مقایسه روشهای مختلف ایمن سازی ماکیان با سویه پیش‌رس ایمریا تنلا*

دکتر صادق رهبری[1] دکتر سید محمد مهدی کیایی[2] دکتر مهرداد مدیر صانعی[2]

هدف: مقایسه بین روشهای مختلف مورد استفاده جهت ایجاد ایمنی در ماکیان با سویه پیش رس ایمریاتنلا.

طرح: طرح کاملا تصادفی.

حیوانات: تعداد ۳۶۰ قطعه جوجه یکروزه گوشتی از نژاد آرین.

روش: جوجه‌های مورد آزمایش به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند به طوری که هر گروه به چهار زیر گروه ۳۰ قطعه‌ای تقسیم شده و هر زیر گروه درون یک پن مجزا و بر روی بستری از تراشه چوب نگهداری شدند. یکی از گروههای آزمایشی به عنوان گروه شاهد (غیر ایمن) منظور گردید. برای ایجاد ایمنیت در سه گروه دیگر به ترتیب از روشهای خوراکی (دهانی)، تلقیح داخل چشمی و تلقیح داخل کلواکی استفاده شد. جوجه‌های هر چهار گروه در فاصله ۲۸ روز بعد از ایمن سازی با تعداد ۲۰۰۰۰ عدد اسیست هاگدار ایمریاتنلا به ازای هر پرنده، مورد چالش قرار گرفتند. جستجوی اسیست‌های کوکسیدیایی در نمونه‌های مدفوع و بستر تا ۹ روز پس از آلوده کردن جوجه‌ها و تعیین تعداد اسیست‌ها در هر گرم از نمونه‌های بستر تا هفته نهم دوره پرورش ادامه یافت.

تجزیه و تحلیل آماری: آزمون تجزیه واریانس، آزمون توکی برای مقایسه بین میانگینها.

نتایج: نتایج حاصل نشان دادند که میزان دفع اسیست در هر گرم مدفوع در گروه شاهد به طور بسیار معنی داری بالاتر از گروههای ایمن شده بود ($P<0/01$). کمترین تعداد دفع اسیست در گروههای ایمن شده، مربوط به جوجه‌های ایمن شده از راه دهانی بود. بر اساس نتایج به دست آمده، هر سه روش ایمن سازی به کار گرفته شده در این آزمایش، سبب ایجاد ایمنی اکتسابی در مقابل سویه‌های مورد استفاده جهت آلوده کردن جوجه‌ها شدند. نمونه گیری از بستر روش خوبی برای پایش تعداد اسیست دفع شده، می‌باشد.

نتیجه گیری: براساس نتایج حاصل می‌توان چنین استنباط نمود که به کارگیری تمام روشهای مورد استفاده در این مطالعه تجربی جهت انجام واکسیناسیون در ماکیان در مقابل بیماری کوکسیدیوز، می‌تواند سبب ایجاد پاسخ ایمنی کافی در آنها شود. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۱)، دوره ۵۷، شماره ۲، ۴-۱.

واژه های کلیدی: کوکسیدیوز، روشهای واکسیناسیون، ماکیان.

Delivery systems for precocious line of *Eimeria tenella* to induce immune response in chicken

Rahbari, S.,[1] Kiaei, S.M.M.,[2] Modirsanei, M.[2]

[1]*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran – Iran.* [2]*Department of Animal and Poultry Health and Nutrition, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran – Iran.*

Objective: To compare different procedures of immunization of chicken with precocious line of *Eimeria tenella.*

Design: Completely randomized design.

Animals: Three hundred and sixty day-old Aryan broiler chicks.

Procedure: Chicks were randomly assigned to four treatments. Each treatment was contained of 3 replicate floor pens of 30 chicks. One treatment considered as control and was not immunize. For immunizing the other three groups, oral, intra-ocular, and intra-cloacal routs were used. All of the chicks were challenged at 28 days of post-immunization with 2×10^4 *Eimeria tenella* sporulated oocysts per bird. Surveillances for coccidian oocysts on feces and litter samples were continued until the day 9 post challenge and determining oocyst counts per gram of litter sample were carried out up to 8 weeks of rearing.

