

# Kokcydioza kur

Sylwia Doner, Piotr Szeleszczuk, Artur Żbikowski

z Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie

## Chicken coccidiosis

Doner S., Szeleszczuk P., Żbikowski A., Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw Life Science University – SGGW

This overview presents information on the current situation regarding coccidiosis of chickens in Poland. Coccidiosis is an important intestinal disease in chickens caused by apicomplexan protozoa in the genus *Eimeria*. Multiple *Eimeria* species infect the chicken, the most significant in the broiler industry being *E. maxima*, *E. tenella*, and *E. acervulina*. Currently, one of the leading methods of coccidiosis prevention still remains chemoprophylaxis based on coccidiostat products. Due to the phenomenon of resistance to specific coccidiostats, these compounds should be used with coccidiostatic programs, including rotational programs or exchange of the programs used today. The vaccines against this disease are increasingly being put into practice, hoping to solve many problems of coccidiosis control. They have responded to threats related to increasing resistance to available coccidiostats and consumer concerns related to the residues of these compounds in meat or eggs. The clinical signs of coccidiosis may or may not be accompanied by large numbers of oocysts being shed in the faeces. The most commonly used diagnostic methods are oocyst counts and lesion scoring. Some anticoccidial sensitivity testing (AST) is available, but not often used. Currently, methods of molecular diagnostics are increasingly used. It is necessary to continue to introduce alternative methods of coccidiosis prophylaxis and new solutions in immunoprophylaxis. The challenge for the industry is to convince consumers that Polish poultry products are safe for their health, high quality and cheap, and the (metaphylactic) use of coccidiostats, remains for the time being necessary in modern poultry husbandry in the EU.

**Keywords:** coccidiosis, chickens, control, diagnostics.

**K**okcydioza drobiu stanowi wciąż aktualny problem w produkcji drobiarskiej, pomimo powszechnego przekonania zarówno lekarzy weterynarii, producentów pasz oraz producentów drobiu, że stosowane od wielu lat dodatki paszowe w postaci kokcydiostatyków gwarantują zabezpieczenie produkcji drobiarskiej przed dotkliwymi stratami ekonomicznymi powodowanymi przez tę jednostkę chorobową. W warunkach krajowych zagrożenie tą inwazją jest szczególnie duże u kurcząt rzeźnych oraz u kur stad reprodukcyjnych i ptaków odchowywanych na nioski jaj konsumpcyjnych. W ostatnich kilku latach żywe zainteresowanie patologów drobiu budzi również, ze względu na wzrost zagrożenia, kokcydioza indyków rzeźnych (1). Jak groźna jest to choroba, świadczy między innymi fakt, iż praktycznie prawie wszystkie stada brojlerów oraz stada towarowe i reprodukcyjne kur i indyków w Polsce od ponad 40 lat muszą być zabezpieczane przed kokcydiozą. Brojlery kurze otrzymują paszę z kokcydiostatykami prawie przez cały okres odchowu (5–6 tygodni), zaś stada nieśne przez cały okres wychowu (do 16 tyg. życia). W ostatnich

15 latach wprowadzane są do krajowej praktyki drobiarskiej szczepienia kurcząt hodowlanych towarowych nieśnych oraz stad reprodukcyjnych. Ostatnie 10 lat wskazuje również na coraz powszechniej stosowane szczepienia przeciwko kokcydiozie w stadach brojlerów kurzych. Jakkolwiek, biorąc pod uwagę skalę produkcji, nie jest to nadal zbyt często spotykane. Z całą pewnością można skonstatować, że nie ma drugiej takiej jednostki chorobowej w drobiarstwie, która wymagałaby ciągłej oraz tak długotrwałej i kosztownej profilaktyki.

Problem zapobiegania kokcydiozie w Polsce nie jest zasadniczo objęty jakąkolwiek koordynacją. Rozproszenie podmiotów produkujących pasze i premiksy, obniżająca się rentowność tej branży i niezwykle ostra konkurencja nie skłaniają do podejmowania działań nad koordynacją działań w zakresie racjonalizacji programów chemioprophylaktyki kokcydiozy. Obecna polityka, czy raczej brak polityki w zakresie stosowania preparatów kokcydiostatycznych w produkcji drobiarskiej prowadzi do strat powodowanych przez te pasożyty, a wynikają one wprost z obniżenia efektów ekonomicznych. Liczba preparatów stosowanych w profilaktyce tej choroby nie ulega zwiększeniu a w warunkach terenowych stwierdza się mniej lub bardziej widoczne narastanie zjawiska lekooporności kokcydii na stosowane obecnie kokcydiostatyki, prowadzące do pojawiania się przypadków klinicznych (1).

## Znaczenie kokcydiozy w sektorze produkcji brojlerów kurzych

Polska od 5 lat jest liderem w produkcji mięsa drobiowego wśród krajów Unii Europejskiej, wyprzedzając w tej gałęzi rolnictwa takie państwa, jak Wielka Brytania, Francja czy Niemcy. Według danych Eurostatu produkcja mięsa drobiowego w Polsce wyniosła w roku 2017 – 2343,55 tys. ton, a w roku 2018 2545,14 tys. ton (2). Najbardziej znaczącą część tej produkcji stanowią brojlery kurze. Według danych Krajowej Izby Producentów Drobiu i Pasz w Poznaniu liczba wylężonych piskląt brojlerów kurzych w 2018 roku wynosiła 1243,0 mln sztuk. Tak wysoka wielkość produkcji świadczy o jej wciąż rosnącej intensyfikacji, a tym samym o większym narażeniu na występowanie różnych jednostek chorobowych, w tym również kokcydiozy. Jak podaje Shirley i wsp. (3) światowe koszty związane z kokcydiozą w produkcji drobiarskiej mogą sięgać nawet 2400 mln dolarów na rok. Z kolei według Szeleszczuka i wsp. (4) dane szacunkowe Unii Europejskiej wskazują, że całkowity koszt związany z występowaniem kokcydiozy, które ponosi producent kurcząt rzeźnych to około 0,05 euro/ brojlera, w którym, aż 70–80% jest wynikiem kokcydiozy subklinicznej,

co w rezultacie przy stadzie liczącym 20 000 brojlerów daje stratę rządu 1000 euro. Kokcydioza subkliniczna stanowi jeden z największych problemów intensywnego chowu drobiu, o czym mogą świadczyć liczne badania wskazujące na częste występowanie gatunków *Eimeria* spp., które są za nią odpowiedzialne – głównie *E. acervulina* i *E. maxima* (5, 6, 7, 8). Biorąc pod uwagę wciąż wzrastającą produkcję drobiarską, szczególnie w sektorze kurcząt rzeźnych, należy przypuszczać, że narażenie na wystąpienie kokcydiozy będzie coraz większe. Tym bardziej, że szacuje się, że koszty związane z kokcydiozą subklinikzną wynoszą nawet 70% nakładów ponoszonych z powodu tej jednostki chorobowej (9). Ponadto nie opracowano skutecznych metod diagnostycznych, które pozwoliłyby na szybką diagnostykę subklinicznej postaci choroby. W dostępnym piśmiennictwie opisuje się próby poszukiwania korelacji pomiędzy oceną stopnia inwazji za pomocą dostępnych technik diagnostycznych a wynikami produkcyjnymi, co ma ułatwić wykrycie kokcydiozy subklinicznej (10). Dodatkowo problem strat z powodu tej choroby może być pogłębiany z powodu narastania oporności na dostępne na rynku kokcydiostatyki. Zjawisko wystąpienia oporności przewidział Horton-Smith już w 1951 r., a w latach kolejnych opisano wielokrotnie brak skuteczności działania określonych kokcydiostatyków (11, 12, 13, 14, 15, 16). Biorąc pod uwagę powyższe czynniki należy zdecydowanie stwierdzić, że kokcydioza nie tylko stanowi problem w produkcji drobiarskiej w chwili obecnej, ale również będzie stanowiła dla niej duże wyzwanie w najbliższych latach.

