

Pemencilan dan Pencirian Populasi *Eimeria tenella* daripada Ayam Hutan Tempatan

(Isolation and Characterisation of an *Eimeria tenella* Population
from the Local Jungle Fowl)

NORJOANNA JOHAN, MOHD. SANUSI JANGI & KIEW-LIAN WAN*

ABSTRAK

Eimeria tenella merupakan salah satu daripada tujuh spesies *Eimeria* yang menjangkiti ayam. Jangkitan parasit ini menyebabkan penyakit koksidiosis yang mendatangkan kerugian ekonomi yang besar kepada industri peternakan ayam. Adalah dipercayai parasit yang terdapat di dalam ayam domestik berasal daripada dan/atau mempunyai kaitan rapat dengan strain yang wujud di dalam ayam hutan. Oleh yang demikian, pencirian spesies *Eimeria* ini yang dipencil daripada ayam hutan tempatan akan memberi pengetahuan baru bagi meningkatkan pemahaman mengenai biologi parasit ini. Dalam kajian yang dilaporkan di sini, populasi parasit *Eimeria* AH1 telah dipencil daripada saluran usus ayam hutan tempatan. Berasaskan kepada pasaj bersiri didapati penghasilan oosista populasi AH1 tersebut dalam ayam domestik bergantung kepada umur oosista dan dos jangkitan. Pencirian morfologi pula menunjukkan oosista populasi AH1 berbentuk ovoid dan kebanyakan oosista tersebut mempunyai granul kutub. Nilai dimensi purata bagi oosista populasi AH1 ialah $22.51 (\pm 0.17) \times 17.30 (\pm 0.14) \mu\text{m}$. Saiz oosista populasi AH1 didapati berbeza secara signifikan ($p < 0.05$) berbanding dengan saiz oosista strain rujukan, *E. tenella* strain Houghton. Amplifikasi tindak balas berantai polimerase multipleks populasi AH1 menghasilkan jalur bersaiz ~540 pb yang berkorelasi dengan saiz produk yang spesifik untuk *E. tenella*. Hasil kajian kami ini mengesahkan bahawa populasi *Eimeria* AH1 yang dipencilkan daripada ayam hutan tempatan, terdiri daripada parasit *E. tenella*.

Kata kunci: Ayam hutan; *Eimeria tenella*; koksidiosis; parasit protozoa

ABSTRACT

Eimeria tenella is one of the seven *Eimeria* species that infects chicken. Infection of this parasite causes coccidiosis, which brings about great economic losses to the poultry industry. It is believed that the parasite in the domestic chicken originates from and/or is closely related with the strain present in the jungle fowl. Thus, characterisation of *Eimeria* species isolated from the local jungle fowl will provide new knowledge to increase the understanding of the biology of this parasite. In the study reported here, the *Eimeria* population AH1 was isolated from the intestinal tract of a local jungle fowl. Based on a serial passage, it was found that the production of oocysts from the AH1 population in domestic chicken depends on the age of the oocysts and the dose of infection. Morphological characterisation showed that the AH1 population oocysts are ovoid in shape with most of the oocysts possessing a polar granule. The mean dimension of the AH1 population oocysts is $22.51 (\pm 0.17) \times 17.30 (\pm 0.14) \mu\text{m}$. The size of the AH1 population oocysts is significantly different ($p < 0.05$) compared to the size of oocysts of the reference, *E. tenella* Houghton strain. Multiplex polymerase chain reaction amplification of the AH1 population produced a band of ~540 bp in size, which correlates with the size of the product specific for *E. tenella*. The results of our study confirm that the *Eimeria* population AH1 isolated from the local jungle fowl, consists of *E. tenella* parasites.

Keywords: Coccidiosis; *Eimeria tenella*; jungle fowl; protozoan parasite

PENGENALAN

Di antara tujuh spesies *Eimeria* yang telah dikenalpasti menjangkiti saluran usus ayam, *Eimeria tenella* didapati merupakan spesies yang paling patogenik dan sering dijumpai di ladang ternakan ayam (Shirley et al. 2005). Jangkitan oleh satu atau lebih spesies *Eimeria* ayam boleh menyebabkan penyakit koksidiosis, iaitu salah satu daripada penyakit ayam utama di dunia yang memberi impak terhadap ekonomi. Di peringkat global, kerugian yang disebabkan oleh penyakit koksidiosis ini adalah

dijangkaikan melebihi £2 bilion setahun (Shirley et al. 2004).