Statistical analysis: Analysis of variance, Tukey's test.

Results: The results showed that the OPG in control groups were significantly more than three immunized groups ($P<0.01$). Among immunized treatments, the lowest OPG was related to the chicks which had been vaccinated by oral rout. It was indicated that the three routes of immunization caused aquired immunity to species which had been used for challenge. Taking sample from litter was a good way for monitoring oocysts count.

Conclusion: According to obtained results, it could be concluded that vaccination against coccidiosis with all of the routes which were used in this experimental trial (including oral, intra-ocular, and intra-cloacal) could cause the adequate immune response in chicken. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 57, 2: 1-4, 2002.***

Key words: Coccidiosios, Vaccination methods, Chicken.

کوکسیدیوز بیماری تک یاخته‌ای درون سلولی دستگاه گوارش ماکیان است که با تکثیر در سلولهای پوششی روده موجب تخریب نسوج و بروز کوکسیدیوز بالینی و تحت بالینی می‌گردد (۱۱). تجویز داروهای شیمیایی به منظور پیشگیری از ابتلای ماکیان نیز بسیار پر هزینه می‌باشد. علاوه بر آن، علی‌رغم تجویز ترکیبات مختلف ضد کوکسیدی، به دلیل عدم تأثیر همه جانبه داروها بر روی تمامی گونه‌های ایمریا، معضل بیماری همچنان باقی است (۹). وجود باقیمانده داروها در گوشت و تخم مرغ و همچنین تأثیر نامطلوب آنها بر میزان جوجه درآوری، جملگی سبب محدودیت استفاده از آنها در پیشگیری از این بیماری گردیده است. از سوی دیگر عواملی از قبیل پدیده مقاومت دارویی و ایجاد گونه‌های مقاوم در مقابل مواد شیمیایی (۱۰)، تضعیف سیستم ایمنی و بروز مسمومیت سلولی (۶)، و در نهایت کاهش بازدهی در گله‌های گوشتی و کاهش جوجه درآوری در گله‌های مادر (۱۳) سبب گردیده‌اند تا امروزه ایمن سازی گله از طریق اسیست‌های زنده یا تخفیف حدت یافته به صورت واکسن، به عنوان یک روش موفق و اقتصادی جهت پیشگیری و کنترل کوکسیدیوز پذیرفته شده و راههای عملی و شیوه‌های مختلف واکسیناسیون ماکیان بر علیه این بیماری در سطح کارخانه‌های جوجه کشی و مزارع پرورشی مورد مطالعه قرار گیرند. استفاده از روشهای مختلف واکسیناسیون مانند روش آشامیدنی، قطره چشمی، قطره بینی، اسپری، تلقیح و ... به منظور پیشگیری از وقوع بیماریهای ویروسی و باکتریایی سالهاست در سطح مزارع طیور متداول گشته و به تناسب نوع واکسن، شرایط مزرعه، نوع تولید، مقطع سنی پرنده و سایر شرایط، یکی از روشهای فوق انتخاب و به مورد اجرا گذارده می‌شود.

با توجه به اینکه ایمنیت در بیماری کوکسیدیوز از نوع موضعی است، بنابراین اتخاذ هر یک از شیوه‌های معمول در واکسیناسیون باید الزاما به مجرای گوارشی منتهی شود تا بتواند ایمنیت موضعی لازم را در طول مجرای گوارشی ایجاد نماید. از این رو به طور معمول از روش آشامیدنی و یا ژل خوراکی برای این منظور استفاده می‌شود. در عین حال از روشهای دیگر مانند اسپری واکسن بر روی پر و بال جوجه یکروزه در کارخانه جوجه کشی،

*) این پژوهش در بخش طیور موسسه تحقیقاتی امین آباد وابسته به دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام گرفته است.

