคนิค PCR ก่อนย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะเพื่อแยกชนิดเชื้อบิดจาก *Eimeria* CB38 พบว่าจำนวน oocyst น้อยที่สุดที่สามารถตรวจหาได้ในครั้งนี้ คือ 0.12 oocyst และเมื่อทำการแยกชนิดเชื้อบิด *Eimeria* CB38 ด้วยเทคนิค PCR-RFLP พบว่ามีความไวของการตรวจวินิจฉัยอยู่ที่ 8 oocyst ดังรูปที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

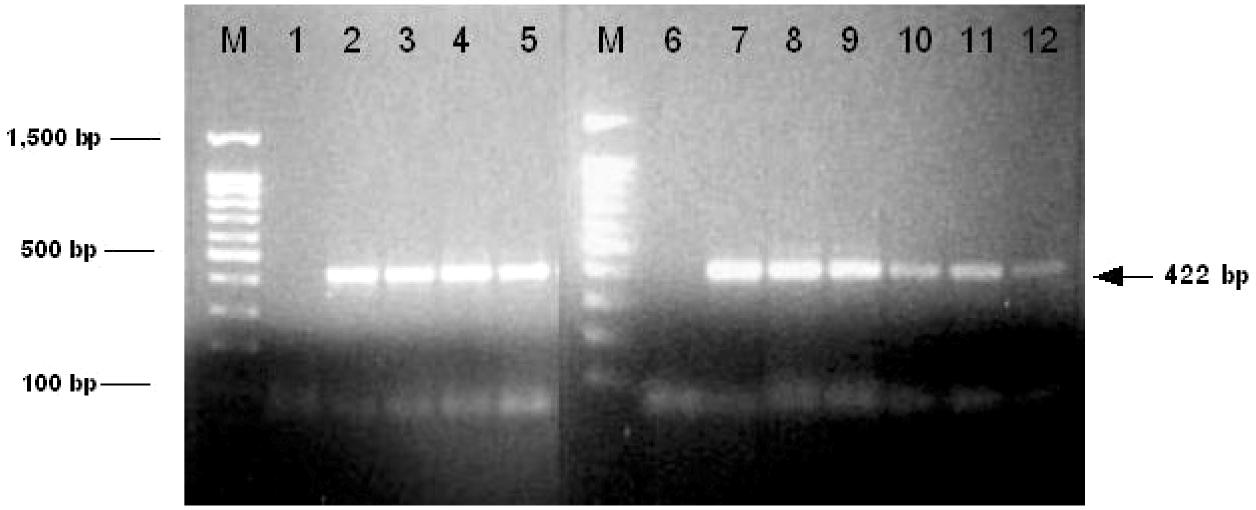
ผลการทดสอบความจำเพาะของเทคนิค PCR-RFLP จากเชื้อบิด *Eimeria* CB38 กับปรสิตในระบบทางเดินอาหารของไก่ ได้แก่ *Raillietina tetragona, R. echinobothrida, R. cesticillus,* Tapeworm segment (ที่ยังไม่สามารถแยกชนิดได้), *Ascaridia galli, Gongylonema* spp., *Heterakis gallinae* (เพศผู้และเมีย), *Tetrameres* spp. และปรสิตในลำไส้เล็กของแพะ ได้แก่ *Trichostrongylus* spp. พบว่าไม่มีผลิตภัณฑ์ PCR กับ DNA ของ Heterakis gallinae (เพศผู้), *R. tetragona, R. cesticillus, Ascaridia galli* และ *Capillaria* spp. (รูปที่ 3; Lane 3, 5, 7, 12 และ 14 ตามลำดับ) และพบผลิตภัณฑ์ PCR จางๆ ขนาด 400 bp จากตัวอย่าง DNA ที่ได้จาก *R. echinobothrida* และ Tapeworm segment (รูปที่ 3; Lane 6 และ 10 ตามลำดับ) สำหรับ *Gongylonema* spp. พบผลิตภัณฑ์ PCR มีขนาดประมาณ 400 bp และ 1,200 bp (รูปที่ 3; Lane 11) ในขณะที่ Heterakis gallinae (เพศเมีย) และ *Tetrameres* spp. มีขนาดประมาณ 400 bp และ 1,400 bp ตามลำดับ (รูปที่ 3; Lane 4 และ 13 ตามลำดับ) และสุดท้าย *Trichostrongylus* spp. มีผลิตภัณฑ์ PCR ที่ประมาณ 1,200 bp (รูปที่ 4; Lane 4) ซึ่งปรสิตชนิดนี้เป็นหนอนพยาธิในลำไส้เล็กของแพะ