### Czynnik etiologiczny i cykl rozwojowy kokcydiozy

Kokcydioza jest chorobą pasożytniczą, której czynnikiem etiologicznym są pierwotniaki *Eimeria* spp. Pierwotniaki te należą do typu Apicomplexa, rządu Eucoccidiorida, rodziny Eimeriidae (17). Do tego samego rządu zalicza się również pasożyty, takie jak *Cryptosporidium* spp., *Sarcocystis* spp., czy też *Toxoplasma* spp. Rodzaj *Eimeria* zawiera 1700 opisanych gatunków pierwotniaków występujących zarówno u kręgowców jak i bezkręgowców. Pierwotniaki te są szeroko rozpowszechnione na całym świecie. W większości przypadków pasożyty te są bardzo specyficzne gatunkowo. U kur, jak dotąd opisano 7 gatunków kokcydiozy: *Eimeria acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* oraz *E. tenella*.

Cykl rozwojowy pierwotniaków z rodzaju *Eimeria* u kur jest cyklem monoksenicznym związanym z przewodem pokarmowym gospodarza. Formę inwazyjną stanowią oocysty, będące kształtu okrągłego bądź mniej lub bardziej owalnego, o długości 15,6–30,5 μm i szerokości 14,2–20,7 μm, w zależności od gatunku. Oocysty wydalane są do środowiska zewnętrznego wraz z kałomoczem. Nie stanowią one jednak jeszcze formy inwazyjnej. Dopiero pod wpływem warunków otoczenia, takich jak obecność tlenu, odpowiednio wysoka temperatura oraz wilgotność przechodzą proces sporogonii, będący procesem mejotycznym. W wyniku tego procesu w oocyście

powstają 4 sporocysty, a w każdej nich po 2 sporozoitów. Czas sporulacji również zależy od gatunku i wynosi w przybliżeniu około 24 h. Dopiero wysporulowana oocysta ma zdolność przejścia pełnego cyklu rozwojowego. Po spożyciu przez gospodarza, w tym przypadku kurę, wysporulowanej oocysty, dochodzi do nadtrawienia otoczek ją osłaniających, przy udziale trypsyny oraz żółci, co w rezultacie prowadzi do uwolnienia sporozoitów, które bardzo szybko penetrują komórki nabłonka jelit (18). Sporozoity, takich gatunków, jak *E. brunetti* czy też *E. praecox*, przechodzą swój rozwój w komórkach, w otoczeniu których doszło do ich bezpośredniego uwolnienia. Natomiast sporozoity takich gatunków, jak na przykład *E. tenella* czy *E. acervulina* są transportowane do krypt innych odcinków jelit (19, 20). W komórkach nabłonka jelitowego sporozoity przekształcają się w schizonty I generacji, które przechodzą liczne podziały i tworzą merozoity. Merozoity wnikają do kolejnych komórek nabłonka jelitowego i tworzą schizonty II generacji, będące znacznie większe od poprzednich. Z dzielących się schizontów II generacji powstaje kolejne, drugie pokolenie merozoitów. Merozoity wnikają ponownie do następnych komórek nabłonka, a dzieląc się, dają początek schizontom III generacji lub też gametocytom, które zapoczątkowują etap rozmnażania płciowego, przebiegającego również w komórkach nabłonka jelitowego. Do gametocytów zalicza się makrogametę oraz mikrogametę. Mikrogameta, zapładniając makrogametę, daje początek zygotie, która zostaje otoczona osłonką i w rezultacie staje się oocystą. Oocysta zostaje następnie wydalona do środowiska zewnętrznego, zamykając w ten sposób cykl rozwojowy (21).

### Patogeneza kokcydiozy

*E. necatrix*, *E. tenella*, *E. brunetti* są gatunkami bardzo patogennymi i odpowiadają za wystąpienie postaci klinicznej choroby. Postać kliniczna choroby objawia się osowiałością, osłabieniem, sennieścią, nastroszonymi piórami, ptaki często przybierają postawę „sępa”. Kałomocz początkowo ceglasty lub żółtawy, przechodzący w czekoladowo-mahoniowy ze strzępami świeżej krwi (*E. tenella*). Przy inwazji *E. necatrix*, *E. brunetti* – kałomocz jest brunatnoróżowy, płynny, pienisty lub brązowy o konsystencji pasty, obserwuje się też wzmożone pragnienie. Zmiany anatomopatologiczne w przebiegu klinicznym zarażenia *E. tenella* mają postać rozdęcia i zapalenia krwotocznego błony śluzowej jelit ślepych, w ich świetle stwierdza się obecność dużej ilości skrzepów, charakterystyczną zmianą jest także bledźność mięśni szkieletowych. Przy inwazji najbardziej patogennym gatunkiem kokcydiozy kur, jakim jest *E. necatrix*, obserwuje się silne rozdęcie jelita cienkiego, które przybiera barwę czerwonomalinową lub sinoczerwoną oraz zapalenie krwotoczno-martwicze błony śluzowej jelita. Inwazja *E. brunetti* przebiega z zapaleniem włóknikowym w steku, jelicie grubym oraz w początkowej części jelit ślepych i jelita biodrowego. Ze względu na charakterystyczne objawy kliniczne i zmiany sekcyjne diagnostyka postaci klinicznej choroby jest

ułatwiona. Z kolei inwazje *E. acervulina* oraz *E. maxima* przyczyniają się do wystąpienia postaci subklinicznej choroby. Postać subkliniczna kokcydiozy objawia się obniżeniem przyrostów masy ciała oraz zwiększeniem współczynnika konwersji paszy (ilości paszy wykorzystanej do uzyskania 1 kg masy ciała), co w rezultacie powoduje słabszy wynik ekonomiczny odchowu. Niemniej w tym przypadku, zarówno producentowi, jak i lekarzowi weterynarii trudno jest zauważyć bezpośredni wpływ występowania *Eimeria* spp. w stadzie na parametry ekonomiczne. Trudności diagnostyczne wynikają głównie z tego, że wiele innych jednostek chorobowych może negatywnie wpływać na końcowe wyniki produkcyjne cyklu produkcyjnego. *E. mitis* oraz *E. praecox* uważa się za gatunki słabo patogenne. W piśmiennictwie jednak znajdują się nowsze doniesienia, które wskazują na zwiększone ryzyko występowania postaci subklinicznej choroby, w przypadku jednoczesnego występowania *E. maxima* oraz *E. praecox* (22). W obrazie mikroskopowym przy zarażeniu kokcydiami dominuje naciek komórek jednojądrzastych oraz granulocytów wraz z obrzękiem oraz pogrubieniem błony śluzowej jelit. U kurcząt w nacieku komórkowym dominują limfocyty T CD8<sup>+</sup>, które często są widoczne w postaci dużych skupisk w kryptach jelit oraz blaszce właściwej błony śluzowej (20).

### Metody profilaktyki kokcydiozy

Obecnie jedną z głównych metod profilaktyki kokcydiozy wciąż pozostaje chemioprolaktyka z zastosowaniem preparatów kokcydiostatycznych. Sytuacja taka utrzymuje się już od ponad 60 lat. Pierwsze badania nad kokcydiostatykami dotyczyły działania nie tylko przeciwbakteryjnego, ale również przeciw pasożytniczego sulfonamidu (23). Wyniki tych prac stały się podwaliną pod dalsze poszukiwania kolejnych kokcydiostatyków, co skutkowało pojawieniem się nowych substancji. Z czasem zorientowano się, że na ryzyko pojawiania się problemów z kokcydiozą ma bardzo duży wpływ odpowiednie zarządzanie stadem, związane z unikaniem nadmiernego zagęszczenia, utrzymaniem właściwego stanu ściółki oraz zapewnieniem ptakom właściwej wentylacji (24). Niewątpliwie istotną rolę odgrywa również sytuacja epidemiologiczna na fermie oraz występowanie chorób bakteryjnych lub wirusowych, szczególnie o charakterze immunosupresyjnym. W ostatnich kilkunastu latach większego znaczenia nabiera również immunoprofilaktyka kokcydiozy. Dzieje się tak za sprawą głośnych dyskusji w Parlamencie Europejskim, który podjął decyzję o zakazie stosowania kokcydiostatyków i histomonostatyków, jako dodatków paszowych już w 2003 roku, wyznaczając okres 10 lat na wypracowanie nowych rozwiązań w tym zakresie. Wówczas rozpoczęła się w krajach Unii Europejskiej szeroka kampania na rzecz promowania szczepionek i innych alternatywnych metod profilaktyki kokcydiozy. Mimo to jednak zdecydowana większość producentów mięsa drobiowego w kraju pozostała nadal przy chemioprolaktyce z zastosowaniem kokcydiostatyków. Kokcydiostatyki w mięsie drobiowym

