

Pengembangan Antibodi Poliklonal dari Stadium Oosista, Sporosista, dan Sporozoit *Eimeria tenella*

(THE DEVELOPMENT OF POLYCLONAL ANTIBODY
FROM EIMERIA TENELLA OOCYST, SPORO CYST, AND SPOROZOITE STADIUM)

Galuh Tresnani¹⁾, Joko Prastowo²⁾, Wisnu Nurcahyo³⁾, Budi Setiadi Daryono⁴⁾

¹⁾Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Mataram Jl. Majapahit No. 62 Mataram, Nusa Tenggara Barat
Telp (0370) 646506, email : galuht@yahoo.com

^{2),3)}Bagian Parasitologi, Fakultas Kedokteran Hewan,

⁴⁾Lab Genetika, Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRAK

Penelitian untuk mengembangkan teknik diagnosis, vaksin, maupun obat-obatan untuk mengatasi koksidiosis banyak difokuskan pada pencarian senyawa imunogenik yang terdapat pada *Eimeria*. Identifikasi senyawa imunogenik ini membutuhkan antibodi yang mampu mengenali biomolekul dalam suatu antigen. Dalam pengembangannya, antibodi yang dihasilkan harus dianalisis terlebih dahulu, dan salah satu jenis analisis yang banyak digunakan adalah *dot blot*. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisa hasil pengembangan antibodi poliklonal *E. tenella* dari stadium oosista, sporosista, dan sporozoit dengan menggunakan metode analisa *dot blot*. Antigen yang dibutuhkan dibuat dari masing-masing stadium *E. tenella* dengan menggunakan teknik sonikasi. Lima belas ekor mencit dibagi dalam tiga kelompok dan diinjeksi secara subkutan dengan antigen oosista, sporosista, dan sporozoit. Serum dari masing-masing mencit dikoleksi, diukur titernya dengan ELISA, dan selanjutnya digunakan dalam analisis *dot blot*. Hasil analisis *dot blot* menunjukkan bahwa antibodi poliklonal yang dikembangkan pada mencit mampu bereaksi terhadap antigen dari tiga stadium perkembangan *E. tenella*. Berdasarkan hal ini dapat disimpulkan bahwa antibodi poliklonal yang dikembangkan pada mencit telah berhasil dan dapat digunakan untuk penelitian imunoproteomik lainnya.

Kata-kata kunci : analisa *dot blot*, antibodi poliklonal, *E. tenella*

ABSTRACT

The research on developing diagnostic method, vaccine, and drugs for coccidiosis has been focused on the finding of the immunogenic molecule in *Eimeria*. The identification of this agent will need the antibody which can recognize the biomolecule in the antigen. Antibody that has been developed for this purpose should be analyzed first, and one of the simple methods for analyzing this antibody is through dot blot analysis. The objective of this research was to analyze the polyclonal antibody which developed from the oocyst, sporocyst, and sporozoite of *E. tenella* using dot blot analysis. The antigen for this polyclonal antibody was made from each of the *E. tenella* stadium by sonication. Fifteen mice, divided into 3 groups, were then injected subcutaneously with each antigen. The sera from these mice were then collected, analyzed by using ELISA and then it will be used for the dot blot analysis. The research result showed that the polyclonal antibody which has been developed in mice from each antigen can react with the antigen itself. From this result it can be concluded that the developing of this antibody is successful and it can be used for further research in immunoproteomic.

Keywords : analisa *dot blot*, antibodi poliklonal, *E. Tenella*

PENDAHULUAN

Dalam industri ternak unggas, koksidiosis merupakan salah satu penyakit yang menimbulkan kerugian ekonomi yang cukup besar (Williams 1998; Shirley *et al.*, 2005). Penyakit ini disebabkan oleh infeksi protozoa *Eimeria*, dan salah satu jenis yang cukup patogen adalah *Eimeria tenella* (Fernando, 1990).