จากรูปที่ 4 แสดงผลทดสอบความจำเพาะของเทคนิค PCR-RFLP ระหว่างเชื้อบิด *Eimeria* CB38 กับปรสิต *Trichostrongylus* spp. ที่ย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด

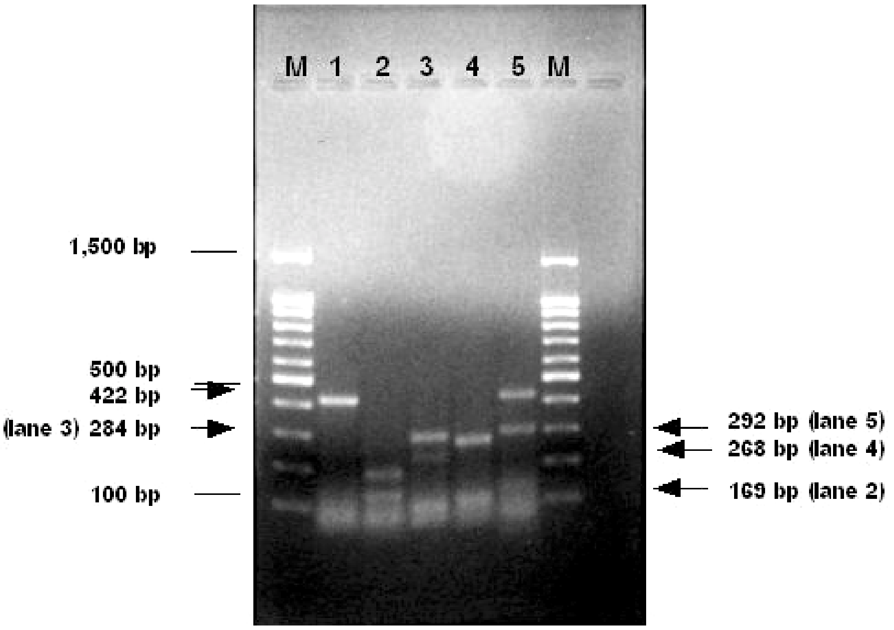
ตารางที่ 1 ขนาดของ DNA ของเชื้อบิด *E. acervulina, E. maxima, E. necatrix* และ *E. tenella* หลังการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Alu* I, *Hha* I, *Hpa* II และ *Hae* III

ชนิดของเชื้อบิด / เอ็นไซม์และลำดับเบสจำเพาะ	ขนาดของ DNA หลังการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ (bp)			
	Alu I	*Hha* I	*Hpa* II	*Hae* III
	5' AG'CT 3'	5' G'CGC 3'	5' C'CGG 3'	5' GG'CC 3'
E. acervulina	38 183 201	19 39 45 9 226	68 (354)	-
E. maxima	(27) 38 (56) (100) 201	19 39 45 93 226	106 (316)	-
E. necatrix	70 (169) 183	45 (58) 93 226	48 (70) 106 (198)	(130) (292)
E. tenella	38 70 (131) 183	45 93 (284)	48 106 (268)	-

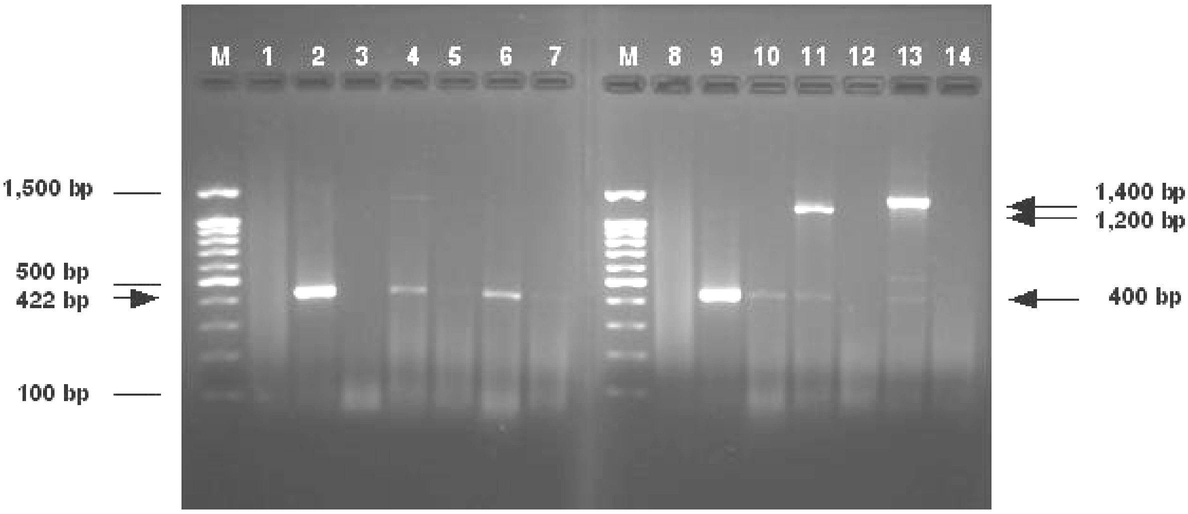
( ) คือ ขนาดของ DNA ที่จำเพาะต่อเชื้อแต่ละชนิด