to bardzo popularny temat modnych i opiniotwórczych blogów o żywieniu (1). Blogerzy podnoszą, że „Unia Europejska, zakazując od 1 stycznia 2013 roku stosowania kokcydiostatyków w produkcji drobiu, przychyliła się do twierdzenia, że stosowanie kokcydiostatyków w produkcji drobiu może być niebezpieczne dla ludzi. Problem w tym, że zakaz ten nie był respektowany w krajach unijnych nawet przez 1 dzień” (<https://zdrowiejemy.com.pl/antybiotyki-kurczakach>). Rzeczywiście lobby walczące ze stosowaniem preparatów chemicznych w produkcji zwierzęcej było na tyle silne, że – jak wspomniano wcześniej – 17 lat temu Unia Europejska „Uwzględniając wszystkie ryzyka stosowania kokcydiostatyków, od 1 stycznia 2013 roku rozporządzeniem 1831/2003/EC podjęła decyzję o zakazie dalszego ich dodawania do pasz dla drobiu (i innych zwierząt)”. W ciągu 10 lat miano opracować nowe rozwiązania, które miały to umożliwić. Obiektywnie należy stwierdzić, że wydano olbrzymie fundusze na poszukiwanie tych rozwiązań, ale żadne z nich nie okazało się na tyle skuteczne, by wprowadzenie tego rozporządzenia w życie było realne. Już w roku 2008, w sprawozdaniu Komisji Europejskiej dla Rady i Parlamentu Europejskiego w sprawie stosowania kokcydiostatyków i histomonostatyków jako dodatków paszowych złożonym zgodnie z art. 11 rozporządzenia (WE) nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 września 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt znalazł się bardzo kategoryczny zapis, że: „Obecnie, w nowoczesnej produkcji drobiu, niezbędne jest stosowanie kokcydiostatyków jako środka zapobiegawczego w zakresie kontroli kokcydiozy. Praktyka ta przyczynia się w znaczącym stopniu do ochrony zarówno zdrowia, jak i dobrostanu zwierząt dzięki zapobieganiu chorobom, która jest obecna we wszystkich gospodarstwach. W obecnych warunkach w Europie produkcja bez kokcydiostatyków uległaby bardzo drastycznym zaburzeniom ekonomicznym, a skutkiem zaprzestania stosowania kokcydiostatyków byłoby pozbawienie konsumentów w UE dostępu do mięsa drobiowego, indyczego i króliczego, produkowanego zgodnie z wysokimi normami UE w zakresie bezpieczeństwa i dobrostanu”.

Wymienione przez Komisję alternatywy (szczepionki, leki weterynaryjne, produkty ziołowe), jak wykazano, nie zapewniają obecnie tak wysokiego poziomu profilaktyki, jak stosowanie kokcydiostatyków w charakterze dodatków paszowych. W sprawozdaniu podniesiono, że wypróbowano również inne potencjalne alternatywy, na przykład stosowanie zakwaszaczy i enzymów lub zawiesin prebiotyków lub mikroorganizmów probiotycznych w celu utworzenia barier chroniących wejście do przewodu pokarmowego, aby zapobiec zarażeniu. Stosuje się również bardzo wyspecjalizowane środki dezynfekujące, biorąc pod uwagę fakt, że oocysty są w wysokim stopniu odporne na środki najczęściej używane. Dalej w swoim raporcie Komisja stwierdza, że „Przedmiotem badań jest również rozwój oporności na oocysty w drodze selekcji genetycznej zwierząt, jednakże perspektywa realizacji celu uzyskania opornych ras w krótkim czasie wydaje się odległa. Nie istnieją dotychczas dostateczne

dane potwierdzające skuteczność stosowania wspomnianych wcześniej alternatywnych środków zapobiegania kokcydiozie. Szczepionki są specyficzne dla określonego gatunku i nie są dostępne dla wszystkich grup produkcyjnych. Dostępne w ograniczonej ilości leki weterynaryjne są stosowane wyłącznie w celach leczniczych, natomiast wykorzystywanie ich w celach profilaktycznych mogłoby skutkować wytworzeniem na nie oporności, a także upośledzić ich skuteczność jako leków. Z powodu wszechobecności i niezmienności cech ryzyka choroby zapobieganie jej jest bardziej właściwe niż jej leczenie. Komisja jest zdania, że nie należy zmieniać obecnej sytuacji oraz że wprowadzony system jest dobrze dostosowany do istniejących warunków, gdyż zapewnia konsumentom wysoki poziom bezpieczeństwa, a także właściwie chroni zdrowie i dobrostan zwierząt oraz środowisko, zapewniając jednocześnie należyte ramy, w których podmioty rynku mogą prowadzić swoją działalność. Komisja Europejska będzie w dalszym ciągu monitorować opracowywanie nowych substancji i technik zapobiegania chorobom”.

W dniu 13 listopada 2012 r. Główny Lekarz Weterynarii dr Janusz Związek wydał interpretację art. 11 Rozporządzenia (WE) Nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 września 2003 roku dotyczącą kokcydiostatyków i histomonostatyków stosowanych jako dodatki paszowe w żywieniu zwierząt. Dr Związek pisał w tym dokumencie, że „zgodnie z interpretacją art. 11 Rozporządzenia (WE) nr 1831/2003 otrzymaną od Pana dr. Jamesa Moynagh przewodniczącego Sekcji: Żywnienie Zwierząt DG SANCO stan prawny wynikający z art. 11 Rozporządzenia (WE) nr 1831/2003 nie stanowi podstawy dla służb kontrolnych w Polsce oraz innych państwach członkowskich do podejmowania działań zmierzających do wyeliminowania z obrotu i stosowania w żywieniu zwierząt tych dodatków paszowych. Obecne brzmienie art. 11 Rozporządzenia (WE) Nr 1831/2003 nie może być interpretowane jako zakaz stosowania z dniem 31 grudnia 2012 roku kokcydiostatyków i histomonostatyków”. Sytuacja w tym zakresie nie uległa zmianie do dnia dzisiejszego i kokcydiostatyki nadal stanowią ważny element intensywnej produkcji drobiarskiej.

## Kokcydiostatyki

Według powszechnie przyjętego schematu Allena i Fetterera (18) kokcydiostatyki dzieli się na trzy kategorie, uwzględniające:

1. kokcydiostatyki chemiczne – powstające w wyniku chemicznej syntezy, o mechanizmie działania wpływającym na metabolizm pasożytów (na przykład amprolium, będące antagonistą witaminy B1);
2. kokcydiostatyki jonoforowe – będące produktem fermentacji *Streptomyces* spp. lub *Actinomadura* spp. Kokcydiostatyki jonoforowe prowadzą do zaburzeń w transporcie głównie takich jonów jak sód, potas oraz wapń. W grupie tej wyróżnia się trzy podgrupy:
  - jonofory monowalentne (monenzyna, narazy-na, salinomycyna),

- jonofory monowalentne glikozydowe (maduramycyna, semduramycyna),
  - jonofory diwalentne (lasalocid);
3. kokcydiostatyki dwuskładnikowe zawierające zarówno kokcydiostatyk chemiczny jak i jonoforowy, na przykład połączenie narazyyny z nikarbazyną lub maduramycyny z nikarbazyną.

