

Identyfikacja gatunków *Eimeria* spp. występujących u kur i kurcząt brojlerów na terenie Polski^{*)}

ANDRZEJ GAWEŁ, KATARZYNA BOBUSIA, KAMILA BOBREK

Katedra Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

Otrzymano 20.01.2015

Zaakceptowano 04.03.2015

Gaweł A., Bobusia K., Bobrek K.

Identification of *Eimeria* spp. occurring in hens and broiler chickens in Poland

Summary

The aim of the study was to determine the prevalence of coccidiosis and to identify different species of coccidia that caused coccidiosis in flocks of hens in Poland between 2010 and 2013. The material consisted of digestive tracts of broiler chickens and laying hens from all over Poland. The identification of coccidian species was performed by classical methods (location of pathological changes in the gastrointestinal tract and the presence of oocysts in scrapings) and through the isolation and amplification of DNA (PCR). Out of the 139 examined samples from flocks suspected of coccidian infection, the presence of *Eimeria* spp. was confirmed by anatomopathological investigation, microscopic examination, and PCR in 25 cases, representing 18% of the samples. The most frequently diagnosed species were as follows: *E. tenella* (64%), *E. acervulina* (32%), *E. maxima* (8%), and *E. necatrix* (4%). Most cases were caused by a single species of coccidia (92%), and in 8% of cases two species of coccidia were found.

Keywords: coccidiosis, poultry, *Eimeria* spp.

Kokcydioza drobiu grzebiącego, wywoływana przez pasożytujące w obrębie przewodu pokarmowego pierwotniaki z rodzaju *Eimeria*, jest uważana za jedną z najważniejszych chorób drobiu (31). Choroba ta jest pasożytozą, która mimo zakrojonej na szeroką skalę profilaktyki nadal przynosi znaczne straty ekonomiczne (28). Straty w światowej produkcji drobiarskiej wywoływane corocznie przez kokcydiozę przekraczają 3 miliardy dolarów (3). U kur występuje siedem gatunków kokcydii, spośród których pięć – *Eimeria tenella*, *E. necatrix*, *E. brunetti*, *E. acervulina* i *E. maxima* – jest uważanych za gatunki chorobotwórcze. Patogenność *E. mitis* i *E. praecox* jest niejednoznaczna – przez wielu badaczy są one zaliczane do gatunków niepatogennych (24), natomiast coraz więcej danych wskazuje na wpływ tych gatunków na opłacalność produkcji, gdyż zarażenie mimo braku objawów chorobowych i upadków prowadzi do pogorszenia wyników ekonomicznych chowu (14, 26). Kokcydia występujące u kur namnażają się w nabłonku przewodu pokarmowego i w zależności od gatunku kolonizują określony jego odcinek – *E. acervulina* pasożytuje w obrębie dwunastnicy, *E. tenella* w jelitach ślepych,

E. brunetti w prostnicy i jelitach ślepych, a *E. maxima* i *E. necatrix* w jelitach cienkich (4, 18). Kokcydioza może wystąpić w postaci klinicznej, charakteryzującej się zwiększeniem upadków w stadzie i towarzyszącą im biegunką, często z domieszką krwi lub w postaci podklinicznej, objawiającej się jedynie gorszym wykorzystaniem paszy i słabszymi przyrostami masy ciała (34). Przebieg choroby uzależniony jest od gatunku *Eimeria*, jego patogenności, liczby pobranych przez ptaki inwazyjnych oocyst kokcydii, wieku ptaków oraz zakresu ewentualnej odporności na kokcydiozę (24). Diagnostyka kokcydiozy opiera się na zmianach anatomopatologicznych w obrębie poszczególnych odcinków przewodu pokarmowego oraz obecności liczby oocyst w kale. Natężenie inwazji ocenia się na podstawie czterostopniowej skali zmian opracowanej przez Johnsona i Reida (13) oraz liczby oocyst w przeliczeniu na gram kału (33). Różnicowanie gatunków kokcydii może opierać się na metodach klasycznych i genetycznych. Do metod klasycznych, poza zmianami anatomopatologicznymi w obrębie poszczególnych odcinków jelit zalicza się również charakterystykę morfologiczną wraz z morfometrią oocyt oraz określanie czasu sporulacji oocyst (4, 6). Metody te wymagają dużego doświadczenia osób oceniających, są czasochłonne, a w przypadku inwazji mieszanych róż-