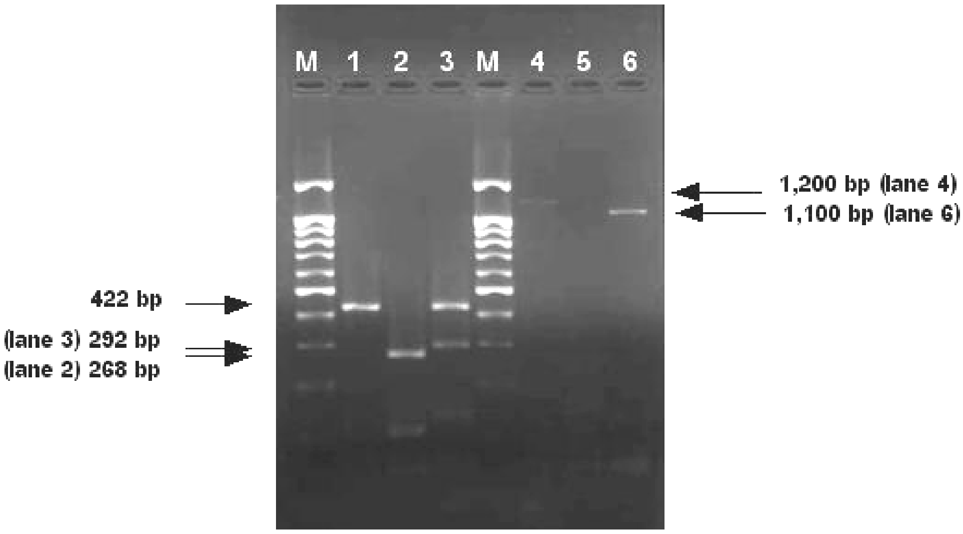
รูปที่ 1 ความไวของเทคนิค PCR ต่อเชื้อบิด *Eimeria* CB38 จำนวนเทียบเท่า 0.12 oocyst Lane M: 1.5 Kbp DNA ladder marker; Lane1,6: Negative control (H_2O); Lane 2: ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Eimeria* CB38 จำนวน 62.50 oocysts; Lane 3: ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Eimeria* CB38 จำนวน 31.25 oocysts; Lane 4: ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Eimeria* CB38 จำนวน 15.63 oocysts; Lane 5: ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Eimeria* CB38 จำนวน 7.81 oocysts; Lane 7: ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Eimeria* CB38 จำนวน 3.91 oocysts; Lane 8: ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Eimeria* CB38 จำนวน 1.96 oocysts; Lane 9: ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Eimeria* CB38 จำนวน 0.98 oocyst; Lane 10: ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Eimeria* CB38 จำนวน 0.49 oocyst; Lane 11: ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Eimeria* CB38 จำนวน 0.24 oocyst; Lane 12: ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Eimeria* CB38 จำนวน 0.12 oocyst