Ze względu na zjawisko oporności na określone kokcydiostatyki (13, 14, 15, 16, 25) związki te powinny być stosowane z uwzględnieniem tak zwanych programów kokcydiostatycznych, do których zaliczamy stosowane dziś programy rotacyjne lub programy wymienne. W przypadku programów rotacyjnych zazwyczaj stosowany jest jeden kokcydiostatyk przez okres trzech cykli produkcyjnych, a następnie jest on zmieniany na inny kokcydiostatyk, zwykle należący do innej grupy. Przy czym należy pamiętać, że w przypadku kokcydiostatyków chemicznych oporność na nie narasta stosunkowo szybko, co zostało opisane przez McManusa i wsp. już w 1968 r. (26). Cytowani autorzy wykazali, iż na przykład takie związki jak chinolony, do których należy między innymi kokcydiostatyk chemiczny – dekokwinat, są preparatami stosunkowo bezpiecznymi, nie wpływającymi na produkcję jaj, ich jakość, czy też na współczynnik wykorzystania paszy, ale niestety oporność na nie narasta stosunkowo szybko. Dlatego też w programach rotacyjnych zazwyczaj uwzględniane są tylko raz w roku. Wybór programu kokcydiostatycznego będzie zależał również od typu produkcyjnego ptaków. W przypadku odchovu ptaków przeznaczonych na nioski towarowe czy też stada reprodukcyjne kluczowym celem będzie osiągnięcie przez nie właściwej odporności, a więc istotną rolę będzie odgrywał poziom inwazji *Eimeria*, pozwalający na uruchomienie specyficznych mechanizmów obronnych, co osiąga się, stosując kokcydiostatyki jonoforowe, które umożliwiają rozwój kokcydiom (27). Natomiast w przypadku brojlerów kurzych sprawą najistotniejszą jest osiągnięcie największej masy ciała, przy niskim współczynniku wykorzystania paszy, wraz z minimalizacją wpływu kokcydiozy na wynik produkcyjny (28). W programach wymiennych (shuttle programs) z kolei stosuje się inny kokcydiostatyk w mieszance paszowej typu starter oraz inny kokcydiostatyk w mieszance typu grower. Zazwyczaj w mieszance starter stosowany jest kokcydiostatyk chemiczny, a następnie kokcydiostatyk jonoforowy. Jakkolwiek na wybór kokcydiostatyków w programie będzie miało wpływ wiele czynników, związanych między innymi z historią programów kokcydiostatycznych na fermie, czy też z pewnymi cechami niektórych związków, jak na przykład zwiększone ryzyko wystąpienia stresu cieplnego w okresach letnich w przypadku nikarbazyny (29).

W niektórych przypadkach wykorzystuje się również badania oceniające występowanie oporności na kokcydiostatyki oparte o testy wrażliwości *in vivo* – anticoccidial sensitivity test (AST), przeprowadzane w warunkach laboratoryjnych. Niestety wykonanie tych badań jest bardzo czasochłonne i kosztowne, wymaga również zastosowania ptaków wolnych od specyficznych patogenów (specific pathogen free

– SPF), co dodatkowo zwiększa koszty tej procedury diagnostycznej. Badania tego typu zostały przeprowadzone między innymi przez Staneva i wsp. (30). Wykorzystano w nich w sumie 134 izolaty terenowe *Eimeria* spp., uzyskane z różnych ferm zlokalizowanych w Europie, na Środkowym Wschodzie i w Afryce. Każdy test obejmował grupę ptaków niezarażonych (kontrolną), grupę ptaków zarażonych oraz grupy ptaków doświadczalnych, otrzymujących w paszy kokcydiostatyk w maksymalnej zarejestrowanej dawce. Po zarażeniu wyizolowanymi szczepami *Eimeria* spp. oceniano między innymi przyrosty masy ciała, spożycie paszy, ilość wydalanych oocyst oraz określano indeksy skoringowe. Po analizie statystycznej wyników oszacowano skuteczność poszczególnych kokcydiostatyków w stosunku do określonych gatunków *Eimeria* spp. Badania te wykazały, że kokcydiostatyk jonoforowy – lasalocid, dwa kokcydiostatyki chemiczne – robenidyna i dekokwinat oraz kombinacja dwóch związków – narazyna–nikarbazyna spowodowały poprawę przyrostów masy ciała o więcej niż 40%. Jak wspomniano wcześniej, należy także zaznaczyć, że w przypadku zastosowania kokcydiostatyków jonoforowych dochodzi do pewnego poziomu zarażenia, które w rezultacie doprowadza do rozwoju odporności ptaków. Efekt ten jest zależny od dawki oocyst przyjętej przez ptaka (31, 32). Opisana metoda badania skuteczności działania kokcydiostatyków nie umożliwia jednak uzyskania szybkiej odpowiedzi w warunkach terenowych na pytanie dotyczące skuteczności działania programu kokcydiostatycznego, a tym samym nie uwzględnia również innych czynników, które mogą mieć wpływ na sytuację epidemiologiczną związaną z zarażeniem kokcydiozą. Tylko nieliczne badania poświęcone były określaniu ilości oocyst *Eimeria* spp. w próbkach kałomoczu lub ściółce w stadach objętych różnymi programami zwalczania kokcydiozy (31, 33).

### Szczepienia przeciwko kokcydiozie

Pomimo wciąż dominującej chemioprophylaktyki kokcydiozy, szczepionki przeciwko tej chorobie są coraz częściej wprowadzane do praktyki. Stały się one odpowiedzią na zagrożenia związane z rosnącą opornością na dostępne kokcydiostatyki oraz obawy konsumentów związane z pozostałością tych związków w mięsie lub jajach. Niemniej istotne jest jednak, że – jak podają Chapman i Jeffers (34) – szczepienia przeciwko kokcydiozie mogą być ważnym elementem skutecznego programu rotacyjnego, przyczyniając się do ponownej wrażliwości *Eimeria* spp. na kokcydiostatyki. Uważa się, że jest możliwa rekombinacja genetyczna pomiędzy szczepami szczepionkowymi wrażliwymi na kokcydiostatyki i szczepami *Eimeria* spp., które nabrały cech oporności (35), a to z kolei może przyczynić się do ponownej skuteczności kokcydiostatyków, których efektywność została obniżona ze względu na oporność (36).

Historia szczepień przeciwko kokcydiozie sięga roku 1952, kiedy w USA zarejestrowano pierwszą, żywą szczepionkę Coccivac<sup>®</sup>, jednak postęp prac nad szczepionkami na przestrzeni lat był stosunkowo

wolny (36). Prace naukowe prowadzone nad procesami związanymi z odpowiedzią immunologiczną przeciwko *Eimeria* spp. wykazały duże zróżnicowanie tej odpowiedzi w zależności od gatunku kokcydii i sugerowały, że sporozycyty różnych gatunków rozpoznają zróżnicowane struktury komórkowe gospodarza podczas procesu zarażenia (20, 37). Dodatkowo badania dotyczące przebiegu odpowiedzi immunologicznej gatunków o największym znaczeniu ekonomicznym wykazały różnice pomiędzy nimi na przykład w ekspresji cytokin, które odgrywają jedną z najważniejszych ról podczas kształtowania odporności (38). Utrudniło to skonstruowanie szczepionki, która powodowałaby jednoczesne wytworzenie odporności na wszystkie najważniejsze gatunki *Eimeria* spp. Stąd też obecnie najczęściej stosowanymi szczepionkami przeciwko kokcydiozie na rynku europejskim są szczepionki żywe atenuowane, zawierające wysporulowane oocysty kilku gatunków – różnych w zależności od szczepionki. Szczepionki te zawierają w swoim składzie różne dawki oocyst wysporulowanych, poddanych wcześniej atenuacji za pomocą wielokrotnego pasażowania pasożyta na zarodkach kurzych (na przykład *E. tenella* w szczepionce Livacox<sup>®</sup>) lub na drodze selekcji szczepów „wcześnie dojrzewających”, tak zwanych „precocious lines” (pozostałe gatunki w szczepionce Livacox<sup>®</sup> oraz wszystkie szczepy w szczepionce Paracox<sup>®</sup>; 39, 40). Szczepy „wcześnie dojrzewające” charakteryzują się skróceniem endogennej fazy cyklu rozwojowego ze względu na zmniejszenie ilości pokoleń schizogonii, czego konsekwencją jest również zmniejszenie ilości wydalanych oocyst z jednoczesnym uzyskaniem odporności przez ptaki (40, 41). Na rynku europejskim jest dostępna również szczepionka Hipracox<sup>®</sup>, w której także znajdują się szczepy „wcześnie dojrzewające”.

Należy zaznaczyć, że pierwsze szczepionki przeciwko kokcydiozie były szczepionkami żywymi, które nie podlegały żadnym modyfikacjom w celu zmniejszenia ich patogenności. Do takich szczepionek należą na przykład Immucox<sup>®</sup>, Nobilis<sup>®</sup> Cox ATM czy też Inovocox<sup>®</sup>. Szczepionki te nadal są dostępne na wielu rynkach. Liczne zwłaszcza w ostatnich latach są publikacje dotyczące zróżnicowania genetycznego *Eimeria* spp. (42, 43) oraz antygenów powierzchniowych i związanych z organellami kokcydii (44, 45). Badania te zaowocowały pracami nad szczepionkami rekombinowanymi (46, 47). Niemniej szczepionki te nadal nie są powszechnie wykorzystywane i wymagają dalszych badań dotyczących mechanizmów odpowiedzi immunologicznej gospodarza, uwzględniających różnice pomiędzy kolejnymi gatunkami kokcydii (48). Jednym z istotnych w praktyce czynników warunkujących efektywność szczepionek żywych przeciwko kokcydiozie jest technika szczepienia. Badania Tensy i wsp. (49) wykazały, że zarówno podanie szczepionek w sprayu jak i w żelu jest równie efektywne, choć dla ich stabilności korzystniejsze jest zastosowanie nośnika żelowego. Warto podkreślić, że opracowano również szczepionkę podjednostkową zawierającą antygeny gametocytów *E. maxima* (50), przeznaczoną do szczepienia kur w stadach reprodukcyjnych, której efektem jest uzyskanie odporności biernej kurcząt

brojlerów w kierunku trzech ekonomicznie ważnych gatunków pasożyta. W niektórych krajach ta szczepionka znalazła szerokie zastosowanie.