Kawalan terhadap koksidiosis dapat dicapai secara kemoterapi dan pemvaksinan (Allen & Fetterer 2002). Kawalan kemoterapi yang melibatkan penggunaan dadah antikoksidia sebagai bahan tambah makanan digunakan secara meluas. Namun begitu, pembentukan strain *Eimeria* yang rintang terhadap dadah antikoksidia di ladang peternakan ayam sering dilaporkan (Chapman 1997). Vaksin yang terdapat di pasaran biasanya terdiri

daripada bentuk yang bertindak terhadap beberapa spesies *Eimeria* ayam dan dapat memberikan perlindungan kepada ayam secara mengaruh tindak balas keimunan. Namun begitu, penggunaan vaksin kurang meluas berbanding dadah antikoksidia disebabkan kosnya yang agak tinggi (Chapman et al. 2002).

Ayam hutan tergolong di dalam famili Phasianidae dan terdiri daripada empat spesies iaitu *Gallus gallus*, *G. lafayettei*, *G. sonnerati* dan *G. varius*. Di bawah *G. gallus* pula terdapat lima subspesies iaitu *G. g. gallus*, *G. g. spadiceus*, *G. g. bankiva*, *G. g. murghi* dan *G. g. jabouillei* (Akishinonomiya et al. 1994, 1996). Kesemua spesies ayam hutan ini dapat dijumpai di habitat semula jadinya di kawasan Asia Tenggara, India dan selatan China. Ayam hutan selalunya mendiami kawasan hutan sekunder, hutan tanah rendah kering dan kawasan belukar dan bersifat sensitif terhadap gangguan (Abdullah & Babjee 1982).

Kajian lepas telah melaporkan mengenai pemencilan dan pencirian spesies *Eimeria* daripada ayam hutan *G. gallus* dan *G. lafayettei* (Fernando & Remmler 1973a, 1973b; Long 1974). Oleh sebab Malaysia merupakan sebahagian daripada habitat semula jadi ayam hutan di dunia, kajian untuk menentukan kelimpahan spesies *Eimeria* yang hadir di dalam saluran usus ayam hutan di negara ini dapat dijalankan. Maklumat asas yang diperolehi dapat membantu dalam mengenalpasti kajian lanjutan yang perlu dilakukan bagi mencirikan spesies *Eimeria* yang dipencilkan, misalnya daripada segi biologi dan mekanisme jangkitan.

Dalam kajian ini, suatu populasi *Eimeria* telah dipencilkan daripada ayam hutan tempatan. Populasi spesies *Eimeria* ini seterusnya telah dicirikan dari segi keupayaannya untuk mempropagasi dalam ayam domestik. Pencirian lanjut juga telah dilakukan melalui pencerapan morfologi dan penentuan dimensi oosista, serta kaedah biologi molekul bagi mengesahkan kewujudan spesies *Eimeria* dalam populasi tersebut.

BAHAN DAN KAEDAH

PROPAGASI DAN PEMENCILAN OOSISTA SPESIES *Eimeria*

Oosista *Eimeria* yang dicirikan dalam kajian ini telah dipencilkan daripada usus ayam hutan tempatan. Strain tempatan oosista *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix* dan *E. praecox* telah diperolehi daripada Dr. Rahmat Sheriff, Institut Penyelidikan Haiwan, Ipoh, Perak, manakala oosista *E. tenella* strain Houghton (H) pula telah diperolehi daripada Prof. Dr. Martin W. Shirley, Institute for Animal Health, Compton, United Kingdom. Propagasi untuk menggandakan bilangan parasit telah dilakukan dengan menggunakan ayam yang bebas daripada patogen khusus (*specific pathogen free*; SPF) sebagai perumah. Pemberian dos bagi tujuan propagasi ialah secara oral.

Pemencilan oosista *Eimeria* dari sekum atau tinja ayam terinfeksi dilakukan berdasarkan kepada kaedah

Shirley (1995). Secara ringkasnya, sekum diperolehi daripada ayam SPF pada hari ke tujuh selepas jangkitan dan dikikis dengan slaid kaca bersih. Hasil kikisan dan isi kandungan sekum dibilas dengan larutan garam berpenimbang fosfat (PBS) pH 8.0 sebelum dieram dalam tripsin 1.5% (b/i) (Gibco, AS) pada 40°C selama 90 min. Hasil eraman kemudian diempar pada kelajuan 2,500 rpm selama 10 minit dengan pengempar 5810R (Eppendorf, Jerman) sebelum dibilas dengan air suling steril sebanyak tiga kali untuk menyahkan tripsin. Untuk sampel tinja pula, homogenat yang dihasilkan ditapis dengan menggunakan empat lapisan kain kasa sebelum diempar pada 2,500 rpm selama 10 minit. Pelet yang diperolehi diampai dengan larutan garam tepu dan campuran diempar pada 1,700 rpm selama 10 minit. Supernatan yang terhasil ditambah dengan air suling steril (dalam nisbah 1: 3) dan campuran diempar pada 2,500 rpm selama 10 min. Pelet yang diperolehi kemudian dibilas dengan air suling steril sebanyak tiga kali untuk menyahkan sisa garam.