^{*)} Publikacja współfinansowana ze środków Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) na lata 2014-2018 dla Wrocławskiego Centrum Biotechnologii.

nicowanie gatunkowe uważane jest za niemożliwe (26, 32, 37), stąd też wielu badaczy uważa, że w przypadku inwazji wywoływanych kilkoma gatunkami *Eimeria*, błędem jest określanie gatunków z użyciem metod klasycznych (21, 22). Identyfikacja gatunków kokcydiów z użyciem metod biologii molekularnej polega na wyizolowaniu materiału genetycznego kokcydiów i przeprowadzeniu reakcji łańcuchowej polimeryzacji (PCR) z użyciem specyficznych gatunkowo starterów. Stwierdzenie produktu amplifikacji wskazuje na obecność materiału genetycznego określonego gatunku *Eimeria* (12, 27, 28, 30, 31, 33). Otrzymanie pozytywnego wyniku w PCR daje gwarancję występowania określonego gatunku w badanym materiale. Szacuje się, że w porównaniu z badaniami molekularnymi skuteczność badań morfologicznych określających występowanie poszczególnych gatunków oocyst wynosi poniżej 50% (11).

Celem badań była identyfikacja gatunków *Eimeria spp.* występujących u kur i kurcząt brojlerów na terenie Polski w latach 2010-2013, u których podejrzewano zarażenie kokcydiami.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły przewody pokarmowe kurcząt brojlerów ze 104 stad (2010 r. – 18, 2011 r. – 38, 2012 r. – 35 i 2013 r. – 13 stad) i kur niosek – z 35 stad (2010 r. – 5, 2011 r. – 14, 2012 r. – 10 i 2013 r. z 6 stad) z terenu 15 województw (od 24 próbek z województwa dolnośląskiego do 2 próbek z województw podlaskiego i świętokrzyskiego). Przewody pokarmowe ptaków (5 szt. z każdego stada) pobierane były przez lekarzy weterynarii, którzy podczas badania sekcyjnego podejrzewali inwazję *Eimeria spp.* Materiał do badań dostarczano do Katedry Epizootologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Próbkę do badań przesyłano w temperaturze 4-8°C w terminie nie dłuższym niż 24 h od pobrania. Dostarczone przewody pokarmowe badano metodą makroskopową, oceniano natężenie zmian patologicznych, posługując się skalą Johnsona-Reida (13) oraz w kierunku obecności oocyst w zeszkrobinach z błony śluzowej dwunastnicy, jelita czczego, biodrowego i ślepego oraz końcowego (4). W celu wykrycia materiału genetycznego *Eimeria spp.* przeprowadzono badania z wykorzystaniem klasycznej metody PCR. Do izolacji materiału genetycznego pobierano wycinki jelit z badanych wcześniej metodą makroskopową fragmentów przewodu pokarmowego. Fragmenty jelit przechowywano w temp. -20°C do momentu dalszych badań. Całkowite DNA z tkanek, w tym również DNA *Eimeria spp.* pochodzące z form rozwojowych kokcydiów izolowano z użyciem zestawu Genomic-Mini (A&A Biotechnology, Polska) zgodnie z instrukcją producenta. Łańcuchową reakcją polimeryzacji przeprowadzono z użyciem gotowej mieszaniny PCR Master Mix (A&A Biotechnology, Polska), w obecności specyficznych gatunkowo starterów dla *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. tenella*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. maxima*, *E. necatrix* (tab. 1). Startery syntezowane były w firmie Genomed Polska. Reakcję PCR przeprowadzono przy użyciu termocyklera iCycler z firmy Bio-Rad. Profil termiczny reakcji PCR ustalono

Tab. 1. Wykaz primerów użytych w doświadczeniu (2)