W praktyce wiele trudności sprawia również ocena skuteczności szczepionek przeciwko kokcydiozie. Zwraca się uwagę głównie na zasiedlanie ściółki oocystami, co ma powodować większe zasiedlenie środowiska oocystami szczepionkowymi i tym samym zwiększać ich populację poprzez stopniowe ograniczanie szczepów terenowych (36). Jak podaje Williams i wsp. (33), liczba oocyst w ściółce w stadzie ptaków szczepionych przeciwko kokcydiozie w piątym dniu życia osiągała największą wartość w 21 i 35 dniu życia ptaków, w porównaniu do grupy ptaków otrzymujących preparaty kokcydiostatyczne, w której największa ilość oocyst została odnotowana tylko w 35 dniu życia i przekraczała wartość zaobserwowaną w stadzie ptaków szczepionych. Z kolei badania Dardi i wsp. (51) wykazały największą liczbę oocyst w ściółce tylko w 21 dniu.

### Substancje roślinne

Substancje roślinne wchodzące w skład ekstraktów ziołowych są od wielu lat przedmiotem badań mających na celu określenie ich przydatności w kontroli kokcydiozy. W dostępnej literaturze opisuje się między innymi korzystny efekt działania przeciwkokcydiozowego artemizyny, której źródłem jest bylica roczna (*Artemisia annua*). Niestety efekt ten był zróżnicowany w odniesieniu do poszczególnych gatunków *Eimeria* spp. i zależał między innymi od dawki, długości stosowania oraz rodzaju zastosowanego surowca. Zastosowanie suszu tej rośliny w ilości 5% dawki pokarmowej przez okres około 3 tygodni ograniczyło znacząco zmiany wywoływane przez *E. tenella*, ale nie miało już takiego działania w przypadku takich gatunków jak *E. acervulina* lub *E. maxima* (52). Działanie ograniczające inwazję *Eimeria* spp. opisano także w przypadku kurkumy (53) oraz oregano (54). Z kolei Augustine i wsp. (55) opisali korzystne działanie betainy – pochodnej aminokwasu – glicyny, którą pierwszy raz wykryto w burakach cukrowych (*Beta vulgaris*). Wykazali oni, że 0,15% dodatek betainy i salinomycyna w dawce 66 ppm wpływają korzystnie na przyrosty masy ciała ptaków i ograniczają ich śmiertelność, zmniejszając nasilenie inwazji *E. acervulina* i *E. tenella*. W piśmiennictwie opisano również działanie immunomodulujące śliwy japońskiej (*Prunus salicina*) (56), jeżówki purpurowej (*Echinacea purpurea*; 54) oraz wyciągów z niektórych grzybów, na przykład *Fomitella fraxinea* (57).

### Prebiotyki oraz probiotyki

Opisując metody profilaktyki kokcydiozy, nie sposób pominąć immunomodulującego działania preparatów będących prebiotykami oraz probiotykami. Ich korzystny wpływ związany jest głównie z korzystnym zasiedleniem mikrobiologicznym przewodu pokarmowego, co ma wpływ na jego status immunologiczny, a więc wpływa pośrednio na mechanizmy odpornościowe w przebiegu kokcydiozy (58). Probiotyki to

preparaty zawierające w swym składzie bakterie pożądanego w przewodzie pokarmowym. Korzystny efekt działania tych preparatów został opisany w odniesieniu do takich bakterii jak *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus reuteri* czy też *Bacillus subtilis*. Produkty prebiotyczne to produkty oparte głównie o mannooligosacharydy (MOS), pozyskiwane ze ścian komórek drożdży *Sacharomyces cerevisiae*. U drobiu MOS wpływają na rozwój *Bifidobacteria* spp. i *Lactobacillus* spp. w przewodzie pokarmowym ptaków oraz zmniejszają ryzyko wystąpienia potencjalnie niekorzystnego wpływu bakterii *Enterobacteriaceae* spp. (59). Opisano kilka doświadczeń świadczących o korzystnym wpływie MOS, objawiającym się redukcją zmian między innymi *E. acervulina*, czy też *E. maxima* (60, 61), jednak zagadnienie to wymaga dalszych badań.

### Diagnostyka kokcydiozy

#### Klasyczne metody diagnostyczne

Podstawowa diagnostyka zarażeń *Eimeria* spp. w stadach kur opiera się wciąż głównie na punktowej ocenie zmian w jelitach – lesion scoring, opracowanej przez Johnson i Reida (62). W metodzie tej wykorzystuje się fakt, że poszczególne gatunki kokcydii powodują charakterystyczne zmiany w określonych odcinkach jelit. Mimo że technika ta została opisana już blisko 50 lat temu, nadal stanowi ona podstawową metodą szacowania skuteczności działania programu kokcydiostatycznego w warunkach fermowych. Wymaga ona jednak dużego doświadczenia od osoby przeprowadzającej to badanie oraz wiedzy dotyczącej występowania innych jednostek chorobowych, które mogą powodować zmiany mogące wpływać na właściwą ocenę. W praktyce gatunkami najczęściej ocenianymi tą metodą są *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*, *E. necatrix* oraz *E. brunetti*. Podczas oceny uwzględnia się badany odcinek jelit (*E. acervulina* – dwunastnica, *E. maxima* oraz *E. necatrix* – jelito czcze, *E. tenella* – jelito ślepe, *E. brunetti* – jelito proste) oraz określa się stopień nasilenia zmian w zakresie od 0 – brak zmian do 4 – zmiany powodujące śmierć ptaka. *E. praecox* oraz *E. mitis* uważa się za kokcydii słabo patogenne, które nie powodują charakterystycznych zmian w jelitach. Aczkolwiek w wyniku zarażenia eksperymentalnego w badaniach Williamsa (63) *E. mitis* powodowała stan zapalny jelita, biegunkę oraz gorszy współczynnik wykorzystania paszy, co sugeruje, że powinna również podlegać monitoringowi. Dodatkowo, w przypadku wątpliwości podczas oceny gatunkowej, wykorzystuje się badanie zeszkobin z jelit z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego, w celu identyfikacji schizontów oraz oocyst. Ze względu na to, że oocysty każdego gatunku zostały dokładnie opisane pod względem morfologicznym, uwzględniając ich długość oraz szerokość, dokonanie oceny mikroskopowej może ułatwić określenie gatunku *Eimerii*. Tradycyjnym potwierdzeniem zarażenia kokcydiami może być również badanie histopatologiczne.

Do klasycznych metod diagnostycznych zalicza się również badanie ilościowe z wykorzystaniem komory

McMastera, szeroko stosowane w laboratoriach parazytologicznych. Wynikiem tego badania jest określenie liczby oocyst w 1 gramie kałomoczu (oocysts per gram of feces - OPG). Metoda ta może być również pomocna w ocenie presji środowiskowej oocyst kokcydii (64), ułatwiając badanie indywidualnego kształtowania się siewstwa oocyst do środowiska, co może dać wskazówki dotyczące skuteczności programu kokcydiostatycznego. Jak dotąd opisano kilka modyfikacji tej metody (65).