Proses sporulasi oosista yang diperolehi daripada sekum atau tinja seterusnya dilakukan dalam larutan kalium dikromat 2.5% (b/i) selama dua ke tiga hari pada suhu bilik, bergantung kepada peratus sporulasi yang diperlukan. Bagi tujuan ekstraksi genom, oosista yang telah tersporulasi dibilas dengan air suling steril sebanyak beberapa kali sehingga warna kuning kalium dikromat hilang. Pelet kemudian dieram dalam larutan natrium hipoklorit 15% (i/i) pada 4°C selama 10 min sebelum dibilas dengan air suling steril sehingga bau hipoklorit hilang. Pelet yang terhasil diampai dalam larutan garam tepu, dan ini diikuti dengan penambahan air suling steril untuk menghasilkan dua lapisan cecair. Ampaian kemudian diempar pada 1,700 rpm selama 10 min. Oosista yang terapung pada permukaan lapisan larutan garam tepu dikumpul dan dibilas dengan air suling steril sebanyak tiga kali untuk menyahkan garam, sebelum diampai dalam PBS pH 8.0 dan disimpan pada 4°C sehingga digunakan.

PENCIRIAN MORFOLOGI PENCILAN *Eimeria*

Dalam pencirian morfologi spesies *Eimeria*, saiz panjang dan lebar 100 oosista ditentukan. Pengukuran saiz ini dilakukan melalui kaedah mikrometri dengan menggunakan mikroskop cahaya (Carl Zeiss, Jerman). Untuk menentukan sama ada terdapat perbezaan dimensi (panjang × lebar) di antara oosista populasi *Eimeria* yang dikaji dengan oosista *E. tenella* strain H, analisis varians multivariat (multivariate ANOVA) dilakukan dengan menggunakan program SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc., AS).

PEMENCILAN DNA GENOM PARASIT

Pemencilan DNA genom dilakukan dengan menggunakan protokol yang telah dilaporkan oleh Fernandez et al. (2003a). Sebanyak 1×10^5 oosista diampai di dalam 1 ml penimbang ekstraksi (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 50 mM EDTA pH 8.0) dan ditambah dengan manik kaca berdiameter 0.5 mm (Jencons, UK) dalam nisbah 1:1 (1 mL manik kaca

: 1 mL ampaiian oosista). Ampaiian kemudian divorteks untuk memecahkan oosista dan sporosista, dan ini diikuti dengan pengemparan pada 1,000 rpm selama 5 minit. Supernatan yang terhasil dieram dengan ribonuklease A 20 mg/ml (Sigma Aldrich, AS) pada 37°C selama sejam, dan ini diikuti dengan penggeraman dalam larutan SDS 0.5% (b/i) dan proteinase K 100 mg/mL (Sigma Aldrich, AS) pada 50°C selama 2 jam. Seterusnya, proses pengekstrakan fenol/kloroform dan pemendakan etanol dilakukan sebelum pelet yang terhasil diampai dalam air suling steril dan disimpan pada -20°C sehingga diperlukan. Penentuan kuantiti DNA dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer BioPhotometer (Eppendorf, Jerman).

PENGENALPASTIAN SPESIES DENGAN PCR MULTIPLEKS

Kaedah PCR multipleks dilakukan seperti yang telah dilaporkan oleh Fernandez et al. (2003b) dengan menggunakan tujuh pasang pencetus spesifik yang disyorkan (Jadual 1). Amplifikasi dilakukan dalam campuran tindak balas berisipadu 35 µL yang mengandungi 200 mM dNTP (Promega, AS), 2.4 mM MgCl₂, 5U Taq polimerase DNA (Promega, AS), tujuh pasang pencetus spesifik (Ac-01, Br-01, Tn-01, Mt-01, Pr-01, Mx-01 dan Nc-01), 10X penimbal PCR dan 10 ng DNA genom parasit. Kepekatan pencetus yang digunakan adalah seperti yang dicadangkan oleh Fernandez et al. (2003b) iaitu 0.85 mM bagi pasangan Br-01; 0.70 mM bagi pasangan Ac-01, Pr-01 dan Nc-01; dan 0.55 mM bagi pasangan Tn-01, Mt-01 dan Mx-01. Kitar PCR dilakukan dalam alat pengitar haba PTC-100/96V (MJ Research, AS) dengan langkah penyahasian permulaan pada 96°C selama 5 min, dan 30 kitaran yang terdiri daripada 94°C selama 1 minit, 65°C selama 2 min dan 72°C selama 2 min. Ini diikuti dengan pemanjangan terakhir pada 72°C selama 7 min. Produk amplifikasi dikesan melalui elektroforesis gel agaros 2% (b/i) dengan penanda DNA 100 pb sebagai penanda DNA piawai.