۱) گروه آموزشی انگل شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۲) گروه آموزشی بهداشت و تغذیه دام و طیور دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

جهت در دسترس قرار گرفتن اسیست لازم از طریق نوک زدن به پر و بال، روش قطره چشمی و انتقال اسیست‌ها به دستگاه گوارش از طریق مجرای اشکی- بینی‌ای (۵)، و بالاخره تلقیح داخل کلواک به منظور ایجاد ایمنی در بخشهای انتهایی دستگاه گوارش (۶) استفاده شده است. هدف از انجام این مطالعه مقایسه روشهای معمول در واکسیناسیون علیه کوکسیدیوز به منظور تعیین با کفایت‌ترین و ساده‌ترین روش برای ایجاد ایمنی علیه این بیماری است.

مواد و روش کار

الف) به منظور ایجاد سویه پیش رس اسیست، اولین اسیست‌های تولید شده هر سویه، از گونه خاص ایمریا تنلا به طور مکرر پس از تلقیح و دفع اسیست انتخاب شده و محصول نهایی با تراکم دو هزار اسیست در هر میلی‌لیتر تنظیم گردید. چنین روشی اولین بار توسط Jeffers در سال ۱۹۷۵ گزارش شد. به منظور به دست آوردن اسپوروزایت، ابتدا جداره یک میلیون اسیست به طریق مکانیکی شکسته و جهت رها سازی اسپوروزایت، از محیط شامل ۰/۴ درصد تریپسین با غلظت ۱ به ۲۵۰ و ۸ درصد صفرای گاو در محیط هنکس(Hank's)(شامل ۸ گرم کلرید سدیم + ۰/۴ گرم پتاسیم + ۰/۶۰ گرم فسفات دی سدیک + ۰/۰۶ گرم فسفات منوپتاسیک + یک گرم گلوکز + ۰/۳۵ گرم بی کربنات سدیم + ۰/۰۴ گرم فنل رد در یک لیتر آب مقطر) استفاده شد. به منظور عمل هضم جداره اسپوروسیست، محیط شکوفایی به مدت شش ساعت تحت شرایط ۴۱ درجه سانتیگراد و pH=۷/۴ بر روی شیکر نگهداری شد و سپس جهت قطع عمل هضم، به هر میلی‌لیتر از محیط شکوفایی، نیم میلی‌لیتر سرم گوسفند اضافه شد تا واکنش آنزیمی متوقف گردد. محلول مذکور سه بار با محیط هنکس شستشو و اسپوروزایت‌ها با تراکم پانزده هزار در هر میلی‌لیتردر ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۵).

ب) تعداد ۳۶۰ قطعه جوجه خروس یک روزه از نژاد آرین به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند به طوری که هر گروه شامل سه زیر گروه (تکرار) و هر زیر گروه مشتمل بر ۳۰ قطعه جوجه بوده و جوجه‌های هر زیر گروه درون یک پن مجزا و بر روی بستری از تراشه چوب نگهداری شدند. از مجموع گروههای آزمایشی، یک گروه به عنوان گروه شاهد (واکسینه نشده) منظور گردید و سه گروه دیگر جهت ایمن سازی، مورد واکسیناسیون قرار گرفتند. برای این منظور در روز سوم دوره پرورش (سن سه روزگی)، جوجه‌های دو گروه به ترتیب از طریق داخل دهانی و داخل چشمی با تعداد ۲۰۰ اسیست هاگدار از سویه پیش رس ایمریا تنلا تلقیح شدند. جوجه‌های گروه چهارم نیز از طریق داخل کلواکی مورد تلقیح تعداد ۱۵۰۰ اسپوروزوئیت همان سویه از ایمریا قرار گرفتند. ۲۸ روز پس از ایمن سازی (انجام واکسیناسیون)، جوجه‌های گروههای واکسینه نشده (شاهد) و واکسینه شده، از راه داخل دهانی با تعداد ۲۰۰۰۰ عدد اسیست سویه وحشی ایمریا تنلا آلوده و مورد چالش قرار گرفتند. در فواصل روزهای پنجم تا نهم بعد از چالش، با قرار دادن یک قطعه مقوای سفید در داخل هر پن، نمونه مدفوع جوجه‌ها به طور روزانه جمع آوری گردید و میزان دفع اسیست در هر گرم از مدفوع با استفاده از روش شناورسازی در محلول شکر اشباع تعیین شد (۶). همچنین پایش(Monitoring) بستر از طریق شمارش تعداد اسیست در هر گرم از بستر با تناوب هفتگی انجام پذیرفت (۱۲). برای این منظور با استفاده از روش تعدیل یافته مک مستر، هر هفته مقدار ۵۰۰ گرم از نمونه بستر موجود در داخل هر پن از کنار دانخوری و آبخوری، جمع آوری شد. در آزمایشگاه، به نمونه بستر جمع آوری شده حدود پنج برابر وزن آن آب اضافه گردیده و به کمک دستگاه همزن، محلول یکنواختی تهیه گردید. پس از عبور دادن محلول از صافی، رسوب موجود درآن با استفاده از دستگاه سانتریفوژ جدا شد. سپس مقدار پنج گرم از رسوب به عنوان نمونه نهایی انتخاب و با افزودن مقدار ۷۰ میلی‌لیتر از محلول شکر اشباع شده، به یک محلول کاملا یکنواخت تبدیل گردید. در نهایت با استفاده از لام مک مستر، تعداد اسیست‌های موجود در هر میلی‌لیتر از نمونه مزبور شمارش گردید. نتایج حاصل از شمارش تعداد اسیست در هر گرم از مدفوع (OPG) با استفاده از روش آنالیز واریانس، تحلیل آماری گردیده و گروههایی که دارای اختلاف معنی‌دار بودند، از طریق آزمون توکی مقایسه شدند.