Penelitian untuk mengembangkan teknik diagnosis, vaksin, maupun obat untuk koksidiosis telah banyak dilakukan baik di dalam maupun luar negeri. Penelitian saat ini banyak difokuskan pada upaya pencarian senyawa imunogenik yang dapat digunakan untuk mengembangkan vaksin dan alat diagnostik *Eimeria*. Dalam prosesnya, penelitian seperti ini membutuhkan sejumlah antibodi poliklonal yang mampu mengenali senyawa imunogenik yang berasal dari berbagai stadium *Eimeria*. Penggunaan analisis imunoproteomik, analisis yang melibatkan reaksi ikatan antara antigen dan antibodi, merupakan salah satu langkah yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi molekul imunogenik dan faktor patogenisitas yang terdapat pada *E. tenella* (Liu *et al.*, 2009).

Identifikasi siklus hidup parasit dan perkembangan antigen spesifik pemicu sistem imun merupakan langkah penting dalam pengembangan vaksin *Eimeria* (Min *et al.*, 2004). *E. tenella* memiliki siklus hidup yang kompleks, mencakup beberapa stadium perkembangan yang berbeda-beda. Pengembangan antibodi poliklonal dari beberapa stadium *E. tenella* diharapkan dapat digunakan untuk memeriksa keberadaan senyawa imunogenik yang terkandung dalam *E. tenella*. Senyawa ini selanjutnya dapat dikembangkan untuk memutus siklus hidup *E. tenella* sehingga penyakit koksidiosis dapat dikendalikan. Antigen permukaan yang imunogenik atau produk sekresi yang mampu menimbulkan gejala patologi merupakan adaptasi protozoa parasitik terhadap kekebalan tubuh inangnya. Identifikasi senyawa-senyawa tersebut dapat digunakan untuk mengembangkan vaksin maupun obat-obatan yang akan membasmi protozoa parasitik (Jenkins, 2001).

Antibodi poliklonal *E. tenella* dapat

dikembangkan pada ayam maupun hewan yang memiliki jenis yang berbeda, seperti mencit, tikus ataupun kelinci. Antibodi poliklonal yang dihasilkan sebaiknya diuji terlebih dahulu reaksinya terhadap antigen *E. tenella* yang digunakan untuk mengembangkan antibodi tersebut. Salah satu metode yang dapat digunakan untuk memeriksa reaksi antara antigen dengan antibodi adalah analisis *dot blot*. *Dot blot* atau *slot blot* adalah suatu teknik yang digunakan untuk mendeteksi biomolekul dalam suatu zat (baik antigen maupun antibodi) dengan menggunakan suatu membran yang ditetesi antigen ataupun antibodi.

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis hasil pengembangan antibodi poliklonal *E. tenella* dari stadium oosista, sporosista, dan sporozoit dengan menggunakan metode analisis *dot blot*. Hasil analisis ini diharapkan dapat memberi gambaran reaksi antibodi yang dikembangkan dengan antigen yang berasal dari *E. tenella*.

METODE PENELITIAN

Koleksi Sampel Parasit

Perbanyakan parasit *E. tenella* dilakukan dengan menginfeksi 50 ekor ayam pedaging usia dua minggu. Masing-masing ayam diinfeksi 10.000 oosista. Oosista dikoleksi setelah tujuh hari masa inkubasi (Smith dan Ruff, 1975). Oosista yang baru diperoleh merupakan oosista yang belum bersporulasi. Oosista ini kemudian disporulasikan dengan menggunakan medium 2,5% kalium bikromat dan diinkubasikan selama tiga hari (Shirley, 1995). Suspensi oosista yang sudah bersporulasi kemudian diberi tambahan *glass beads* dan *divortex* selama 10 sampai 15 menit untuk menghancurkan dinding oosista dan melepaskan sporosista. Untuk mendapatkan sporozoit, sebagian sampel sporosista diinkubasikan dalam medium eksistasi (2,5% sodium taurokolat dan 0,15% tripsin) pada suhu 41°C selama 6 jam. Semua sampel yang diperoleh kemudian disimpan dalam medium PBS pH 7,2 pada suhu -20°C.