HASIL DAN PERBINCANGAN

PASAJ BERSIRI POPULASI AH1

Ayam domestik *G. domesticus* pada masa kini dipercayai berasal daripada ayam hutan (Akishinonomiya et al. 1994, 1996). Ini menimbulkan tanda tanya sama ada spesies *Eimeria* yang menjangkiti ayam domestik pada masa kini turut berasal daripada ayam hutan *G. gallus* yang telah melalui proses pendomestikan (Barta et al. 1997). Dalam kajian lepas, beberapa spesies *Eimeria* telah berjaya dipencilkan daripada ayam hutan *G. gallus* dan *G. lafayettei* (Fernando & Remmler 1973a, 1973b; Long et al. 1974). Pencilan *Eimeria* daripada ayam hutan *G. lafayettei* didapati kurang berupaya untuk menjangkiti ayam domestik, berdasarkan kepada bilangan progeni baru yang dihasilkan amat rendah, manakala spesies *Eimeria* yang dipencilkan daripada ayam hutan *G. gallus* berjaya dipasajkan di dalam ayam domestik. Didapati spesies yang mirip kepada *E. maxima* berupaya menghasilkan perlindungan silang terhadap jangkitan *E. maxima* daripada ayam domestik. Hasil yang serupa turut diperolehi bagi spesies yang mirip kepada *E. acervulina*. Daripada hasil kajian tersebut, dipercayai kesemua spesies *Eimeria* yang menjangkiti ayam domestik pada masa ini dapat dijumpai dalam ayam hutan *G. gallus*.

Dalam kajian ini, parasit yang telah dipencilkan daripada ayam hutan tempatan *G. gallus* telah menunjukkan ciri patologi jangkitan *E. tenella* dalam bentuk sekum berdarah semasa ia dipasajkan kali pertama di dalam ayam SPF. Ini jelas menunjukkan spesies *Eimeria* yang diperolehi daripada ayam hutan *G. gallus* berupaya menjangkiti ayam domestik. Oleh yang demikian, pencilan oosista ini dianggap sebagai satu populasi *E. tenella* dan dinamakan populasi AH1. Pasaj bersiri populasi AH1 dinomborkan mengikut turutan pasaj yang telah dilakukan dalam kajian ini (Jadual 2).

JADUAL 1. Pencetus spesifik bagi ketujuh-tujuh spesies *Eimeria* ayam yang digunakan dalam PCR multipleks

Spesies	Nama pencetus	Jujukan pencetus (5' → 3')	Saiz produk (pb)
<i>E. acervulina</i>	Ac-01F Ac-01R	AGTCAGCCACACAATAATGGCAAACATG AGTCAGCCACAGCGAAAGACGTATGTG	811
<i>E. brunetti</i>	Br-01F Br-01R	TGGTCGCAGAACCTACAGGGCTGT TGGTCGCAGACGTATATTAGGGGTCTG	626
<i>E. tenella</i>	Tn-01F Tn-01R	CCGCCCAAACCAGGTGTCACG CCGCCCAAACATGCAAGATGGC	539
<i>E. mitis</i>	Mt-01F Mt-01R	AGTCAGCCACCAGTAGAGCCAATATTT AGTCAGCCACAAACAAATTCAAACTCTAC	460
<i>E. praecox</i>	Pr-01F Pr-01R	AGTCAGCCACCACCAAATAGAACCTTGG GCCTGCTTACTACAAACTTGCAAGCCCT	354
<i>E. maxima</i>	Mx-01F Mx-01R	GGGTAACGCCAACTGCCGGGTATG AGCAAACCGTAAAGGCCGAAGTCCTAGA	272
<i>E. necatrix</i>	Nc-01F Nc-01R	TTCATTTCGCTTAACAATATTTGGCCTCA ACAACGCCTCATAACCCCAAGAAATTTTG	200

JADUAL 2. Nilai perolehan oosista daripada pasaj bersiri bagi populasi AH1

Bil. pasaj	Nilai dos (bil. oosista)	Umur dos (bulan)	Umur ayam (minggu)	Bil. oosista/ayam
1	1.67×10^4	6	4	1.69×10^5
2	1.00×10^3	10	4	2.38×10^6
3	3.00×10^3	13	5	-
	3.00×10^4	13	5	-
	1.00×10^6	13	5	1.07×10^5
4	1.00×10^3	2	3	3.21×10^6
	2.00×10^3	2	3	1.47×10^7
5	1.00×10^3	5	3	2.38×10^6
6	2.00×10^3	3	5	8.93×10^6
7	2.50×10^3	4	3	3.50×10^6

Populasi AH1 telah dipropagasikan dengan tempoh jangkitan yang serupa dengan *E. tenella* iaitu perolehan oosista telah dilakukan dari bahagian sekum pada hari ketujuh (Shirley 1995). Sifat perkembangan aseksual dan seksual *E. tenella* yang berlaku dalam sekum ini memudahkan perolehan parasit dilakukan. Selain daripada itu, ia juga mengurangkan risiko kontaminasi daripada persekitaran perolehan, berbanding dengan perolehan parasit daripada tinja yang selalunya mengandungi bahan asing seperti sisa makanan dan bulu ayam (Chapman & Shirley 2003).