نتایج

مقایسه میزان دفع اسیست در روشهای مختلف معرفی اجرام کوکسیدیایی به ماکیان از طریق سوند داخل دهانی، قطره چشمی و تلقیح داخل کلواکی در مقایسه با گروه شاهد در تناوب زمانی ۵ تا ۹ روز پس از چالش حاکی از آن بود که اختلاف بسیار معنی داری در گروههای ایمن شده با گروه شاهد وجود داشت (P<۰/۰۱). میانگین تعداد اسیست دفع شده در گروه تلقیح شده از طریق آشامیدنی، بیشترین اختلاف را با گروه شاهد نشان داد (جدول ۱).

نتایج به دست آمده از شمارش تعداد اسیست در بستر نشان دادند که بیشترین تعداد مربوط گروه شاهد و به میزان ۲۵۰۰ عدد اسیست در هر گرم بستر در هفته هفتم بوده است، در حالی که در گروههای ایمن شده حداکثر دفع اسیست کمتر از ۵۱۰ عدد در هر گرم از بستر بود (نمودار ۱).

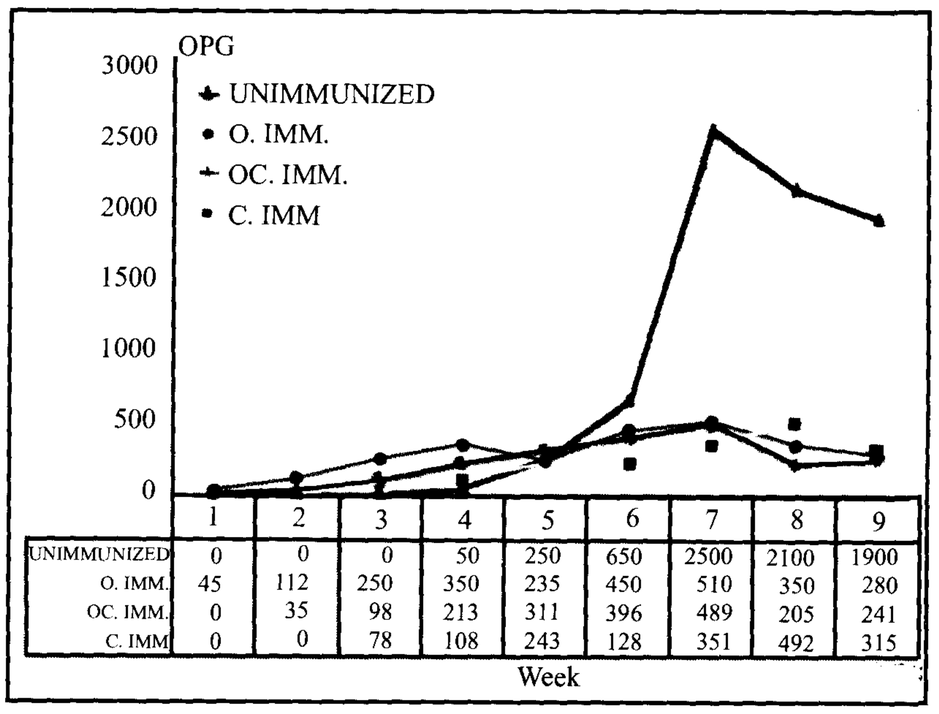
بحث

براساس مطالعات Long در سال ۱۹۷۵ تعداد اسیست در بستر از نظر تخمین وضعیت بیماری در گله هم ارزش با مقدار یا تعداد اسیست در مدفوع می‌باشد. از طرف دیگر با توجه به میزان تلفات بین هفته‌های چهارم تا هشتم دوره پرورش، مرز ۳۶۰۰۰ اسیست در هر گرم از بستر، به عنوان آستانه خطر و یک سطح هشدار دهنده برای تجدید نظر در استراتژی مبارزه

جدول ۱- مقایسه میانگین تعداد اسیست دفع شده در سه روش مختلف ایمن سازی در برابر Eimeria tenella

گروه آزمایشی	روزهای بعد از چالش					میانگین
	۵	۶	۷	۸	۹	
شاهد	۱۴۱۰۰	۲۲۹۵۰	۱۵۳۹۵	۱۷۷۵۰	۴۹۷۵	۱۵۰۳۴/۰ ± ۲۹۳۴/۵[a]
تلقیح چشمی	۲۲۴۰	۱۴۴۰	۴۱۶	۲۶۰	۰	۸۷۱/۲ ± ۴۲۰/۵[b]
تلقیح کلواکی	۱۶۵	۷۵۶	۸۵۵	۷۵۰	۸۲۰	۶۶۹/۲ ± ۱۲۷/۶[b]
آشامیدنی	۰	۴۵	۷۰	۲۶۰	۷۲۰	۲۱۹/۰ ± ۱۳۲/۹[b]