Pembuatan Antigen

Pembuatan atau pengembangan antigen dari tiga stadium perkembangan *E. tenella* (oosista, sporosista, dan sporozoit) dilakukan dengan mengacu pada metode yang disampaikan oleh Guzman *et al.*, (2003). Masing-masing stadium *E. tenella* yang telah disuspensikan

dalam PBS pH 7,2 dibeku-cairkan beberapa kali. Selanjutnya suspensi ini disonikasi selama 30 detik dengan jeda 5 detik sebanyak 10 kali. Suspensi disentrifus pada kecepatan 12.000 g selama 15 menit, kemudian supernatan yang terbentuk dikoleksi dan disimpan pada -20°C.

Pengembangan Antisera

Sebanyak 15 ekor mencit (*Mus musculus*) usia satu bulan dibagi dalam tiga kelompok sesuai dengan tiga stadium perkembangan *E. tenella*. Kelompok I diinjeksi dengan antigen oosista, kelompok II dengan antigen sporosista, dan kelompok III dengan antigen sporozoit. Mencit diinjeksi secara subkutan dengan *complete Freund's adjuvant* dan antigen dengan konsentrasi antigen antara 5 sampai 10 µg per ekor mencit. Dua minggu setelah injeksi pertama, mencit diinjeksi untuk yang kedua kalinya dengan campuran antigen dan *incomplete Freund's adjuvant*. Dua minggu setelah injeksi kedua, mencit diinjeksi lagi dengan antigen yang sama untuk ketiga kalinya. Satu sampai dua minggu setelah injeksi ketiga, antisera dari masing-masing kelompok mencit dikoleksi (Tomley, 1994; Wallach *et al.*, 1995; Hafeez *et al.*, 2007).

ELISA

Analisis ELISA dilakukan terhadap serum berisi antibodi poliklonal yang diperoleh dari mencit. Analisis ELISA mengikuti prosedur dari Constantinoiu *et al.*, (2007). Lempeng mikrotiter diberi lapisan antigen dengan konsentrasi 5 µg/ml dan diinkubasi selama satu malam pada suhu 37°C. Lempeng mikrotiter kemudian dicuci tiga kali dengan *washing buffer* dan diberi *blocking buffer* yang kemudian diinkubasi selama satu jam pada suhu 37°C. Lempeng selanjutnya dicuci lagi tiga kali dan diberi serum (antibodi poliklonal) yang akan dianalisis titernya, dan diinkubasi lagi selama satu jam pada suhu 37°C. Lempeng mikrotiter dicuci lagi tiga kali lalu diinkubasikan dengan *anti-mouse IgG* 1:3000 selama satu jam pada suhu 37°C. Lempeng dicuci kembali tiga kali dan diberi substrat (*nitrophenyl phosphate*) lalu titer antibodi dibaca dengan menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 405 nm.

Analisis Dot Blot

Membran nitroselulosa dipersiapkan dan diberi tanda untuk masing-masing reaksi *dot blot*. Masing-masing antigen dari tiap-tiap stadium *E. tenella* diteteskan di permukaan

membran nitroselulosa sebanyak 2 µL, lalu membran dibiarkan mengering beberapa saat dan kemudian membran direndam dalam larutan *blocking buffer* (5% *bovine serum albumin* dalam *tris-buffered saline tween 20*) selama satu jam. Selanjutnya, membran diinkubasi selama 30 menit dengan antibodi poliklonal yang dikembangkan dari masing-masing stadium *E. tenella*. Membran kemudian dicuci tiga kali masing-masing selama lima menit dengan menggunakan *tris-buffered saline* (TBS) Tween 20. Setelah itu membran diinkubasi dengan konjugat (*anti-mouse IgG*) selama 30 menit. Membran yang telah dicuci dengan *tris-buffered saline* Tween 20 kemudian diberi substrat *nitro blue tetrazolium* (NBT) dan diamati.