Nazwa primera	Sekwencja (5'-3')	Gatunek <i>Eimeria</i>
EAF EAR	GGC TTG GAT GAT GTT TGC TG CGA ACG CAA TAA CAC ACG CT	<i>Eimeria acervulina</i>
ETF ETR	AAT TTA GTC CAT CGC AAC CCT CGA GCG CTC TGC ATA CGA CA	<i>Eimeria tenella</i>
ENF ENR	TAC ATC CCA ATC TTT GA TCG GGC ATA CTA GCT TCG AGC AAC	<i>Eimeria necatrix</i>
EPP EPR	CAT CAT CGG AAT GGC TTT TTG A AAT AAA TAG CGC AAA ATT AAG CA	<i>Eimeria praecox</i>
EMaF EMaR	GTG GGA CTG TGG TGA TGG GG ACC AGC ATG CGC TCA CAA CCC	<i>Eimeria maxima</i>
EMIF EMIR	TAT TTC CTG TCG TCG TCT CGC GTA TGC AAG AGA GA TCG GGA	<i>Eimeria mitis</i>

eksperymentalnie. Produkty reakcji PCR rozdzielano na 1,5% żelu agarozowym (Prona Abo Polska) z dodatkiem Midori Green (Nippon Genetics, Abo Polska) w buforze TAE (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) i wizualizowano przy użyciu zestawu do dokumentacji żeli Gel-Doc (Bio-Rad Laboratories Inc., USA).

Wyniki i omówienie

Wśród 139 badanych próbek jelit z użyciem klasycznej metody PCR ocenionych uprzednio pod kątem zmian anatomopatologicznych zgodnie z kryteriami skali Johnsona-Reida, pozyskanych ze stad drobiu w latach 2010-2013, zarażenie *Eimeria spp.* potwierdzono w przypadku 25 próbek. Stanowiło to 18% wszystkich badanych próbek. W badanych stadach kurcząt brojlerów 22 próbki spośród 104 uznano za dodatnie, co stanowi 21% w tej grupie produkcyjnej (2010 r. – 4, 2011 r. – 7, 2012 r. – 8 i w 2013 r. – 3 próbki), a w stadach kur niosek 3 spośród 35 próbek były dodatnie, co stanowi 8,5% (2010 r. – 0, 2011 r. – 2, 2012 r. – 1, i w 2013 r. – 0 próbek). U kur niosek na podstawie zmian anatomopatologicznych i PCR stwierdzono przypadek zarażenia *E. necatrix*, *E. tenella* oraz mieszane zarażenie *E. acervulina* i *E. tenella*, natomiast u kurcząt brojlerów w 13 stadach potwierdzono inwazję *E. tenella*, w 6 *E. acervulina*, w 2 *E. maxima* oraz w 1 przypadku mieszaną inwazję *E. tenella* i *E. acervulina*. Ogółem obecność materiału genetycznego *E. tenella* stwierdzono w 16 próbkach (64%), *E. acervulina* w 8 (32%), *E. maxima* w 2 (8%) i *E. necatrix* w 1 próbce (4%). Najczęściej obserwowano monoinwazje (92%) i tylko w przypadku 2 próbek stwierdzono równoczesne zarażenie *E. acervulina* i *E. tenella*. Badaniem PCR nie stwierdzono obecności materiału genetycznego *E. brunetti*, *E. mitis* i *E. praecox*. Wyniki badań metodą PCR w dużym stopniu pokrywały się z badaniami mikroskopowymi na obecność oocyst w zeszkrobinach z nabłonka jelit. Badaniem mikroskopowym w 19 przypadkach na 25 wyników dodatnich uzyskanych metodą PCR potwierdzono obecność oocyst w zeszkrobinach z błony śluzowej jelit. Natężenie zmian anatomopatologicznych w obrębie przewodu pokarmowego ptaków, u których techniką

Tab. 2. Identyfikacja gatunkowa *Eimeria* spp. z użyciem PCR, badań anatomopatologicznych i mikroskopowych