Nilai dos jangkitan yang disediakan dalam kajian ini, secara amnya, adalah seperti yang disyorkan oleh Shirley (1995) iaitu di antara 10^2 hingga 10^3 oosista. Bagi setiap pasaj, nilai dos jangkitan adalah $\sim 10^3$ kecuali pasaj pertama yang menggunakan dos jangkitan sebanyak 1.67×10^4 dan pasaj ketiga yang menggunakan dos jangkitan sebanyak 1.00×10^6 . Dalam pasaj keempat, terdapat dua nilai dos jangkitan digunakan iaitu 1.00×10^3 dan 2.00×10^3 dengan menggunakan ayam berumur tiga minggu. Didapati perolehan oosista (1.47×10^7 oosista/ayam) daripada dos jangkitan 2.00×10^3 adalah lebih tinggi berbanding perolehan oosista (3.21×10^6 oosista/ayam) daripada dos jangkitan 1.00×10^3 . Perkara ini berlaku disebabkan oleh bilangan parasit yang tinggi dapat menjangkiti lebih banyak sel epitelium dan seterusnya menghasilkan progeni baru dalam jumlah yang lebih besar (Williams 1973). Oleh kerana itu, dos jangkitan sebanyak 2.00×10^3 oosista mampu menghasilkan progeni baru yang lebih banyak berbanding dos jangkitan 1.00×10^3 oosista iaitu penambahan $\sim 1.15 \times 10^7$ oosista atau $\sim 4.58 \times$ ganda lebih tinggi.

Pasaj ketiga melibatkan dos jangkitan sebanyak 1.00×10^6 oosista setelah dua kali percubaan sebelumnya iaitu dengan menggunakan nilai dos jangkitan masing-masing 3.00×10^3 dan 3.00×10^4 oosista, tidak berjaya menghasilkan oosista. Kegagalan memperoleh oosista ini mungkin disebabkan umur oosista yang digunakan adalah terlalu lama iaitu 13 bulan. Kemandirian oosista didapati berkurangan dengan masa (Ruff et al. 1981; Jeston et al. 2002). Oleh yang demikian, nilai dos jangkitan

ditingkatkan agar peluang sporozoit yang masih viabel dan berdayajangkit dapat menjangkiti sel epitelium usus adalah lebih tinggi. Dengan nilai dos jangkitan ini, sebanyak 1.07×10^5 oosista/ayam telah berjaya diperoleh.

Menurut Ruff et al. (1981), kemandirian sporosista berkurangan selepas perlakuan pemecahan dinding oosista dengan manik kaca apabila disimpan dalam tempoh enam ke lapan bulan. Jika perkara ini dilihat dari sudut kemasukan oosista dalam saluran pencernaan ayam, kemandirian sporosista akibat tindakan mekanikal yang berlaku dalam saluran usus berkurangan apabila usianya meningkat. Selain daripada itu, didapati keupayaan sporozoit untuk bermandiri selepas eksistasi berkurangan apabila penularan sporozoit daripada stok simpanan yang berusia lebih daripada enam bulan terhadap sel berkurangan secara *in vitro* (Doran 1970). Perkara ini dapat menjelaskan bahawa tindakan tripsin dan cecair hempedu di dalam usus ayam tidak mempengaruhi kadar dan proses eksistasi sporozoit daripada sporosista, tetapi kemandirian sporozoit itu sendiri berkurangan secara langsung dengan usianya.

Pembentukan dinding oosista menjadikan oosista *Eimeria* terasing daripada sekitaran luar secara fizikal (Zhou et al. 2006). Oleh itu, oosista perlu mempunyai simpanan tenaga bagi memastikan ia boleh bermandiri di persekitaran untuk tempoh yang lama sebelum menjangkiti hos baru. Selain amilopektin yang merupakan simpanan tenaga bagi spesies *Eimeria* (Ryley et al. 1969), manitol turut merupakan sumber tenaga yang digunakan dalam keseluruhan kitar hidup *Eimeria* (Alloco et al. 1999). Didapati pengumpulan manitol pada kadar yang pantas dan pesat berlaku semasa oogenesis (Michalski et al. 1992). Perkara ini memungkinan oosista *Eimeria* dapat bermandiri di persekitaran. Walaupun begitu, dijangkakan bahawa dengan peningkatan tempoh penyimpanan oosista, simpanan tenaga akan berkurangan. Apabila ini berlaku, sporozoit daripada oosista tersebut tidak lagi berupaya untuk bermandiri di dalam saluran usus ayam iaitu keviabelannya berkurangan. Keadaan ini menyebabkan dayajangkitan turut menurun selaras dengan tempoh penyimpanan.