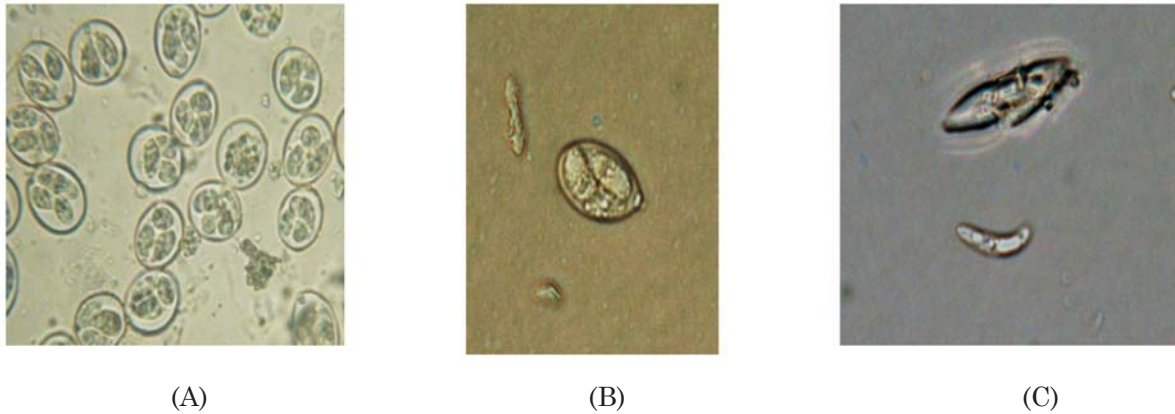
HASIL DAN PEMBAHASAN

ELISA

Pada penelitian ini digunakan tiga stadium perkembangan dari *E. tenella* yaitu stadium oosista, sporosista, dan sporozoit. Ketiga stadium ini yang selanjutnya akan digunakan dalam pengembangan antibodi poliklonal, analisis ELISA dan analisis *dot blot*. Gambaran masing-masing stadium perkembangan *E. tenella* yang digunakan dalam pengembangan antibodi poliklonal disajikan pada Gambar 1.

Stadium sporozoit merupakan stadium infeksi dari *E. tenella*. Stadium ini berupa organisme protozoa satu sel yang mampu menginvasi sel epitel saluran pencernaan ayam. Stadium ini memiliki dua generasi selama perkembangannya di dalam usus ayam. Generasi pertama akan menginvasi sel epitel usus lalu berkembangbiak menghasilkan generasi kedua. Generasi kedua merupakan generasi yang memicu sistem kekebalan tubuh inang, mengakibatkan perdarahan dan rusaknya sejumlah jaringan epitel. Perusakan ini terjadi umumnya lima hari setelah infeksi oosista pada tubuh inang (Long, 1982). Stadium sporozoit juga dikenal sebagai stadium perkembangan aseksual pada *Eimeria*. Stadium ini merupakan stadium yang memiliki imunogenisitas paling tinggi bila dibandingkan dengan stadium seksualnya. Penelitian yang berkaitan dengan respons kekebalan tubuh ayam terhadap *Eimeria*, umumnya difokuskan pada stadium sporozoit (Rose, 1987; Lillehoj, 2005).

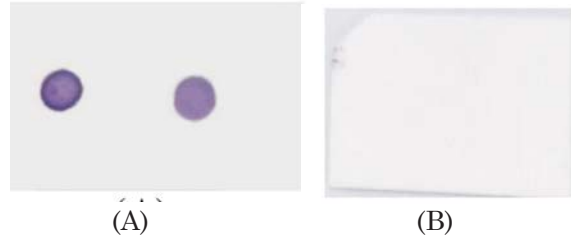
Hasil pembacaan ELISA Reader pada



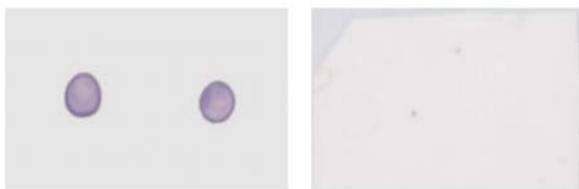
Gambar 1. Stadium perkembangan *E. tenella*. Stadium oosista (A), stadium sporosista (B), dan stadium sporozoit (C).