Nr próbek	Zidentyfikowane gatunki <i>Eimeria</i> spp. z użyciem metody PCR	Zmiany anatomopatologiczne wg skali Johnsona-Reida (13)				Obecność oocyst w zeszkrobinach			
		dwunastnica	jelito czcze	jelito biodrowe	jelito ślepe	dwunastnica	jelito czcze	jelito biodrowe	jelito ślepe
1	<i>E. tenella</i>				2				+
2	<i>E. tenella</i>				2				+
3	<i>E. tenella</i>				2				+
4	<i>E. tenella</i>				3				+
5	<i>E. tenella</i>				3				+
6	<i>E. tenella</i>				3				+
7	<i>E. tenella</i>				2				+
8	<i>E. tenella</i>				3				+
9	<i>E. tenella</i>				3				+
10	<i>E. tenella</i>				3				+
11	<i>E. tenella</i>				4				+
12	<i>E. tenella</i>				3				+
13	<i>E. tenella</i>				3				+
14	<i>E. tenella</i>				3				+
15	<i>E. tenella</i> <i>E. acervulina</i>	2			2	+			+
16	<i>E. tenella</i> <i>E. acervulina</i>	2			2	+			+
17	<i>E. acervulina</i>	3				+			
18	<i>E. acervulina</i>	3				+			
19	<i>E. acervulina</i>	3				+			
20	<i>E. acervulina</i>	2				+			
21	<i>E. acervulina</i>	2				+			
22	<i>E. acervulina</i>	2				+			
23	<i>E. maxima</i>		2	2			+	+	
24	<i>E. maxima</i>		2	2			+	+	
25	<i>E. necatrix</i>		3	3			+	+	

PCR potwierdzono zarażenie kokcydiami, przedstawiono w tab. 2. Wynika z niej, iż obserwowane zmiany dotyczyły głównie jelit ślepych i wynosiły w 6 przypadkach 2 punkty, a w 9 przypadkach 3 punkty w skali Johnsona i Reida. Najwyższe natężenie zmian anatomopatologicznych, ocenione na 4 punkty, wystąpiło u 1 osobnika. U osobników zarażonych *E. acervulina* zmiany anatomopatologiczne w obrębie dwunastnicy w 5 przypadkach oceniono na 2 punkty, a u 3 ptaków na 3 punkty. Z kolei u ptaków zarażonych *E. maxima* natężenie zmian u obu osobników wynosiło 2 punkty, zaś u jednego ptaka zarażonego *E. necatrix* – 3 punkty.

Z przeprowadzonych badań wynika, iż zarażenia kokcydiami potwierdzono u 18% stad, u których obserwowano zmiany patologiczne w obrębie przewodu pokarmowego, zobrazowane w tabeli 2. Fakt, iż na