## Diagnostyka molekularna

### Metody elektroforetyczne rozdzielające izoenzymy (MEE) i Southern blotting

Pierwszymi metodami zaawansowanej diagnostyki *Eimeria* spp. były metody elektroforetyczne rozdzielające izoenzymy (multilocus enzyme electrophoresis - MEE). Metoda ta opierała się na elektroforezie w żelu skrobiowym enzymów pasożyta, takich jak dehydrogenaza mleczanowa i izomeraza glukozyfosforanowa (66). Niestety metoda ta jest bardzo pracochłonna, wymaga dużej ilości pasożytów i jest dosyć trudna do przygotowania, a ponadto nie daje możliwości różnicowania szczepów, stąd obecnie nie jest stosowana. We wczesnych latach 90. ubiegłego wieku wykazano, że do różnicowania gatunkowego *Eimerii* można wykorzystać również metodę Southern blotting, która stała się podstawą do genotypowania, wykorzystując próbki rDNA oraz rRNA (67). Polimorfizm długości oznaczonych fragmentów DNA wpływał na wybór endonukleazy restrykcyjnej, a polimorfizm położenia docelowej sekwencji warunkował różnice w genetycznym „odcisku palca” (fingerprinting) zwanym polimorfizmem długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP - restriction fragments length polymorphism). Badania z wykorzystaniem metody Southern blotting wykazały wysoki poziom polimorfizmu wewnątrzgatunkowego, ale niestety wymagały dużej liczby pasożytów oraz specjalistycznego wyposażenia, co ograniczyło także zastosowanie RFLP nawet w badaniach naukowych.

Rozwój technik wykorzystujących elektroforezę w zmiennym polu elektrycznym (PFGE - pulsed field gel electrophoresis) oraz elektroforezę w naprzemiennym polu elektrycznym (FIGE - field inversion gel electrophoresis) umożliwił rozdział całego chromosomalnego DNA pasożytów, w tym *E. tenella* (68). Pomimo że techniki te umożliwiły identyfikację polimorfizmu między- i wewnątrzgatunkowego *Eimeria* spp., nie znalazły one również zastosowania w badaniach rutynowych, ze względu na konieczność zastosowania bardzo specjalistycznego sprzętu oraz potrzebę wykorzystania dużej ilości pasożytów (69).

### Reakcja łańcuchowej polimerazy (PCR) i metody pokrewne

Z czasem opracowano również metody diagnostyki *Eimeria* spp. oparte o reakcję łańcuchowej polimerazy (PCR) wykorzystując zespół kodujący 3 podjednostek rRNA wraz z zewnętrznymi i wewnętrznymi

transkrybowanymi sekwencjami rozdzielającymi (70). Zaletą tego zespołu jest współistnienie sekwencji umiarkowanie zmiennych (ITS-1, ITS-2) obok bardziej konserwatywnych. Metoda ta jest obecnie powszechnie wykorzystywana w badaniach molekularnych nad kokcydiozą. Początkowo umożliwiała ona wykrycie tylko jednego gatunku podczas jednej reakcji, szybko jednak opracowano panele (multiplex PCR) umożliwiające wykrycie wszystkich siedmiu gatunków (71). W diagnostyce molekularnej wykorzystywano również losową amplifikację polimorficznych fragmentów DNA (random amplification of polymorphic DNA - RAPD PCR). Metodą tą można zidentyfikować każdy gatunek eimerii oraz rozróżnić niektóre szczepy (72). Dodatkowo do sekwencjonowania wybrano zestaw produktów RAPD PCR, tworząc nowy panel markerów nazwanych SCAR (sequence-characterised amplified region - charakterystyczne sekwencje regionów amplifikacji; 73). Z panelu markerów SCAR wybrano jeden charakterystyczny dla danego gatunku, aby przygotować specyficzne testy PCR dla wszystkich siedmiu gatunków, które następnie zostały wykorzystane w reakcji multiplex PCR, która umożliwia wykrycie wszystkich siedmiu gatunków w jednej próbce (74). Niestety wciąż niewiele jest dostępnych publikacji, które dostarczają informacji o zróżnicowaniu gatunkowym z wykorzystaniem tej metody, mimo jej stosunkowo niskiego kosztu i łatwej interpretacji.

Warto zaznaczyć, że opracowano również metodę ilościowej amplifikacji DNA (qPCR) w czasie rzeczywistym (75). Metoda ta opiera się również na podgrupie markerów SCAR. Każdy z testów w kierunku określonego gatunku eimerii jest ukierunkowany na pojedynczą kopię genu z granicą wykrywalności między jednym a dziesięcioma genami pasożyta. Pozwala to na wykrycie ilości DNA, będącej równą jednej lub dwóm oocystom lub pojedynczemu schizontowi. Jak podaje Blake (69), wykorzystując testy real-time PCR, można uzyskać informację nie tylko dotyczącą obecności gatunków pasożyta, ale również częstości ich występowania, co może wskazywać na ryzyko narażenia stada na kokcydia. Niestety test ten jest nadal dość kosztowny, co zdecydowanie ogranicza jego zastosowanie w rutynowej praktyce laboratoryjnej.

### Amplifikacja kwasów nukleinowych w warunkach izotermicznych (LAMP)

Barkway i wsp. (76) opisali protokół wykonania testu LAMP w kierunku *Eimeria* spp., porównując go z tradycyjną punktową oceną zmian w jelitach oraz multiplex PCR. Test LAMP jest stosunkowo prostą metodą, ponieważ w przeciwieństwie do tradycyjnej metody PCR przebiega w stałych warunkach temperaturowych. Wykorzystując ten test, można uzyskać wynik w ciągu dwóch godzin, nie dysponując specjalistycznym sprzętem. Dodatkowo, wykorzystując barwnik wbudowujący się w DNA, można ocenić wynik testu okiem nieuzbrojonym. Pomimo wielu zalet tego testu jak dotąd nie opisano jego wykorzystania na szerszą skalę w praktycznej diagnostyce kokcydiozy.

## Podsumowanie

Podsumowując, należy zdecydowanie podkreślić, że w naszym kraju konieczne są szersze działania na rzecz udoskonalania programów profilaktyki kokcydiozy ze strony wszystkich podmiotów związanych z produkcją drobiarską. Zaniechanie tych działań doprowadzić może do nasilenia strat powodowanych przez te pierwotniaki. Konieczne jest dalsze wprowadzanie alternatywnych sposobów profilaktyki inwazji i nowych rozwiązań w immunoprofilaktyce. Należy jednak pamiętać, że cały czas dokonuje się rozwój zaawansowanych technik biologii molekularnej, który stopniowo umożliwia poznanie genetycznej charakterystyki tych pasożytów, co być może będzie skutkowało powstaniem nowej generacji szczepionek przeciwko kokcydiozie. Tymczasem jednak branża drobiarska, mając do dyspozycji dostępne metody profilaktyczne, powinna wypracować ogólnokrajowe programy profilaktyki, włączając do dyskusji również opiniotwórcze środowiska konsumenckie i starać się popularyzować wiedzę z zakresu zarówno kokcydiostatyków, jak i szczepionek przeciwko kokcydiozie.