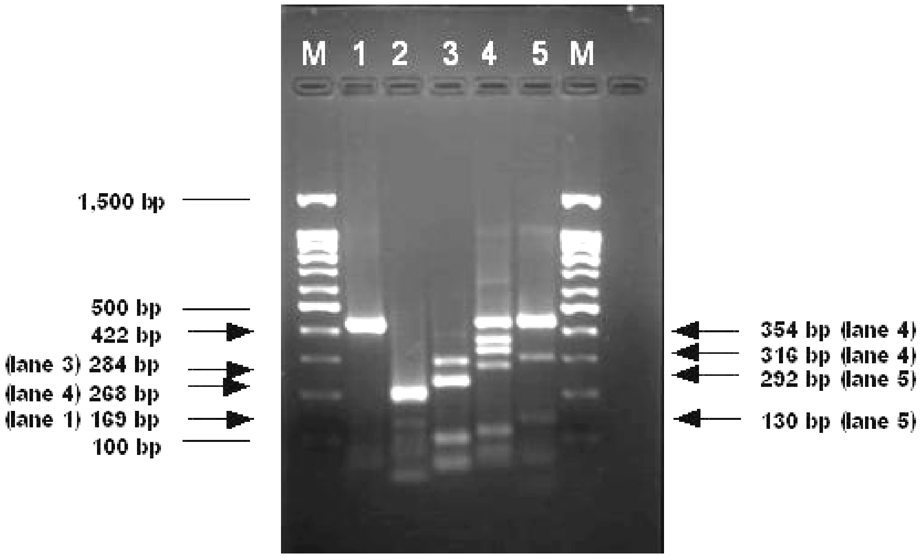
รูปที่ 2 ความไวของเทคนิค PCR-RFLP ต่อเชื้อบิด *Eimeria* CB38 จำนวนเทียบเท่า 8 oocysts Lane M: 1.5 Kbp DNA ladder marker; Lane 1: ผลิตภัณฑ์ PCR จาก *Eimeria* CB38 ขนาด 422 bp; Lane 2: ผลิตภัณฑ์ PCR จาก *Eimeria* CB38 ย่อยด้วยเอนไซม์ Alu I ขนาด 183 bp, 169 bp; Lane 3: ผลิตภัณฑ์ PCR จาก *Eimeria* CB38 ย่อยด้วยเอนไซม์ *Hha* I ขนาด 284 bp, 226 bp; Lane 4: ผลิตภัณฑ์ PCR จาก *Eimeria* CB38 ย่อยด้วยเอนไซม์ *Hpa* II ขนาด 268 bp; Lane 5: ผลิตภัณฑ์ PCR จาก *Eimeria* CB38 ย่อยด้วยเอนไซม์ *Hae* III ขนาด 422 bp, 292 bp, 130 bp



รูปที่ 3 ความจำเพาะของเทคนิค PCR ที่บริเวณ 18S rRNA gene ของ *Eimeria* spp. ต่อปรสิตในระบบทางเดินอาหารของไก่ Lane M: 1.5 Kbp DNA ladder marker; Lane 1,8: Negative control (H_2O); Lane 2,9: Positive control (ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Eimeria* CB38); Lane 3: ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Heterakis gallinae* (เพศผู้); Lane 4: ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Heterakis gallinae* (เพศเมีย); Lane 5: ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Raillietina tetragona;* Lane 6: ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Raillietina echinobothrida;* Lane 7: ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Raillietina cesticillus;* Lane 10: ผลิตภัณฑ์ PCR ของ Tapeworm segment; Lane 11: ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Gongylonema* spp.; Lane 12: ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Ascaridia galli;* Lane 13: ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Tetrameres* spp.; Lane 14: ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Capillaria* spp



รูปที่ 4 ความจำเพาะของเทคนิค PCR-RFLP ที่บริเวณ 18S rRNA gene ที่แตกต่างกันระหว่าง *Eimeria* CB38 กับ *Trichostrongylus* spp. Lane M: 1.5 Kbp DNA ladder marker; Lane 1: ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Eimeria* CB38 ขนาด 422 bp; Lane 2: ผลิตภัณฑ์ PCR-RFLP ของ *Eimeria* CB38 ตัดด้วยเอ็นไซม์ Hpa II ขนาด 268 bp; Lane 3: ผลิตภัณฑ์ PCR-RFLP ของ *Eimeria* CB38 ตัดด้วยเอ็นไซม์ Hae III ขนาด 130 bp, 292 bp, 422 bp; Lane 4: ผลิตภัณฑ์ PCR ของ *Trichostrongylus* spp. ขนาด 1,200 bp; Lane 5: ผลิตภัณฑ์ PCR-RFLP ของ *Trichostrongylus* spp.ตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hpa* II; Lane 6: ผลิตภัณฑ์ PCR-RFLP ของ *Trichostrongylus* spp.ตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hae* III ขนาด 1,100 bp



รูปที่ 5 การแยกชนิดเชื้อบิดที่มีในวัคซีนเชื้อเป็น Immucox®(I) ประกอบด้วยเชื้อบิดอย่างน้อย 4 ชนิด คือ *E. acervulina, E. maxima, E. necatrix* และ *E. tenella* ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ที่บริเวณ 18S rRNA gene Lane M: 1.5 Kbp DNA ladder marker; Lane 1: ผลิตภัณฑ์ PCR จากเชื้อบิดที่มีในวัคซีนเชื้อเป็น Immucox®(I) ขนาด 422 bp; Lane 2: ผลิตภัณฑ์ PCR-RFLP ของวัคซีนเชื้อเป็น Immucox®(I) ตัดด้วยเอ็นไซม์ *Alu* I ขนาด 201 bp, 169 bp; Lane 3: ผลิตภัณฑ์ PCR-RFLP ของวัคซีนเชื้อเป็น Immucox®(I) ตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hha* I ขนาด 284 bp, 226 bp; Lane 4: ผลิตภัณฑ์ PCR-RFLP ของวัคซีนเชื้อเป็นImmucox®(I) ตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hpa* II ขนาด 422 bp, 354 bp, 316 bp, 268 bp, 106 bp; Lane 5: ผลิตภัณฑ์ PCR-RFLP ของวัคซีนเชื้อเป็น Immucox®(I) ตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hae* III 422 bp, 292 bp, 130 bp