podstawie badań mikroskopowych zeszkrobin nabłonka błony śluzowej jelit stwierdzono 19, a w badaniach genetycznych 25 próbek dodatnich świadczy, iż badanie przy użyciu techniki PCR pozwala na wczesne potwierdzenie zarażenia kokcydiami, jeszcze przed pojawieniem się oocyst wykrywanych podczas badania mikroskopowego zeszkrobin z nabłonka jelit. W badaniu PCR z użyciem specyficznych starterów określa się nie tylko obecność kokcydii, ale i gatunek pasożyta (16). Z przeprowadzonych badań wynika, iż najczęściej występującymi gatunkami były *E. tenella*, która zdiagnozowana została na podstawie zmian anatomopatologicznych, a następnie potwierdzona z użyciem PCR, w 64% badanych próbek i *E. acervulina* stwierdzona w 32% próbek. Aż 92% przypadków zarażeń spowodowanych było jednym gatunkiem kokcydii. Dominacja poszczególnych gatunków kokcydii jest zmienna i zależy nie tylko od obszaru, ale może również na tym samym terenie zmieniać się w czasie. W latach siedemdziesiątych, w ówczesnym województwie opolskim izolowano *E. tenella* w 61,4% przypadków, *E. maxima* i *E. necatrix* w 30,1% oraz *E. acervulina* w 3,4% (17). W tym samym czasie na terenie Dolnego Śląska stwierdzono, że kokcydioza kur wywołana była głównie przez *E. maxima* – 48% przypadków, a także *E. tenella* – 29,5% i *E. acervulina* – 24,9%, natomiast udział *E. brunetti* i *E. necatrix* nie przekraczał 7% (25). Trzydzieści lat później na terenie Dolnego Śląska u kurcząt i kur najczęściej występowały cztery gatunki kokcydii: *E. acervulina*, *E. tenella*, *E. maxima* i *E. necatrix*, przy czym najczęściej diagnozowane były *E. acervulina* – 83% i *E. tenella* – 65% przypadków (2). Stwierdzenie w badaniach własnych wysokiego odsetka zarażeń wywołanych przez *E. tenella* i *E. acervulina* nie odbiega od danych uzyskanych przez innych badaczy. Z doniesień naukowych z różnych krajów, m.in. Czech, Francji, Holandii, Iranu, Korei, Norwegii, Rumunii i Turcji wynika, że najczęściej stwierdzanymi gatunkami kokcydii, podobnie jak w naszym kraju, były *E. acervulina* i *E. tenella* (7-11, 15, 19, 36). Uważa się, że za częste występowanie tych kokcydii odpowiadają ich cechy gatunkowe – wysoki potencjał rozrodczy oraz niska immunogenność, które sprawiają, że w krótkim czasie dochodzi do zasiedlenia środowiska dużą liczbą oocyst tych gatunków, co sprzyja wystąpieniu klinicznej postaci kokcydiozy (20, 29, 35). Istotny wpływ na wyniki badań może mieć również rodzaj materiału pobranego do badań – wycinki przewodu pokarmowego czy próbki kału. Wielu badaczy wykazywało przewagę inwazji wywołanych przez jeden lub dwa gatunki kokcydii, gdy materiałem do badań były przewody pokarmowe ptaków (1, 2, 7, 10). W przypadku, gdy materiał do badań stanowiły próbki kału, dominującymi okazywały się zarażenia kilkoma gatunkami kokcydii (19, 23, 36). Zależność tę potwierdzają różnice między wynikami badań własnych i zespołu Doner i Szeleszczuk (5), które prowadzone były w podobnym czasie. W przypadku badań wła-

nych materiał do badań stanowiły przewody pokarmowe ptaków z wyraźnymi zmianami anatomopatologicznymi, a w badaniach zespołu Doner i Szeleszczuk – próbki kału. W badaniach własnych wykazano dominację zarażeń 1 gatunkiem kokcydiów z wyraźną przewagą *E. tenella*, natomiast badania Doner i Szeleszczuka wykazały, iż na terenie kraju u kurczą brojlerów dominowały zarażenia kilkoma gatunkami (*E. acervulina*, *E. mitis* i *E. maxima*), a zarażenia *E. tenella* stanowiły 29%. Odmienne wyniki uzyskali Gyorke i wsp. (9), którzy badając w kale występowanie gatunków kokcydiów w dużych przemysłowych fermach brojlerów kurzych, stwierdzili przewagę zarażeń jednym gatunkiem kokcydiów. Duży odsetek zarażeń *E. tenella* wykazany w badaniach własnych tej samej grupy produkcyjnej ptaków może wynikać również z charakterystycznych zmian, które obserwowane są w jelitach ślepych podczas zarażenia (krwista treść jelit ślepych). Także zmiany anatomopatologiczne wywoływane przez *E. acervulina*, są charakterystyczne i łatwo rozpoznawalne (13). Występowanie łatwych do rozpoznania zmian makroskopowych miało bez wątpienia wpływ na powzięcie podejrzenia kokcydiozy i wybór materiału do badań.

Reasumując, przeprowadzone badania wykazały, iż na terenie Polski u kur najczęściej występują 4 gatunki kokcydiów: *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. necatrix* i *E. tenella*. Spośród tych gatunków dominującymi okazały się *E. tenella* – 64% i *E. acervulina* 32%. W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono obecności *E. brunetti*, *E. mitis*, *E. praecox*.