## Piśmiennictwo

- Szeleszczuk P.: Kokcydioza drobiu w Polsce i wybrane aspekty jej profilaktyki - raport 2018. *Polskie Drobiarstwo - Suplement Zdrowie*. 2018, 13, 85–100.
- Dane statystyczne serwisu Unii Europejskiej Eurostat; <http://ec.europa.eu/eurostat/tgm/table.do?tab=table&plugin=1&language=en&pcode=tag00043;14.05.2019, godz. 08.02>.
- Shirley M.W., Smith A.L., Tomley F.M.: The biology of avian *Eimeria* with an emphasis on their control by vaccination. *Adv. Parasitol.* 2005, 60, 285–330.
- Szeleszczuk P., Doner S., Nerc J.: Wstępna próba oceny strat finansowych spowodowanych kokcydiozą w produkcji kurcząt brojlerów. W: Szeleszczuk P., Gaweł A. (Red.): *I Międzynarodowa Konf. Tech. EIMERIANA AVIA. Kokcydioza drobiu - aktualne wyzwania AD 2016*. Wrocław 26–27.02.2016, 89–98.
- Moraes J.C., França M., Sartor A.A., Bellato V., de Moura A.B., de Lourdes Borba Magalhães M., de Souza A.P., Miletti L.C.: Prevalence of *Eimeria* spp. in broilers by multiplex PCR in the southern region of Brazil on two hundred and fifty farms. *Avian Dis.* 2015, 59, 277–281.
- Morris G.M., Woods W.G., Grant R.D., Gasser R.B.: The application of a polymerase chain reaction (PCR)-based capillary electrophoretic technique provides detailed insights into *Eimeria* populations in intensive poultry establishments. *Mol. Cell Probes.* 2007, 21, 288–294.
- Ter Veen C., de Bruijn N.D., Dijkman R., de Wit J.J.: Prevalence of histopathological intestinal lesions and enteric pathogens in Dutch commercial broilers with time. *Avian Pathol.* 2017, 46, 95–105.
- Doner S., Szeleszczuk P.: Prevalence of *Eimeria* spp. in broiler chicken flocks in Poland. *XI Int. Coccidiosis Conf.*, September 2014, Dresden, Germany, s. 26–30.
- De Gussem M.: Coccidiosis in poultry: review on diagnosis, control, prevention and interaction with overall gut health. *Proc. of the 16th E. Symp. on Poultry Nutrition*, Strasbourg, 26–30 August 2007, 253–261.
- Haug A., Gjevne A.G., Skjerve E., Kaldhusdal M.: A survey of the economic impact of subclinical *Eimeria* infections in broiler chickens in Norway. *Avian Pathol.* 2008, 37, 333–341.
- Horton-Smith C.: Sulphaquinoxaline in the treatment of caecal coccidiosis in chickens caused by the coccidium *Eimeria tenella* (Raillet and Lucet, 1891). *Ninth World's Poultry Congress*, Paris. Official Report Section III, 1951, 3, 3–8.
- Weppelman R.M., Olson G., Smith D.A., Tamas T., Van Iderstine A.: Comparison of anticoccidial efficacy, resistance and tolerance of narasin, monensin and lasalocid in chicken battery trials. *Poult. Sci.* 1977, 56, 1550–1559.
- Chapman H.D.: Drug resistance in coccidia: recent research. W: McDougald L.R., Joyner L.P., Long P.L. (Wyd.). *Proc. of the George Coccidiosis Conf.*, Athens, 1986, 330–341.
- Chapman H.D.: Sensitivity of field isolates of *Eimeria* to monensin following the use of a coccidiosis vaccine in broiler chickens. *Poult. Sci.* 1994, 73, 476–478.
- Chapman H.D.: Biochemical, genetic and applied aspects of drug resistance in *Eimeria* parasites of the fowl. *Avian Pathol.* 1997, 26, 221–244.
- Peek H.W., Landman W.J.M.: Resistance to anticoccidial drugs of Dutch avian *Eimeria* spp. field isolates originating from 1996, 1999 and 2001. *Avian Pathol.* 2003, 32, 391–401.
- Taylor M.A., Coop R.L., Wall R.L.: *Veterinary Parasitology*. Blackwell Publishing. 3th Edition, 2007, 133.
- Allen P.C., Fetterer R.H.: Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clin Microbiol Rev.* 2002, 15, 58–65.
- Lawn A.M., Rose M.E.: Mucosal transport of *Eimeria tenella* in the cecum of the chicken. *J. Parasitol.* 1985, 68, 1117–1123.
- Trout J.M., Lillehoj H.S.: Evidence of a role for intestinal CD8+ lymphocytes and macrophages in transport of *Eimeria acervulina*. *J. Parasitol.* 1993, 79, 791–792.
- Gundlach J.L., Sadzikowski A.B.: *Parazytologia i parazytozy zwierząt*. PWRiL, Warszawa, 2004, 356.
- Dardi M., Bosh M.P., Benitez E.M., Rubio J.: Występowanie *Eimeria praecox* w Europie – wstępne wyniki badań przeprowadzonych w stadach brojlerów kurcząt w Belgii, Hiszpanii i we Włoszech. *Magazyn Wet. Choroby drobiu – monografia*. Mat. Konf. firmy Hipra, Polanica Zdrój, 12–14.05.2011a, 10–14.
- Levine, P. P.: The effect of sulfanilamide on the course of experimental avian coccidiosis. *Cornell Vet.* 1939, 29, 309–320.
- Horvath-Papp I.: Zastosowanie chemioprofilaktyki w programach kontroli kokcydiozy brojlerów kurcząt – stan obecny i perspektywy. *Magazyn Wet. Choroby ptaków – monografia*. 2010, 398–404.
- Weppelman R.M., Olson G., Smith D.A., Tamas T., Van Iderstine A.: Comparison of anticoccidial efficacy, resistance and tolerance of narasin, monensin and lasalocid in chicken battery trials. *Poult. Sci.* 1977, 56, 1550–1559.
- McManus E.C., Campbell W.C., Cuckler A.C.: Development of resistance to quinolone coccidiostats under field and laboratory conditions. *J. Parasitol.* 1968, 54, 1190–1193.
- Long P.L., Jeffers T.K.: Anticoccidial medication programs vary for broilers, cage layers and breeders. *Feedstuffs*. 1986, 7, 25–37.
- Ramisz A., Balicka-Laurens A.: Wpływ preparatów Cycostat, Aprocox i Lerbek na przebieg kokcydiozy, przyrosty masy ciała oraz zużycie paszy u kurcząt rzeźnych. *VI Symp. Drobiarskie „Aspekty zootechniczno-weterynaryjne chowu kur mięsnych”*, Polanica-Zdrój. 22–24.09.1988, 71.
- McDougald L.R., McQuiston T.E.: Mortality from heat stress in broiler chickens influenced by anticoccidial drugs. *Poult. Sci.* 1980, 59, 2421–2423.
- Stanev V., Naciri M., Niepceron A., Fort G., Vancraeynest D.: Maksymalizacja produkcji kurcząt rzeźnych poprzez stosowanie kokcydiostatyków na podstawie testów wrażliwości w latach 2000–2012. Wrocław, Mat. Konf. „Aktualne problemy w patologii drobiu ze szczególnym uwzględnieniem aspektów zootechniczno-weterynaryjnych w chowie kur mięsnych i indyków”. 2015, 33–37.
- Chapman H.D., Hacker A.B.: The effects of shuttle programs upon the growth of broilers and the development of immunity to *Eimeria* species. *Poult. Sci.* 1993, 72, 658–663.
- Chapman H.D.: Anticoccidial drugs and their effects upon the development of immunity to *Eimeria* infections in poultry. *Avian Pathol.* 1999, 28, 521–535.
- Williams R.B., Carlyle W.W.H., Bond D.R., Brown I.A.G.: The efficacy and economic benefits of Paracox®, a live attenuated anticoccidial vaccine, in commercial trials, with standard broiler chickens in the United Kingdom. *Int. J. Parasitol.* 1999, 29, 341–355.
- Chapman H.D., Jeffers T.K.: Vaccination of chickens against coccidiosis ameliorates drug resistance in commercial poultry production. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 2014, 4, 214–217.
- Shirley M.W., Harvey D.: A genetic linkage map of the apicomplexan protozoan parasite *E. tenella*. *Genome Res.* 2000, 10, 1587–1593.
- Williams, R.B.: Anticoccidial vaccines for broiler chickens: pathway to success. *Avian Pathol.* 2002, 31, 317–353.
- Vervelde L., Vermulen A.N., Jeurissen H.M.: Common epitopes on *Eimeria tenella* sporozoites and cecal epithelium of chickens. *Infect. Immun.* 1993, 61, 4504–4506.
- Hong Y.E., Lillehoj H.S., Lee S.H., Dalloul R.A., Lillehoj E.P.: Analysis of chicken cytokine and chemokine gene expression following *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2006, 114, 209–223.