MORFOLOGI OOSISTA POPULASI AH1

Oosista populasi AH1 didapati berbentuk ovoid dan kebanyakan oosista mempunyai granula kutub. Daripada pengiraan dimensi (panjang × lebar) terhadap 100 oosista populasi AH1, didapati bahawa nilai purata panjang × lebar bagi oosista tersebut adalah $22.51 (\pm 0.17) \times 17.30 (\pm 0.14) \mu\text{m}$ (Jadual 3). Nilai dimensi minimum bagi oosista populasi AH1 ialah $19.20 \times 14.40 \mu\text{m}$ manakala nilai dimensi maksimumnya ialah $26.40 \times 19.20 \mu\text{m}$. Indeks bentuk bagi oosista populasi AH1 ialah 1.30. Didapati nilai indeks bentuk populasi AH1 lebih besar daripada *E. tenella* strain H yang ditentukan dalam kajian ini serta dalam kajian lepas (Joyner & Norton 1969; Long 1973). Malah nilai indeks bentuk populasi AH1 ini juga didapati adalah lebih besar daripada nilai yang telah diperolehi untuk *E. tenella* strain Weybridge (Joyner & Norton 1969) dan juga *E. tenella* strain Wisconsin (Jeffers 1978).

Untuk melihat sama ada terdapat perbezaan dimensi (panjang × lebar) antara oosista populasi AH1 dan *E. tenella* strain H yang telah diperolehi dalam kajian ini, analisis statistik telah digunakan. Analisis ANOVA multivariat dipilih untuk menentukan sama ada terdapat kesan oleh dimensi (panjang × lebar) (pembolehubah bersandar) ke atas jenis oosista (pembolehubah tak bersandar). Daripada hasil analisis ini, didapati bahawa terdapat perbezaan yang signifikan bagi saiz oosista (panjang × lebar) antara populasi AH1 dengan *E. tenella* strain H ($p < 0.05$).

Perbezaan saiz oosista antara populasi AH1 dengan *E. tenella* strain H mungkin disebabkan oleh sumber hos daripada mana parasit diperolehi. *E. tenella* strain H telah dipencilkan daripada sekum ayam domestik semasa wabak koksidiosis di lapangan (Chapman & Shirley 2003) manakala populasi AH1 ini telah dipencilkan daripada saluran usus ayam hutan. Faktor sumber hos yang berbeza ini mungkin mempengaruhi saiz oosista. Selain itu, *E. tenella* strain H merupakan populasi klon yang dihasilkan daripada propagasi sporozoit tunggal (Chapman & Rose 1986) manakala populasi AH1 pula dihasilkan daripada pencilan populasi oosista, yang mungkin terdiri daripada parasit heterogenus dengan saiz yang berbeza.

AMPLIFIKASI PCR MULTIPLEKS

Fernandez et al. (2003b) telah menghasilkan protokol PCR multipleks bagi pengenalpastian spesies *Eimeria* ayam dengan menggunakan tujuh pasangan pencetus. PCR multipleks ini berupaya untuk menentukan kewujudan spesies *Eimeria* berdasarkan penghasilan produk amplifikasi yang spesifik terhadap ketujuh-tujuh spesies *Eimeria* ayam dalam satu tindak balas. Untuk memastikan bahawa setiap pasangan pencetus yang spesifik bagi satu spesies *Eimeria* ayam dapat menghasilkan jalur yang spesifik terhadap spesiesnya sendiri, satu campuran DNA disediakan dengan mencampurkan DNA genom dari ketujuh-tujuh spesies *Eimeria* ayam, dan digunakan sebagai templat bagi tindak balas PCR multipleks.

Apabila produk PCR yang terhasil dianalisis menggunakan elektroforesis gel agaros, didapati tujuh fragmen berjaya dikesan (Rajah 1). Setiap fragmen tersebut menunjukkan saiz yang berkorelasi dengan saiz produk PCR untuk *Eimeria* ayam iaitu *E. acervulina* (~810 pb), *E. brunetti* (~630 pb), *E. tenella* (~540 pb), *E. mitis* (~460 pb), *E. praecox* (~350 pb), *E. maxima* (~270 pb) dan *E. necatrix* (~200 pb), seperti yang telah dilaporkan oleh Fernandez et al. (2003b). Ini menunjukkan bahawa kesemua pasangan pencetus yang digunakan adalah berfungsi dan spesifik terhadap spesies *Eimeria* ayam.