คือ *Hpa* II และ *Hae* III พบว่าสามารถแยกชนิดเชื้อบิดได้ 2 ชนิด คือ *E. tenella* มีขนาดชิ้นส่วน DNA ที่ 106 bp และ 268 bp ส่วน *E. necatrix* จะมีขนาดของชิ้นส่วน DNA 106 bp เมื่อย่อยด้วยเอ็นไซม์ *Hpa* II ส่วนผลการทดสอบกับปรสิต *Trichostrongylus* spp. ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อย่อยด้วยเอ็นไซม์ Hpa II และเมื่อย่อยผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเอ็นไซม์ *Hae* III พบว่า ชิ้นส่วน DNA ของ *E. tenella* มีขนาด 422 bp และชิ้นส่วน DNA ของ *E. necatrix* มี 2 ขนาด คือ 130 bp และ 292 bp ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ของ *Trichostrongylus* spp. มีขนาดของชิ้นส่วน DNA 1,100 bp ซึ่งเทคนิค PCR-RFLP แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของขนาดของชิ้นส่วน DNA ระหว่าง *Eimeria* CB38 และ *Trichostrongylus* spp. ได้เป็นอย่างดี

จากเทคนิค PCR-RFLP ที่ย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด คือ *Alu* I, *Hha* I, *Hpa* II และ *Hae* III พบว่าสามารถแยกเชื้อบิดจาก *Eimeria* CB38 ได้ 3 ชนิด คือ *E. maxima* มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 100 bp เมื่อย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I ส่วน *E. necatrix* มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 292 bp และ 130 bp เมื่อย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III และ *E. tenella* มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 284 bp และ 268 bp เมื่อย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hha* I และ *Hpa* II ตามลำดับ ดังรูปที่ 2 โดยผลการทดสอบเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR-RFLP ที่ได้สอดคล้องตามตารางที่ 1 นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาแยกชนิดเชื้อบิดจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox®(I) ด้วยเทคนิค PCR-RFLP เช่นกัน โดยสามารถแยกเชื้อบิดได้ 4 ชนิด ซึ่งสอดคล้องกับที่ระบุไว้ที่ฉลากข้างผลิตภัณฑ์ คือ (หนึ่ง) *E. acervulina* มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 354 bp เมื่อย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hpa* II, (สอง) *E. maxima* มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 100 bp และ 316 bp เมื่อย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I และ *Hpa* II ตามลำดับ, (สาม) *E. necatrix* มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 169 bp และ 292 bp ร่วมกับ 130 bp เมื่อย่อยด้วยเอ็นไซม์ ตัดจำเพาะ *Alu* I และ *Hae* III ตามลำดับ และ (สี่) *E. tenella* มีขนาดผลิตภัณฑ์ที่จำเพาะอยู่ที่ 284 bp และ 268 bp เมื่อย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hha* I และ *Hpa* II ตามลำดับ ดังตารางที่ 1 และรูปที่ 5 โดยขนาดชิ้นส่วน DNA ที่จำเพาะจะจัดอยู่ในวงเล็บ

วิจารณ์

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค PCR-RFLP เป็นเทคนิคหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลาย (polymorphisms) เพื่อแยกชนิดเชื้อบิด *Eimeria* CB38 และเชื้อบิดจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox®(I) ที่บริเวณ 18S ribosomal RNA gene โดยได้รับการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค PCR ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการออกแบบ Primer จำนวน 1 คู่ ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณที่เรียกว่า conserved region ของ *Eimeria* spp. ในไก่ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ขนาด 422 bp และนำผลิตภัณฑ์ PCR มาแยกชนิดเชื้อบิดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่มีด้วยกัน 4 ชนิด คือ *Alu* I, *Hha* I, *Hpa* II และ *Hae* III โดยเทคนิค PCR-RFLP เป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูง ในการนำมาใช้ตรวจวินิจฉัยโรค (Sangster et al., 2002) และมีการนำเทคนิค PCR-RFLP มาใช้ประโยชน์ในการศึกษาด้านต่างๆ เช่น Taxonomy และ Phylogeny ของเชื้อบิดในสัตว์ฟันแทะ (Hnida and Duszynnski, 1999) และศึกษาการระบาดสำหรับตรวจสอบหาความจำเพาะของ DNA จาก oocyst ที่ปนเปื้อนในตัวอย่างอุจจาระหรือสิ่งแวดล้อมได้ (Woods et al., 2000)