39. Shirley M.W., Bedrnik P.: Live attenuated vaccines against avian coccidiosis: success with precocious and egg-adapted lines of *Eimeria*. *Parasitol. Today*. 1997, **13**, 481–484.
40. McDonald V., Shirley M., Millard B.: A comparative study of two lines of *Eimeria tenella* attenuated either by selection for precocious development in the chicken or by growth in chicken embryos. *Avian Pathol.* 1986, **15**, 323–335.
41. Shirley M.W., Millard B.: Studies on the immunogenicity of seven attenuated lines of *Eimeria* given as a mixture to chickens. *Avian Pathol.* 1986, **15**, 629–638.
42. Reid A.J., Blake D.P., Ansari H.R., Billington K., Browne H.P., Bryant J., Dunn M., Hung S.S., Fumiya K.F., Saavedra D.M., Malas T.B., Mourier T., Naghra H., Nair M., Otto T.D., Rawlings N.D., Rivaille P., Sanchez-Flores A., Sanders M., Subramaniam C., Tay Y.L., Yong W.Y., Wu X., Barrell B., Dear P.H., Doerig C., Gruber A., Ivens A.C., Parkinson J., Ad ele Rajandream M., Shirley M.W., Wan K., Berriman M., Tomley F.M., Pain A.: Genomic analysis of the causative agents of coccidiosis in domestic chickens. *Genome Res.* 2014, **24**, 1676–1685.
43. Blake D.P., Clark E.L., Macdonald S.E., Thenmozhi V., Kundu K., Garg R., Jatau I.D., Ayoade S., Kawahara F., Moftah A., Reid A.J., Adebamb A.O., Zapata R.A., Srinivasa Rao A.S.R., Thangaraj K., Banerjee P.S., Dhinakar-Raj G., Raman M., Tomley F.M.: Population, genetic, and antigenic diversity of the apicomplexan *Eimeria tenella* and their relevance to vaccine development. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. 2015, **112**, E5343–E5350.
44. Tomley F.M., Bumstead J.M., Billington K.J., Dunn P.P.: Molecular cloning and characterization of a novel acidic microneme protein (Etmic-2) from the apicomplexan protozoan parasite *Eimeria tenella*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1996, **79**, 195–206.
45. Vermeulen A.N., Kok J.J., van den Boogaart P., Dijkema R., Claessens J.A.: *Eimeria* refractile body proteins contain two potentially functional characteristics: transhydrogenase and carbohydrate transport. *FEMS Microbiol. Lett.* 1993, **15**, 223–229.
46. Konjufca V., Jenkins M., Wang S., Juarez-Rodriguez M.D., Curtiss R.: Immunogenicity of recombinant attenuated *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium vaccine strains carrying a gene that encodes *Eimeria tenella* antigen S07. *Infect. Immun.* 2008, **76**, 5745–5753.
47. Ding X., Lillehoj H.S., Quiroz M.A., Bevensee E., Lillehoj E.P.: Protective immunity against *Eimeria acervulina* following in ovo immunization with a recombinant subunit vaccine and cytokine genes. *Infect. Immun.* 2004, **72**, 6939–6944.
48. Venkatas J., Adeleke M. A.: A review of *Eimeria* antigen identification for the development of novel anticoccidial vaccines. *Parasitol Res.* 2019, **118**, 1701–1710. doi:10.1007/s00436-019-06338-2.
49. Tensa L.R., Jordan B. J.: Comparison of the application parameters of coccidia vaccines by gel and spray. *Poult. Sci.* 2019, **98**, 634–641. doi:10.3382/ps/pey364
50. Wallach M.G., Ashash U., Michael A., Smith N.C.: Field Application of a subunit vaccine against an enteric protozoan disease. *PLoS ONE*. 2008, **3**, e3948.
51. Dardi M., Rubio J., Bosch M.P., Lorenzo M.I.G., Laguna S.J.: Bezpieczeństwo stosowania szczepionki HIPRACOX® przeciwko kokcydiozie u kurcząt brojlerów żywionych paszami opartymi o pszenicę i jęczmień. *Mat. Konf. firmy Hipra*, Polanica Zdrój. 12–14.05.2011, 3–6.
52. Allen P.C., Lydon J., Danforth H.D., Augustine P.C.: Effects of components of *Artemisia annua* on coccidia infections in chickens. *Poult. Sci.* 1997, **28**, 1131–1140.
53. Calzada F., Meckens M., Cedillo-River R.: Antiamoebic and anti-giardial activity of plant flavonoids. *Planta Med.* 1999, **65**, 78–80.
54. Peek H.W., Landman W.J.M.: Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. *Vet. Q.* 2011, **31**, 143–161.
55. Augustine P.C., McNaughton J.L., Virtanen E., Rosi L.: Effect of betaine on the growth performance of chicks inoculated with mixed cultures of avian *Eimeria* species and on invasion and development of *Eimeria tenella* and *Eimeria acervulina* in vitro and in vivo. *Poult. Sci.* 1997, **76**, 802–809.
56. Lee S.H., Lillehoj H.S., Lillehoj E.P., Cho S.M., Park D.W., Hong Y.H., Chun H.K., Park H.J.: Immunomodulatory properties of dietary plum on coccidiosis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2008, **31**, 389–402.
57. Lalloul R.A., Lillehoj H.S., Lee J.S., Chung K.S.: Immunopotentiating effect of *Fomitella fraxinea* derived lectin on chicken immunity and resistance to coccidiosis. *Poult. Sci.* 2006, **85**, 446–451.
58. Huang G, Tang X, Bi F, Hao Z, Han Z, Suo J, Zhang S, Wang S, Duan C, Yu Z, Yu F, Yu Y, Lv Y, Suo X, Liu X, *Eimeria tenella* Infection Perturbs the Chicken Gut Microbiota from the Onset of Oocyst Shedding, *Vet. Parasitol.* 2018, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.06.005>
59. Fernandez F., Hinton M., Van Gols B.: Dietary mannaoligosaccharide and their effect on chicken caecal microflora in relation to *Salmonella enteritidis* colonization. *Avian Pathol.* 2002, **31**, 49–58.
60. Elmusharaf M.A., Bautista V., Nollet L., Beynen A.C.: Effect of a mannaoligosaccharide preparation on *Eimeria tenella* infection in broiler chickens. *Int. J. Poult. Sci.* 2006, **5**, 583–588.
61. McCann M.E.E., Newell E., Preston C., Forbes K.: The use of mannan-oligosaccharides and/or tannin in broiler diets. *Int. J. Poult. Sci.* 2006, **5**, 873–879.
62. Johnson J., Reid W.M.: Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp. Parasitol.* 1970, **28**, 30–36.
63. Williams R.B.: Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccines for chickens. *Int. J. Parasitol.* 1998, **28**, 1089–1098
64. Hodgson J.N.: Coccidiosis: oocyst counting technique for coccidiosis evaluation. *Exp. Parasitol.* 1970, **28**, 99–102.
65. Haug A., Williams R.B., Larsen S.: Counting coccidial oocysts in chicken faeces: a comparative study of a standard McMaster technique and a new rapid method. *Avian Pathol.* 2006, **136**, 233–242.
66. Shirley M.W.: Enzyme variation in *Eimeria* species of the chicken. *Parasitol.* 1975, **71**, 369–376.
67. Ellis J., Bumstead J.: *Eimeria* species: studies using rRNA and rDNA probes. *Parasitol.* 1990, **101**, 1–6.
68. Shirley M.D., Kemp D.: A molecular karyotype of *Eimeria tenella* as revealed by contour-clamped homogenous electric field gel electrophoresis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1990, **38**, 169–174.
69. Blake D.P.: Postępy w diagnostyce molekularnej kokcydiozy brojlerów kurzych. *Magazyn Wet. Choroby ptaków – monografia*. 2012, **21**, 431–432, 434–436, 461.
70. Schnitzler B.E., Thebo P.L., Mattsson J.G., Tomley F.M., Shirley M.W.: Development of a diagnostic PCR assay for the detection and discrimination of four pathogenic *Eimeria* species of the chicken. *Avian Pathol.* 1998, **27**, 490–497.
71. Lew A.E., Anderson G.R., Minchin C.M., Jetson P.J., Jorgensen W.K.: 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. *Vet. Parasitol.* 2003, **112**, 33–50.
72. Fernandez S., Costa A.C., Katsuyama A.M., Madeira A.M.B.N., Gruber A.: A survey of the inter- and intraspecific RAPD markers of *Eimeria* spp. of the domestic fowl and the development of reliable diagnostic tools. *Parasitol. Res.* 2003, **89**, 437–445.
73. Fernandez S., Katsuyama A.M., Kashiwabara A.Y., Madeira A.M.B.N., Durham A.M., Gruber A.: Characterization of SCAR markers of *Eimeria* spp. of domestic fowl and construction of a public relational database. (The *Eimeria* SCARdb). *FEMS Microbiol. Lett.* 2004, **238**, 183–188.
74. Fernandez S., Pagotto A.H., Furtado M.M., Katsuyama A.M.: A multiplex PCR assay for the simultaneous detection and discrimination of the seven *Eimeria* species that infect domestic fowl. *Parasitol.* 2003, **127**, 317–325.
75. Vrba V., Blake D.P., Poplstein M.: Quantitative real-time PCR assays for detection and quantification of all seven *Eimeria* species that infect the chicken. *Vet. Parasitol.* 2010, **174**, 183–190.
76. Barkway C.P., Pocock R.L., Vrba V., Blake D.P.: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the species-specific detection of *Eimeria* that infect chickens. *J. Vis. Exp.* 2015, **96**, 1–6.