Piśmiennictwo

1. Al-Natoura A., Suleimana M., Abo-Shehada M.: Flock-level prevalence of Eimeria species among broiler chicks in northern Jordan. *Prev. Vet. Med.* 2002, 53, 305-310.
2. Antonik S., Okulewicz A., Gawel A., Mazurkiewicz M.: Występowanie gatunków Eimeria u kur na terenie Dolnego Śląska. *Med. Weter.* 2008, 64, 886-888.
3. Clark E., Tomley F., Eimeria CIDLID Consortium, Blake D.: Population, genetic and antigenic diversity of Eimeria: prospects for novel vaccines. XI International Coccidiosis Conference 2014, September 2014, Dresden, Germany, s. 26-30.
4. Conway D. P., McKenzie M. E.: Poultry coccidiosis diagnosis and testing procedures. Pfizer, Inc., New York, N.Y. 2008.
5. Doner S., Szeleszczuk P.: Prevalence of Eimeria spp. In broiler chicken flocks in Poland. XI International Coccidiosis Conference 2014, September 2014, Dresden, Germany, s. 26-30.
6. Goodwin M., Brown J., Bounous D.: Use of microscopic lesion scores, gross lesion scores and oocyst count scores to detect Eimeria maxima in chickens. *Avian Pathol.* 1998, 27, 405-408.
7. Graat E., van der Kooij E., Frankena K., Henken A., Smeets J., Hekerman M.: Quantifying risk factors of coccidiosis in broilers using on-farm data based on a veterinary practice. *Prev. Vet. Med.* 1998, 33, 297-308.
8. Guven E., Beckstead R., Kar S., Vatensever Z., Kararer Z.: Molecular identification of Eimeria species of broiler chickens in Turkey. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 2013, 60, 245-250.
9. Gyorke A., Pop L., Cozma V.: Prevalence and distribution of Eimeria species in broiler chicken farms of different capacities. *Parasite* 2013, 20, 50.
10. Hadipour M., Olyae A., Naderi M., Azad F., Nekouie O.: Prevalence of Eimeria species in scavenging native chickens of Shiraz, Iran. *Afr. J. Poultry Farming* 2013, 1, 034-036.
11. Haug A., Gjevne A., Thebo P., Mattsson J., Kaldhusdal M.: Coccidial infections in commercial broilers: epidemiological aspects and comparison of Eimeria species identification by morphometric and polymerase chain reaction techniques. *Avian Pathol.* 2008, 37, 161-170.
12. Jenkins M., Miska K., Kloop S.: Application of polymerase chain reaction based on ITS1 rDNA to speciate Eimeria. *Avian Dis.* 2006, 50, 110-114.
13. Johnson J., Reid W. M.: Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp. Parasitol.* 1970, 28, 30-36.
14. Jorgensen W., Stewart N., Jeston P., Molloy J., Blight G., Dalgliesh R.: Isolation and pathogenicity of Australian strains of Eimeria praecox and Eimeria mitis. *Australian Vet. J.* 1997, 75, 592-595.
15. Kucera J.: Identification of Eimeria species in Czechoslovakia. *Avian Pathol.* 1990, 19, 59-66.
16. Lalonde L. F., Gajadhar A. A.: Detection and differentiation of coccidian oocysts by real-time PCR and melting curve analysis. *J. Parasitol.* 2011, 97, 725-730.
17. Latala A.: Badania nad rodzajem Eimeria u drobiu z terenu woj. opolskiego. *Med. Weter.* 1972, 28, 146-151.
18. Lawn A., Rose M.: Mucosal transport of Eimeria tenella in the cecum of the chicken. *J. Parasitol.* 1982, 68, 1117-1123.
19. Lee B., Kim W., Jeong J., Yoo J., Kwon Y., Jung B., Kwon J., Lillehoj H., Min W.: Prevalence and cross-immunity of Eimeria species on Korean chicken farms. *J. Vet. Med. Sci.* 2010, 72, 985-989.
20. Long P., Johnson J., McKenzie M., Perry E., Crane M., Murray P.: Immunisation of young broiler chickens with low level infections of Eimeria tenella, E. acervulina or E. maxima. *Avian Pathol.* 1986, 15, 271-278.
21. Long P. L., Joyner L. P.: Problems in the identification of species of Eimeria. *J. Protozool.* 1984, 31, 535-541.