a-b) اعداد نشان داده شده با حروف غیر مشترک دارای اختلاف آماری معنی‌دار هستند.**) P<۰/۰۰۱ .



نمودار ۱- مقایسه میزان دفع الاسیست در طول دوران پرورش.

با کوکسیدیوز تشخیص داده شده است. رهبری و همکاران در سال ۱۳۷۴ در مطالعه انجام یافته بر روی گله اجداد تحت کنترل با ترکیبات ضد کوکسیدیوز، حداکثر تعداد الاسیست در هر گرم از بستر را در هفته هشتم پرورش، به میزان ۶۰۰۰ عدد اعلام نموده‌اند که این معیار تقریبا در تمام دوره پرورش با اندکی نوسان وجود داشته است.

با توجه به اینکه جداسازی ایزولت‌های ایمریا تنلا از گله‌های مرغ مادر از استانهای مازندران، اصفهان، یزد، قزوین و خراسان و تعیین ویژگیهای زیست شناختی و ریخت شناختی (۱) و خصوصیات ژنتیکی آنان از طریق RAPD-PCR(۳) پس از ایجاد تیره تک الاسیستی، نشان داد که بین ایزولت‌های جدا شده از مناطق مختلف به طور متوسط ۷۹ درصد شباهت وجود دارد، بنابراین ایجاد تیره تک الاسیستی از ایزولت‌های دارای قرابت ژنتیکی بیش از ۷۹ درصد می‌تواند تمام ایزولت‌های ناهمسان را وادار به واکنش در مقابل پاسخهای ایمنی نماید.

مطالعات Jeffers در سال ۱۹۷۵ نشان داد که در عفونت ناشی از الاسیست پیشتاز، دوره نهفتگی انگل، بیماریزایی و قدرت تکثیر آن در مقایسه با نسل والد به میزان قابل توجهی کاهش یافته، اما توانایی ایمنی زایی آن باقی می‌ماند. به عبارت دیگر کوتاه شدن طول مراحل تکاملی چرخه زیستی انگل و تقلیل آن به یک نسل شیزوگونی به میزان قابل توجهی دوره نهفتگی انگل را کاهش داده و کوتاهتر شدن سیر تکاملی، همزمان با کاهش قدرت بیماریزایی انگل انجام می‌پذیرد در حالی‌که توانایی ایمنی زایی آن برابر با نسل والد باقی می‌ماند.