Gambar 2. Hasil analisis *dot blot* antibodi poliklonal oosista (A), hasil analisis *dot blot* serum kontrol (B)



Gambar 3. Hasil analisis *dot blot* antibodi poliklonal sporosista (A), hasil analisis *dot blot* serum kontrol (B)



Gambar 4. Hasil analisis *dot blot* antibodi poliklonal sporozoit (A), hasil analisis *dot blot* serum kontrol (B)

panjang gelombang 405 nm menunjukkan nilai absorbansi titer antibodi yang bervariasi. Nilai yang cukup tinggi diperoleh pada pengenceran 10x sampai dengan 40x. Untuk antibodi poliklonal yang dikembangkan dari stadium oosista, nilai absorbansinya berada di antara 0,631–1,579. Antibodi yang dikembangkan dari sporosista memiliki nilai absorbansi antara 0,754–1,895, sedangkan antibodi poliklonal dari sporozoit memiliki nilai absorbansi antara 1,236–2,687. Berdasarkan nilai absorbansi, dapat diperkirakan titer antibodi poliklonal

tertinggi ditemukan pada stadium sporozoit. Nilai absorbansinya mencapai 1,236 pada pengenceran serum 40x, sedangkan stadium oosista dan sporosista pada pengenceran serum yang sama, memiliki nilai absorbansi 0,631 untuk oosista dan 0,754 untuk sporosista.

Hasil pemeriksaan ELISA terhadap titer antibodi poliklonal yang dikembangkan dari tiga stadium perkembangan *E. tenella* selanjutnya digunakan sebagai dasar untuk pengenceran serum dalam analisis *dot blot*. Berdasarkan hasil ELISA, selanjutnya ditentukan pengenceran serum yang digunakan dalam analisis *dot blot* adalah 40x. Nilai pengenceran serum ini diharapkan dapat memberikan gambaran timbulnya reaksi ikatan antara antigen dan antibodi pada analisis *dot blot*.

Analisis Dot Blot

Hasil analisis *dot blot* ditunjukkan dengan terbentuknya noktah bulat berwarna ungu yang menunjukkan bahwa terjadi reaksi pengikatan antara antigen dan antibodi poliklonal yang dikembangkan (Guzman *et al.*, 2003). Analisis

dot blot dilakukan terhadap antibodi poliklonal yang dikembangkan dari tiga stadium *E. tenella* pada mencit, dan sebagai kontrol digunakan serum mencit yang tidak diberi perlakuan. Hasil analisis *dot blot* antibodi poliklonal yang dikembangkan dari stadium oosista disajikan pada Gambar 2 :

Pada analisis *dot blot* antara antibodi poliklonal oosista dengan antigen oosista menunjukkan adanya reaksi positif, yaitu dengan munculnya noktah berwarna ungu pada membran nitroselulosa. Reaksi positif ini menunjukkan bahwa pengembangan antibodi poliklonal oosista pada mencit telah berhasil. Hal ini berarti bahwa di dalam serum mencit yang disuntikkan dengan antigen oosista telah menghasilkan antibodi poliklonal yang dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan antigen oosista melalui analisis *dot blot* (Monis *et al.*, 2005).

Hasil analisis *dot blot* berikutnya dilakukan untuk antibodi poliklonal yang dikembangkan dari stadium sporosista. Hasilnya disajikan pada Gambar 3.

Antibodi poliklonal sporosista yang dikembangkan pada mencit terbukti memberikan reaksi positif ketika direaksikan dengan antigen sporosista dalam analisis *dot blot*. Reaksi positif ini menunjukkan bahwa pengembangan antibodi poliklonal sporosista ini telah berhasil.

Selain antibodi poliklonal oosista dan sporosista yang memberikan hasil analisis *dot blot* positif, antibodi poliklonal yang dikembangkan dari stadium sporozoit juga memberikan hasil yang sama dan disajikan pada Gambar 4.

Hal ini membuktikan bahwa antibodi poliklonal dari stadium sporozoit yang dikembangkan pada mencit telah berhasil. Antibodi ini sesuai untuk mendeteksi keberadaan antigen sporozoit *E. tenella* karena setelah direaksikan dengan antigen sporozoit, antibodi ini mampu mengikat antigen dan memberikan reaksi noktah berwarna ungu.