การศึกษาความไวของเทคนิค PCR ในขณะที่ยังไม่ได้ทำเทคนิค RFLP ครั้งนี้พบว่าใช้จำนวน oocyst น้อยสุดที่ตรวจพบได้อยู่ที่ 0.12 oocyst โดยให้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 422 bp ซึ่งต่างกับการศึกษาของ Yao-Chi และคณะ (2003) ที่พบว่าความไวของเทคนิค PCR สามารถตรวจพบผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 463 bp ของ *E. tenella* ที่บริเวณ ITS-1 ได้เมื่อใช้จำนวน oocyst 50 oocysts จากประเทศไต้หวัน และความไวของเทคนิค PCR-RFLP ที่สามารถตรวจแยกชนิดเชื้อบิดได้ในครั้งนี้อยู่ที่ 8 oocysts ซึ่งเทคนิค PCR-RFLP ต้องใช้จำนวน oocyst มากกว่าเทคนิค PCR เพื่อให้ง่ายต่อการตรวจสอบ DNA ที่มีขนาดเล็กประมาณ 100-200 bp ได้ หลังจากการย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

จากผลการทดลองหาความจำเพาะของ 18S rRNA gene ของ *Eimeria* spp. ที่มีกับปรสิตในระบบทางเดินอาหารของไก่และปรสิตในลำไส้เล็กของแพะในครั้งนี้พบว่า Primer ที่ใช้ในการศึกษามีความจำเพาะต่อการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในตำแหน่ง 18S rRNA gene ของเชื้อบิด *Eimeria* spp. แต่ไม่มีความจำเพาะต่อปรสิตในระบบทางเดินอาหารของไก่และปรสิตในลำไส้เล็กของแพะ ทั้งนี้เนื่องจากปรสิตในระบบทางเดินอาหารของไก่ เช่น *Gongylonema* spp. และ *Tetrameres* spp. ปรสิตทั้ง 2 ชนิดอาศัยอยู่ที่กระเพาะอาหาร และ

proventriculus ตามลำดับ ส่วน *Capillaria* spp., *Raillietina* spp. และ Tapeworm segment อื่นๆ เป็นพยาธิที่อาศัยในลำไส้เล็กของไก่ และพยาธิ *Heterakis* spp. (เพศเมีย) อาศัยอยู่ที่ไส้ตันเช่นเดียวกับเชื้อบิด แต่ผลิตภัณฑ์ PCR จางๆ ของพยาธิทั้ง 2 ชนิด ที่พบมีขนาดประมาณ 400 bp ซึ่งต่างกันเล็กน้อยกับ *Eimeria* spp. ที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 422 bp และจากการตรวจสอบลำดับพันธุกรรมของ *Heterakis* spp. ที่บริเวณ 18S ribosomal RNA gene (accession number คือ AF 083003) พบว่า Primer ที่ออกแบบให้จำเพาะกับ *Eimeria* spp. และไม่สามารถจับกับ DNA แม่แบบของพยาธิ *Heterakis* spp. ได้ ดังนั้นผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด 400 bp น่าจะมาจากการเปื้อนปนสารพันธุกรรมตามธรรมชาติของเชื้อบิดที่มีในลำไส้ไก่

ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค PCR-RFLP สามารถนำมาใช้ในการแยกชนิดเชื้อบิดที่ประกอบอยู่ใน *Eimeria* CB38 ที่ไม่เคยมีการแยกชนิดมาก่อนได้ 3 ชนิด คือ *E. maxima, E. necatrix* และ *E. tenella* และจากวัคซีนเชื้อเป็น Immucox® (I) ได้ 4 ชนิด คือ *E. acervulina, E. maxima, E.necatrix* และ *E. tenella* ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 4 ชนิด คือ *Alu* I, *Hha* I, *Hpa* II และ *Hae* III โดยปกติแล้ววัคซีนเชื้อเป็น Immucox® (I) จะมีเชื้อบิดทั้ง 4 ชนิดนี้เป็นส่วนประกอบภายในวัคซีน (Vermeulen et al., 2001) จากผลการศึกษาในครั้งนี้ให้ผลสอดคล้องกับ Jinneman และคณะ (1996) ที่สามารถแยกชนิดระหว่างเชื้อ *Cyclospora* spp. ซึ่งเป็นโปรโตซัวที่ทำให้เกิดโรคท้องเสียในคน และ *Eimeria* spp. ในไก่ ด้วย เทคนิค PCR-RFLP โดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ MnI I ที่บริเวณ 18S rRNA gene ในขณะที่การศึกษาของ Wood และ คณะ (2000) ใช้เทคนิค PCR-RFLP ที่ส่วนของ ITS-2 (Intertranscription spacer-2) พบว่าสามารถแยกชนิดเชื้อบิดในไก่ได้ถึง 6 ชนิด โดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *Cfo* I, *Sau* 3AI และ *Taq* I ส่วนการแยกชนิดเชื้อบิดในวัคซีนเชื้อเป็น Immucox®(I) ยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษา แต่ในวัคซีนเชื้อเป็น Coccivac-B และ Coccivac-D You-Chi และคณะ (2003) สามารถแยกชนิดเชื้อบิดได้ 5 ชนิด คือ *E.acervulina, E. brunette, E. maxima, E.necatrix* และ *E. tenella* ที่บริเวณ ITS-1 ได้ด้วยเทคนิค PCR อย่างไรก็ตามการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR-RFLP ในครั้งนี้ถือว่าได้ผลชัดเจนและรวดเร็ว หากแต่ใช้แยกชนิดเชื้อบิดได้เพียง 4 ชนิดเท่านั้น ซึ่งก็อาจเพียงพอต่อการศึกษาเชื้อบิดเนื่องจากในสภาพปัจจุบันเชื้อบิดทั้ง 4 ชนิด เป็นเชื้อที่พบได้เสมอในการเลี้ยงไก่ ถ้าต้องการแยกเชื้อบิดหลายๆ ชนิดในเวลาเดียวกัน จำเป็นต้องใช้เอ็นไซม์หลายชนิดมากขึ้นจึงจะให้ผลการตรวจสอบชัดเจนขึ้น

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า เทคนิค PCR-RFLP มีความจำเพาะต่อการทดสอบชนิดของเชื้อบิดสูง และค่าใช้จ่ายในการปฏิบัติน้อยกว่า โดยเทคนิค PCR-RFLP สามารถนำมาใช้ศึกษาเพื่อให้ได้ข้อมูลเบื้องต้น ก่อนการนำชิ้นส่วน DNA ไปหาลำดับเบสถ้าจำเป็น เช่น ผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีขนาด 198 bp จำเพาะต่อ *E. necatrix* เมื่อย่อยด้วยเอ็นไซม์ *Hpa* II ไม่สามารถตรวจพบได้ตามตารางที่ 1 ดังนั้นจึงควรเพิ่มขั้นตอนการศึกษาให้ละเอียดขึ้นโดยนำชิ้นส่วน DNA ไปหาลำดับเบสเพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ชัดเจนขึ้น อย่างไรก็ตามควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในกรณีที่ต้องการนำเทคนิค PCR-RFLP มาใช้ในการแยกชนิดเชื้อบิดชนิดอื่นๆ อีก โดยเลือกบริเวณส่วนอื่นของ ribosomal RNA เช่น Internal Transcribed Spacer 1 (ITS 1) หรือ Internal Transcribed Spacer 2 (ITS 2) เพื่อจะได้ทราบถึงลักษณะของเชื้อบิดที่แยกได้เพิ่มมากขึ้นและแม่นยำขึ้น ดังนั้นเทคนิค PCR-RFLP จึงน่าจะมีประโยชน์ในการนำไปใช้ศึกษาแยกชนิดเชื้อบิดที่ให้ความสำคัญทางด้านระบาดวิทยา ทางด้านวัคซีน หรือแม้แต่อาจใช้แยกเชื้อบิดสายพันธุ์ที่ดื้อยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนและส่งเสริมวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษาในสถาบันอุดมศึกษาของรัฐ ทบวงมหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2546 บริษัทไบโอจีโนเมด ที่เอื้อเฟื้อชุดอุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพเจลและบริษัท Fort Dodge ที่เอื้อเฟื้อวัคซีนเชื้อเป็น Immucox®(I)

เอกสารอ้างอิง

Barta, J.R., Martin, D.S., Liberator, P. A., Dashkevics, M., Anderson, J.W., Feighner, S.D., Elbrecht, A., Perkin-Barrow, A., Jenkins, M.C., Danforth, H.D., Ruff, M.D. and Profous-Juchelka, H. 1997. Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. J. Parasitol. 83 (2): 262-271.

Chapman, H.D. 1982. The use of enzyme electrophoresis for the identification of the species of *Eimeria* present in field isolates of coccidia. Parasitology. 85(3): 437-442

Costa, C.A.F., Gomes, R.F., Melo, M.N. and Riberiro, M.F.B. 2001. *Eimeria* parasites of domestic fowl : genetic relationships of different isolates estimated from random amplified polymorphic DNA. Parasitol. Res. 87(6): 459-466.