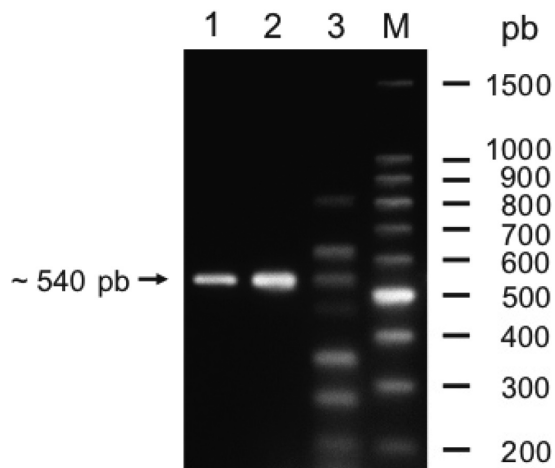
Amplifikasi PCR multipleks telah dilakukan terhadap populasi AH1, dengan *E. tenella* strain H digunakan sebagai kawalan positif. Didapati daripada hasil elektroforesis gel agaros produk PCR multipleks, hanya satu fragmen terdapat bagi populasi AH1 (Rajah 1). Fragmen ini mempunyai saiz yang lebih kurang sama dengan produk PCR bagi *E. tenella* strain H iaitu ~540 pb. Hasil ini menunjukkan bahawa populasi AH1 terdiri daripada parasit *E. tenella*, dan tidak ada spesies *Eimeria* ayam yang lain hadir di dalam pencilan ini.

KESIMPULAN

Dalam kajian ini, populasi *Eimeria* AH1 yang dipencilkan daripada ayam hutan tempatan berjaya dicirikan. Hasil pencirian dari segi dayajangkitan, penghasilan oosista, serta morfologi dan dimensi oosista menunjukkan bahawa

JADUAL 3. Perbandingan dimensi oosista bagi populasi AH1 dan strain *E. tenella* yang lain

Strain	Min panjang (μm)	Min lebar (μm)	Indeks bentuk (panjang/lebar)
AH1	22.51 ± 0.17	17.30 ± 0.14	1.30
<i>E. tenella</i> strain Houghton			
• Dalam kajian ini	22.30 ± 0.17	19.10 ± 0.19	1.17
• Joyner & Norton (1969)	21.85	17.96	1.21
• Long (1973)	21.29	17.84	1.19
<i>E. tenella</i> strain Weybridge (Joyner & Norton 1969)	21.81	17.86	1.22
<i>E. tenella</i> strain Wisconsin (Jeffers 1978)	22.5	18.1	1.24



RAJAH 1. Analisis hasil PCR multipleks bagi populasi AH1
Lajur 1: Populasi AH1; lajur 2: *E. tenella* strain H; lajur 3:
campuran DNA daripada tujuh spesies *Eimeria* ayam;
lajur M: penanda molekul piawai 100 pb

populasi AH1 mempamerkan ciri yang mirip kepada *E. tenella*. Hasil pencirian ini, bersama dengan hasil analisis PCR multipleks menunjukkan bahawa populasi AH1 merupakan strain baru untuk *E. tenella*.

PENGHARGAAN

Penyelidikan ini telah dibiayai oleh peruntukan IRPA 09-02-02-002 (BTK/TD/003) daripada Kementerian Sains, Teknologi dan Inovasi, Malaysia. Geran CICHE daripada British Council juga dihargai.

RUJUKAN

Abdullah, Z. & Babjee, S.A. 1982. Habitat preference of the red jungle fowl (*Gallus gallus*). *Malays. Appl. Biol.* 11: 59-63.

Akishinomiya, F., Miyake, T., Sumi, S.I., Takada, M., Ohno, S. & Kondo, N. 1994. One subspecies of the red junglefowl (*Gallus gallus gallus*) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 12505-12509.

Akishinomiya, F., Miyake, T., Takada, M., Shingu, R., Endo, T., Gojobori, T., Kondo, N. & Ohno, S. 1996. Monophyletic origin and unique dispersal patterns of domestic fowls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6792-6795.

Allen, P.C. & Fetterer, R.H. 2002. 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.* 15 (1): 58-65.

Alloco, J.J., Profous-Juchelka, H., Myers, R.W., Nare, B. & Schmatz, D.M. 1999. Biosynthesis and catabolism of mannitol is developmentally regulated in the protozoan parasite *Eimeria tenella*. *J. Parasitol.* 85(2): 167-173.

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

Chapman, H.D., Cherry, T.E., Danforth, H.D., Richards, G., Shirley, M.W. & Williams, R.B. 2002. Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines. *Int. J. Parasitol.* 32: 617-629.