Reaksi negatif pada analisis *dot blot* terhadap ketiga jenis antibodi poliklonal ditunjukkan dengan tidak terbentuknya noktah berwarna ungu pada membran nitroselulosa. Pada reaksi ini digunakan antigen yang sama yaitu antigen oosista, sporosista, dan sporozoit yang diteteskan ke permukaan membran, namun antibodi yang digunakan dalam reaksi ini merupakan antibodi atau serum yang berasal dari mencit yang tidak diberi perlakuan. Hal

ini menunjukkan bahwa dalam serum tersebut tidak dijumpai antibodi yang secara spesifik mampu mengenali dan berikatan dengan antigen yang berada di permukaan membran nitroselulosa (Monis *et al.*, 2005).

Seluruh hasil analisis *dot blot* yang dilakukan terhadap antibodi poliklonal yang dikembangkan dari tiga stadium perkembangan *E. tenella* menunjukkan hasil reaksi positif. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya noktah bulat berwarna ungu di tiap-tiap membran nitroselulosa. Hal ini menunjukkan bahwa antibodi yang dikembangkan pada mencit (bukan pada ayam sebagai inang utama) mampu mengenali dan berikatan dengan antigen oosista, sporosista, dan sporozoit dari *E. tenella* (Brake *et al.*, 1997).

Berdasarkan hasil analisis ini, dapat diasumsikan bahwa pengembangan antibodi poliklonal terhadap tiga stadium perkembangan *E. tenella* telah berhasil. Antibodi ini selanjutnya dapat digunakan sebagai media diagnosis *E. tenella* secara serologi ataupun sebagai media pendeteksi antigen imunogenik atau senyawa imunogenik pada *E. tenella*.

SIMPULAN

Pengembangan antibodi poliklonal pada mencit dari stadium oosista, sporosista, dan sporozoit *E. tenella* memberikan hasil positif dan antibodi ini dapat digunakan untuk penelitian lainnya dibidang imunoproteomik. Hal ini ditunjukkan dari reaksi positif pengikatan antara antigen dan antibodi dalam analisis *dot blot*.