در سالهای اخیر روشهای مختلف ایمن سازی ماکیان مورد مطالعه و بحث قرار گرفته‌اند. تلقیح داخل چشمی به عنوان یکی از راههای مهم و مؤثر واکسیناسیون طیور در برابر بیماریهای عفونی شناخته شده است. مجرای اشکی- بینی‌ای (Naso-lacrymal duct) ارتباط بین فضای ملتحمه اطراف چشم را با فضای بینی برقرار می‌کند و این مجرا نیز به فضای دهانی- حلقی (Oeso-pharynx) متصل می‌گردد. بنابراین چنانچه محلول حاوی الاسیست به داخل چشم وارد شود، مقداری از آن، از طریق این مجرا وارد محوطه دهانی می‌گردد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهند که هر سه روش ایمن سازی خوراکی، تلقیح داخل کلواکی و داخل چشمی دارای توانایی کافی جهت تحریک سیستم ایمنی و بروز پاسخهای محافظت کننده می‌باشند که بازتاب آن، به صورت کاهش قابل ملاحظه تعداد الاسیست‌های دفع شده در هر گرم مدفوع متعاقب عفونت بالینی در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد. تلقیح داخل چشمی در جوجه بوقلمونها اولین بار درسال ۱۹۹۶ توسط Chapman انجام پذیرفت که نتایج پاسخهای ایمنی در این روش، قویتر از پاسخ ایمنی از طریق معرفی الاسیست از طریق دهان اعلام شده است (۴). تلقیح داخل کلواکی اسپروزوایت ایمریاهای ماکیان به منظور خالص نمودن عوامل ایمریایی استقرار یافته در قسمتهای انتهایی دستگاه گوارش (ایمریا تنلا، ایمریا نکاتریکس) از یک مجموعه مخلوط الاسیست‌ها توسط Eckert در سال ۱۹۹۶ پیشنهاد شد (۶). در مطالعه حاضر، این راه به عنوان یک روش معرفی الاسیست‌ها مورد استفاده قرار گرفت. از سوی دیگر امروزه به علت تهیه محلولهای شناور کننده الاسیست‌ها، معایب واکسنهای نوشیدنی برطرف شده و این روش به صورت یک روش مناسب مورد استفاده قرار گرفته است. این گونه واکسنها توانایی تحریک سیستم ایمنی و ایجاد پاسخ محافظت کننده را در برابر چالش متجانس نشان داده اند.

به علاوه تأمین محافظت متقاطع نسبی در برابر عفونتهای نامتجانس با ایمریا تنلا به دنبال عفونت اولیه با ایمریا اسرولینا مورد تأیید قرار گرفته است. بنابراین از نتایج به دست آمده از این تحقیقات می‌توان در طراحی ساخت واکسن جهت جلوگیری از خصوصیات بیماریزایی ایمریا تنلا استفاده نمود و میزان الاسیست ایمریا تنلا را تا حد مورد اطمینان و غیر بیماریزا تقلیل داده و به میزبان معرفی نمود، و از این طریق تأثیرات آن را به سیستم ایمنی انتقال داد (۴). قابل ذکر است که امروزه از طریق تزریق زیر جلدی آنتی ژن سطحی اسپروزوایت ایمریا تنلا همراه با ادجوان کامل فروند تحت عنوان واکسنهای تحت واحد(Subunit vaccine) نیز توانسته‌اند تا ۳۰ روز پس از تزریق، ایمنی قابل قبولی به دست آورند (۷). چنانچه ماکیان الاسیست‌ها را به طور عفونت چکه‌ای و پیوسته از سطح بستر برداشت نمایند، ایمنی ایجاد شده پایدار خواهد بود. در غیر این صورت با حذف عفونت چالشی، سطح ایمنی نیز کاهش خواهد یافت. الاسیست‌های تازه دفع شده از ماکیان جهت هاگدار شدن به اکسیژن، رطوبت نسبی، و گرما نیاز دارند اما دمای بالاتر از ۳۵ درجه سانتیگراد ممکن است موجب مرگ آنها شود. همچنین رطوبت بیش از حد بستر سبب تخمیر میکربی و آزاد شدن آمونیاک می‌گردد که بر روی جدار الاسیست‌ها اثر تخریبی دارد و موجب مرگ آنها می‌شود.