Chapman, H.D. & Rose, M.E. 1986. Cloning of *Eimeria tenella* in the chicken. *J. Parasitol.* 72 (4): 605-606.

Chapman, H.D. & Shirley, M.W. 2003. The Houghton strain of *Eimeria tenella*: a review of the type strain selected for genome sequencing. *Avian Pathol.* 32: 115-127.

Chapman, H.D. 1997. Biochemical, genetic and applied aspects of drug resistance in *Eimeria* parasites of the fowl. *Avian Pathol.* 26: 221-244.

Doran, D.J. 1970. Effect of age and freezing on development of *Eimeria adenoides* and *E. tenella* sporozoites in cell culture. *J. Parasitol.* 56: 27-29.

Fernandez, S., Costa, A.C., Katsuyama, A.M., Madeira, A.M.B.N. & Gruber, A. 2003a. 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.* 89: 437-445.

Fernandez, S., Pagotto, A.H., Furtado, M.M., Katsuyama, A.M., Madeira, A.M.B.N. & Gruber, A. 2003b. A multiplex PCR assay for the simultaneous detection and discrimination of the seven *Eimeria* species that infect domestic fowl. *Parasitol.* 127: 317-325.

Fernando, M.A. & Remmler, O. 1973a. Four new species of *Eimeria* and one of *Tyzzeria* from the Ceylon jungle fowl *Gallus lafayettei*. *J. Protozool.* 20: 43-45.

Fernando, M.A. & Remmler, O. 1973b. *Eimeria diminuta* sp. n. from the Ceylon jungle fowl, *Gallus lafayettei*. *J. Protozool.* 20: 357.

Jeffers, T.K. 1978. Genetics of coccidia and the host response. Dlm. Long, P.L., Boorman, K.N. & Freeman, B.M. (pnyt). *Avian Coccidiosis. Proceedings of the 13th Poultry Science Symposium*, hlm. 51-125. Edinburgh: British Poultry Science Ltd.

Jeston, P.J., Blight, G.W., Anderson, G.R., Molloy, J.B. & Jorgensen, W.K. 2002. Comparison of infectivity of *Eimeria tenella* oocysts maintained at 4, 12 or 28°C for up to 10 months. *Aust. Vet. J.* 80: 91-92.

Joyner, L.P. & Norton, C.C. 1969. A comparison of two laboratory strains of *Eimeria tenella*. *Parasitol.* 59: 907-913.

Long, P.L. 1973. Endogenous stages of a "chick embryo-adapted" strain of *Eimeria tenella*. *Parasitol.* 66: 55-62.

Long, P.L. 1974. Experimental infection of chickens with two species of *Eimeria* isolated from the Malaysian jungle fowl. *Parasitol.* 69: 337-347.

Michalski, W.P., Edgar, J.A. & Prowse, S.J. 1992. Mannitol metabolism in *Eimeria tenella*. *Int. J. Parasitol.* 22(8): 1157-1161.

Ruff, M.D., Doran, D.J. & Wilkins, G.C. 1981. Effect of aging on survival and pathogenicity of *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella*. *Avian Dis.* 25(3): 595-599.

Ryley, J.F., Bentley, M., Manners, D.J. & Stark, J.R. 1969. Amylopectin, the storage polysaccharide of the coccidia *Eimeria brunetti* and *E. tenella*. *J. Parasitol.* 55(4): 839-845.

Shirley, M.W. 1995. *Eimeria* species and strains of chickens. Dlm. Eckert, J., Braun, R., Shirley, M.W. & Coudert, P. (pnyt). *Biotechnology – Guidelines on techniques in coccidiosis research*, hlm.1-24. Luxemborg: European Commission.

Shirley, M.W., Ivens, A., Gruber, A., Madeira, A.M.B.N., Wan, K.-L., Dear, P.H. & Tomley, F.M. 2004. The *Eimeria*

- genome projects: a sequence of events. *Trends Parasitol.* 20: 199-201.
- Shirley, M.W., Smith, A.L. & Tomley, F.M. 2005. The biology of avian *Eimeria* with an emphasis on their control by vaccination. *Adv. Parasitol.* 20: 285-330.
- Williams, R.B. 1973. Effects of different infection rates on the oocyst production of *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* in the chicken. *Parasitol.* 67: 279-288.
- Zhou, K., Wang, Y-Y., Chen, M., Wang, L-H., Huang, S-C., Zhang, J., Liu, R-H. & Xu, H. 2006. *Eimeria tenella*: further studies on the development of the oocyst. *Exp. Parasitol.* 113(3): 174-178.

Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi
Fakulti Sains dan Teknologi
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 UKM Bangi, Selangor D.E.
Malaysia

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: klwan@ukm.my

Diserahkan: 1 Jun 2010

Diterima: 1 September 2001