SARAN

Saran yang dapat disampaikan peneliti adalah perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut untuk mengembangkan antibodi monoklonal *E. tenella* yang merupakan antibodi yang lebih spesifik. Antibodi poliklonal yang dikembangkan dalam penelitian ini selanjutnya dapat digunakan untuk analisa proteomik lainnya seperti analisa *Western Blot* untuk mencari antigen (protein) spesifik yang dapat digunakan untuk mengembangkan vaksin dan obat-obatan untuk menangani koksidirosis.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan penulis kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Pada Masyarakat, Universitas Gadjah Mada atas bantuan dana penelitian yang diberikan dalam bentuk Penelitian Hibah Disertasi Doktor. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada seluruh teknisi Laboratorium Bioteknologi Pusat Antar Universitas, Universitas Gadjah Mada yang banyak membantu dalam penyelesaian penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Allen PC, Fetterer RH. 2002. Recent Advances in Biology and Immunobiology of *Eimeria* Species and in Diagnosis and Control of Infection With These Coccidian Parasites of Poultry. *Clinical Microbiology Reviews* 15 (1) : 58–65.
- Brake DA, Fedor CH, Werner BW, Miller TJ, Taylor RL, Clare RA. 1997. Characterization of Immune Response to *Eimeria tenella* Antigens in A Natural Immunity Model With Hosts Which Differ Serologically At The B Locus Of The Major Histocompatibility Complex. *Infection and Immunity*. 65 (4) : 1204–1210.
- Constantinoiu CC, Molloy JB, Jorgensen WK, Coleman GT. 2007. Development and Validation Of An ELISA For Detecting Antibodies To *Eimeria tenella* In Chickens. *Veterinary Parasitology*. 150 : 306–313.
- Fernando MA. 1990. *Eimeria* : Infections of The Intestine. In : Long, P.L. (Ed). *Coccidiosis of Man and Domestic Animals*. Boca Raton, Florida. CRC Press. Pp : 63–77.
- Fetterer RH, Jenkins MC, Miska KB, Barfield RC. 2007. Characterization of The Antigen SO7 During Development of *Eimeria tenella*. *J Parasitol* 93(5) : 1107–1113.
- Guzman VB, Silva DAO, Kawazoe U, Mineo JR. 2003. A Comparison Between IgG Antibodies Against *Eimeria acervulina*, *E. maxima*, and *E. tenella* Oocyst Shedding in Broilers-Breeders Vaccinated With Live Anticoccidial Vaccines. *Vaccine* 21 : 4225-4233.
- Hafeez MA, Akhtar M, Javed MT, ul Haq A. 2007. Maternal Immunization By Eggs Propagated Gametocyte Vaccine To Control *Eimeria tenella* Infections In Newly Hatched Chicks. *Parasitology Research* 100 : 1139–1141.
- Jenkins MC. 2001. Advances and Prospects for Subunit Vaccines Against Protozoa of Veterinary Importance. *Veterinary Parasitology* 101 : 291–310.
- Khyseanderson J. 1984. Electroblothing Of Multiple Gels : A Simple Apparatus Without Buffer Tank For Rapid Transfer Of Proteins From Polyacrylamide To Nitrocellulose, *Biochemical and Biophysical Methods* 10 : 203–209.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of Structural Protein During The Assembly of The Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680–685.
- Lillehoj HS. 2005. *Immune Response To Coccidia*. In : Proceedings of The IXth International Coccidiosis Conference, Brazil.
- Liu L, Xu L, Yan F, Yan R, Song X, Li X. 2009. Immunoproteomic Analysis of The Second-Generation Merozoite Proteins of *Eimeria tenella*. *Veterinary Parasitology* 164 : 173–182.
- Long PL. 1982. *The Biology of The Coccidia*. University Park Press. Pp : 292–333.
- Maresca B, Carratu L. 1992, The Biology of The Heat Shock Response in Parasites, *Parasitology Today* 8(8) : 260–266.
- Min W, Dalloul RA, Lillehoj HS. 2004, Application Of Biotechnological Tools For Coccidia Vaccine Development. *Journal of Veterinary Science* 5 (4) : 279–288.
- Monis PT, Giglio S, Keegan AR, Thompson RCA. 2005, Emerging Technologies For The Detection and Genetic Characterization Of Protozoan Parasites. *Trends in Parasitology* 21 (7) : 340–346.
- Morrissey JH. 1981, Silver Stain For Proteins In Polyacrylamide Gels : A Modified Procedure With Enhanced Uniform Sensitivity. *Analytical Biochemistry* 117 : 307–310.
- Rose ME. 1987. *Eimeria*, *Isospora*, and *Cryptosporidium*. In : Soulsby, E.J.L (Ed), *Immune Responses In Parasitic Infections : Immunology, Immunopathology, and Immunoprophylaxis*. CRC Press. Pp : 275–312.
- Shirley MW. 1995. *Eimeria* Species and Strains of Chicken, In : Eckert J, Brawn R, Shirley MW, Coudert P. (Eds.). *Biotechnology-Guidelines on Techniques in Coccidiosis Research*, European Commission DGXII, Luxembourg, Pp : 8–19.

- Shirley MW, Smith AL, Tomley FM. 2005. The Biology of Avian *Eimeria* With an Emphasis on Their Control by Vaccination. *Advance Parasitology* 60 : 285–330.
- Smith RR, Ruff M. 1975. A Rapid Technique for The Cleaning and Concentration of *Eimeria* Oocyst. *Poultry Science* 54 : 2081–2086.
- Talebi A. 1995. Protein Profiles of Five Avian *Eimeria* Species. *Avian Pathology* 24 : 731–735.
- Tomley FM. 1994. Characterization of Rhoptry Proteins of *Eimeria tenella* Sporozoites : Antigenic Diversity of Rhoptry Epitopes Within Species of The Genus *Eimeria* and Among Three Asexual Generations of A Single Species, *E. tenella*. *Infection and Immunity*. 62 (10) : 4656–4658.
- Wallach M, Smith NC, Braun R, Eckert J. 1995. Potential Control Of Chicken Coccidiosis by Maternal Immunization. *Parasitology Today* 11 : 262–265.
- William RB. 1998. Epidemiological Aspects of The Use of Live Anticoccidial Vaccines for Chickens. *International Journal for Parasitology* 28 : 1089–1098.
- Wisher MH. 1968. Identification of the Sporozoite Antigens of *Eimeria tenella*. *Mol Biochem Parasitol* 21 : 7–15.