با توجه به مطالب فوق، عدم توجه به مدیریت بستر در اواخر دوران پرورش، ممکن است موجب مرطوب شدن ناگهانی بستر شود که این امر خود تأثیر بسیار زیادی در هاگدار شدن ناگهانی تعداد کثیری از الاسیست‌های موجود در بستر خواهد داشت. بنابراین تعیین تعداد الاسیست‌ها در بستر در طول دوره پرورش و ایجاد رطوبت مطلوب و مستمر در آن، متعاقب ایمن سازی توصیه گردیده است (۱۳).

تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب اعتبارات طرح قطب پاتوبیولوژی انجام پذیرفته است.

References

۱. چرخکار، س. (۱۳۸۰): شناسایی گونه‌های ایمریاهای ماکیان در ایران براساس خصوصیات زیست شناختی (بیومتریک). پایان نامه دوره تخصصی بیماریهای طیور شماره ۱۳۳، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.

۲. رهبری، ص.، حسامی، ا.، مهربانی، ح. و اسمعیل نیا، ک. (۱۳۷۴): ارزیابی تعداد الاسیست بستر در کنترل کوکسیدیوز ماکیان. پژوهش و سازندگی، صفحه: ۱۴۳-۱۴۲.

۳. نوذری، ن. (۱۳۸۰): تعیین اختلاف ژنتیکی بین گونه‌ای و بین سویه‌ای ایمریاهای جدا شده از ماکیان ایران توسط پرایمرهای تصادفی به وسیله تکثیر زنجیره DNA. پایان نامه دوره تخصصی انگل شناسی شماره ۱۲۹. دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.

4. Chapman, H.D. (1996): Administration of a coccidial vaccine to day-old turkeys via eye and development of immunity to Eimeria species. 76, 1496-1497.
5. Chapman, H.D.(2000): Practical use of vaccines for the control of coccidiosis in the chicken.World's-Poultry Science Journal, 56, 1:7-20.
6. Eckert, J., Braun, R., Shirley, M. W. and Couder, P.(1995): COST 89-820, Biotechnology guidelines on techniques in coccidiosis Research., Science Research and Development, Environmental Research Program. EUR 16602, 49-50.
7. Gray, R., Banerjee, D.P. and Gupta, S.K.(1999): Immune responses in chickens against Eimeria tenella sporozoite antigen. Veterinary Parasitology, 81:1-10.
8. Jeffers, T.K. (1975): Attenuation of Eimeria tenella through selection for precociousness. J. Parasitology 61: 1083-1090.
9. Jenkins, M.C., Augustin, P.C., Barta, J. R.; Castle, M.D., and Danforth, H. D. (1991): Development of resistance to coccidiosis in the absence of merogonic development using X-irradiated Eimeria acervulina oocysts. Experimental Parasitology, 72:175-180.
10. Johnson, J.K. and Reid, W. M. (1970): Anticoccidial drugs: lesion scoring technique in battery and floor pen experiments with chickens. Experimental Parasitology 28: 4042-4048.
11. Levine, P.P. (1940): Sub-clinical coccidial infection in chickens, Cornell Veterinaria, XXX (2) 127-132.
12. Long, P.L. and Rowell, J.G. (1975): Sampling broiler-house litter for coccidial oocysts. Br. Poult. Sci. 16:538 -598.
13. Williams, R.B., Bushell, A.C., Reperant, J. M., Doy, T.G., Morgan, J.H., Shirley, M.W., Yvort, P., Carr, Margaret, M., Fremont, y. (1996): A survey of Eimeria species in commercially reared chickens in France during 1994, Avian Pathology, 25:113-130.