Fernando, M.A. and Pasternak, J.J. 1991. *Eimeria* spp. of the domestic fowl: resdution of chromosome by field inversion gel electrophoresis. Exp. Parasitol. 72(3): 306-310.

Guo, Z.G. and Johnson, A.M. 1995. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* strain by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. Parasitogy. 111(2): 127-132.

Hnida, J,. Duszynski, D., 1999. Taxonomy and systematics of some *Eimeria* species of murid rodents as determined by the ITS-1 rigion of the ribosomal gene complex. Parasitology. 119(4): 349-357.

Idris, A.B., Bounous, D.I., Goodwin, M.A., Brown, J. and Krushinskie, E.A. 1997. Lack of correlation between microscopic lesion scores and gross lesion scores in commercially growth broilers examined for small intestinal eimeria spp. coccidiosis. Avian Dis. 41(2): 388-391.

Jinnemen, K.C., Wetherington, J.H., Adams, A.M., Johnson, J. M., Tenge, B. J., D, N. and Hill, W.E. 1996. Differentiation of Cyclospora sp. And *Eimeria* spp. by using the polymerase chain reaction amplification products and restriction fragment length polymorphism. Laboratory Information Bulletin:1-8.

Johnston, D.A. and Fernando, M.A. 1995. *Eimeria* spp. of the domestic fowl: analysis of genetic variability between species and strains using DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers and denaturing gradient-gel electrophoresis. Parasitol. Res. 81(2): 91-97.

Johnston, D.A. and Fernando, M.A. 1997. Isoenzymes of *Eimeria* from the domestic fowl: electrophoretic variants among species, strains and clones. Parasitol. Res. 83(5): 464-70.

Kucera, J. 1991. Enzyme variants of *Eimeria* parasitizing the domestic fowl and possibilities of species diagnostics. Folia Parasitol (Praha). 38(3): 193-199.

Long, P.L. and Joyner, L.P. 1984. Problems in the identification of species of *Eimeria*. J. Protozool. 31(4): 535-541.

Mattiello, R., Boviez, J.D. and McDougald, L.R. 2000. *Eimeria brunetti* and *Eimeria necatrix* in chickens of Argentina and Confirmation of seven species of Eimeria. Avain Dis. 44(3): 711-714.

Roberson, E. L. 1995. Antiprotozoan drugs. In: N. H. Booth and L. E. McDonald, (eds.), Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 5th ed, Iowa: The Iowa State University Press. 962-966.

Sangster, N., Batterham, P., Chapman, H. D., Duraisingh, M., Jambre, L. L., Shirley, M., Upcroft, F. and Upcroft, P. 2002. Resistance to antiparasitic drugs : the role of molecular diagnosis. Int. J. Parasitol. 32(5): 637-653.

Shirley, M.W.1975. Enzyme variation in *Eimeria* species of the chicken. Parasitolgy. 71(3): 369-376.

Shirley, M.W., Kemp, D.J., Pallister, J. and Prowse, S.J. 1990. A molecular karyotype of *Eimeria tenella* as revealed by contour-clamped homogeneous electric field gel electrophoresis. Mol. Biochem. Parasitol. 38(2): 169-174.

Shirley, M.W. 1994. The genome of *Eimeria tenella*: further studies on its molecular organization. Parasitol. Res. 80(5): 366-373.

Shirley, M.W. 1997. *Eimeria* spp. from the chicken: occurrence, identification and genetics. Acta Vet. Hungarica. 45(3): 331-347.

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. Exp. Parasitol. 76(1): 68-75.

Vermeulen, A.N., Schaap, O.C. and Schetters, Th.P.M. 2001. Control of coccidiosis in chickens by vaccination. Vet. Parasitol. 100(1-2): 13-20.

Williams, R. B.1998. Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccines for chickens. Int. J. Parasitol. 28(7):1089-1098.

Woods, W.G., Whithear, K.G., Richard, 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 chicken in Australia. Int. J. Parasitol. 30(9): 1019-1023.

Yao-Chi, S., Andrew Chang-Young, F. and Fang-Mei, T. 2003. Differential diagnosis of five avian *Eimeria* species by polymerase chain reaction using primers derived from the internal transcribed spacer 1 (ITS 1) sequerce. Vet. Parasitol. 117: 221-227.

Zhao, X. Duszynski, D.W. and Loker, E.S. 2001. A simple method of DNA extraction for *Eimeria* species. J. Microbiol. Methods. 44(2): 131-137.