22. Lopez G., Figuerola J., Sorruget R.: Time of day, age and feeding habits influence coccidian oocyst shedding in wild passerines. *Int. J. Parasitol.* 2007, 37, 559-564.
23. Luu L., Bettridge J., Christley R., Melese K., Blake D., Dessie T., Wigley P., Desta T., Hanotte O., Kaiser P., Terfa Z., Collins M., Lynch S.: Prevalence and molecular characterisation of Eimeria species in Ethiopian village chickens. *BMC Vet. Res.* 2013, 9:208. doi: 10.1186/1746-6148-9-208.
24. Mazurkiewicz M.: Choroby drobiu. Wydawnictwo Akademii Rolniczej we Wrocławiu 2011, s. 599-611.
25. Mazurkiewicz M., Staszewski S., Zieliński A.: Obserwacje nad występowaniem kokcydiozy u kur na terenie Dolnego Śląska. *Biul. VI Zjazdu PTNW, Wrocław 1978*, s. 633.
26. Meireles M., Roberto L., Riera R.: Identification of Eimeria mitis and Eimeria praecox in broiler feces using polymerase chain reaction. *Rev. Bras. Cienc. Avic. [online]* 2004, 6, 249-252.
27. Patra G., Ayub Ali M., Chanu V., Jonathan L., Joy L. K., Prava M., Ravindran R., Das G., Devi I.: PCR based diagnosis of Eimeria tenella infection in broiler chicken. *Int. J. Poultry Sci.* 2010, 9, 813-818.
28. Reid A., Blake D., Ansari H., Billington K., Browne H., Bryant J., Dunn M., Hung S., Kawahara F., Miranda-Saavedra D., Malas T., Mourier T., Naghra H., Nair M., Otto T., Rawlings N., Rivaller P., Sanchez-Flores A., Sanders M., Subramaniam C., Tay Y., Woo Y., Wu X., Barrell B., Dear P., Doerig C., Gruber A., Ivans A., Parkinson J., Rajandream M., Shirley M., Wan K., Berriman M., Tomley F., Pain A.: Genomic analysis of the causative agents of coccidiosis in domestic chickens. *Genome Res.* 2014, 10, 1676-1685.
29. Rose M., Long P.: Immunity to four species of Eimeria in fowls. *Immunology* 1962, 5, 79-92.
30. Schnitzler B., Thebo P., Mattsson J., Tomley F., Shirley M.: Development of a diagnostic PCR assay for the detection and discrimination of four pathogenic Eimeria species of the chicken. *Avian Pathol.* 1998, 490-497.
31. Su Y., Fei A., Tsai F.: Differential diagnosis of five avian Eimeria species by polymerase chain reaction using primers derived from the internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequence. *Vet. Parasitol.* 2003, 117, 221-227.
32. Thebo P., Lunden A., Uggla A., Hooshmand-Rad P.: Identification of seven Eimeria species in Swedish domestic fowl. *Avian Pathol.* 1998, 27, 613-617.
33. Velkers F., Blake D., Graat E., Vernooy J., Bouma A., de Jong M., Stegeman J.: Quantification of Eimeria acervulina in faeces of broilers: comparison of McMaster oocyst counts from 24 h faecal collections and single droppings to real-time PCR from cloacal swabs. *Vet. Parasitol.* 2010, 169, 1-7.
34. Williams R. B.: A compartmentalised model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry. *Int. J. Parasitol.* 1999, 29, 1209-1229.
35. Williams R. B.: Quantification of the crowding effect during infections with the seven Eimeria species of the domesticated fowl: its importance for experimental designs and the production of oocyst stocks. *Int. J. Parasitol.* 2001, 31, 1056-1069.
36. Williams R., Bushell A., Reperant J., Doy T., Morgan J., Shirley M., Yvore P., Carr M., Fremont Y.: A survey of Eimeria species in commercially-reared chickens in France during 1994. *Avian Pathol.* 1996, 25, 113-130.
37. Woods W., Whithear K., Richards D., Anderson G., Jorgensen W., Gasser R.: Single-strand restriction fragment length polymorphism analysis of the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) for six species of Eimeria from chickens in Australia. *Int. J. Parasitol.* 2000, 30, 1019-1023.