

図 46 アカントアメーバの分離培養法.
KCM : アカントアメーバ塩類溶液, YG : yeast extract glucose.

管に入れ、KCM 10 ml を加える。これを静かに攪拌(倒立、正位を繰り返す)し、納豆の粘液がほぼ溶液中に溶解したら、上澄みを別の容器に分注する。この上澄み液を YG 液の場合と同様に寒天平板に塗布し、乾燥後使用する。

(c) 大腸菌浮遊液

通常の検査室では YG 液ではなく大腸菌浮遊液(後述)を用いている。

〈方法 2〉

i) 用意するもの

① アカントアメーバ塩類溶液

・アカントアメーバ保存液の組成

NaCl	12 g
KCl	0.35 g
CaCl ₂	0.3 g
MgSO ₄ -7H ₂ O	0.4 g
Tris-HCl 100 mM(pH 6.8)	500 ml
DW(蒸留水)	1,000 ml

上記の成分を入れて溶解後、121℃で15分間オートクレーブで滅菌する。作製した保存液は、冷蔵庫で保存する。

② PURIFIED AGAR

ii) 培地の作製

① 寒天平板(低栄養培地)の作製: ガラス瓶に寒天(PURIFIED AGAR)粉末 1.6 g を入れ、精製水 99 ml に溶解し、上記のアカントアメーバ保存液を 1 ml 加え、121℃で15分間オートクレーブで滅菌する。50℃程度に冷めてから、シャーレに流し入れ、寒天が固まったら冷蔵庫でさらに30分程度固め、その後インキュベーターで15分ほど乾燥させる。瓶のままであれば約6か月保存可能であるが、シャーレに分注した場合には1か月以内に使用する。

② 使用直前に寒天平板に大腸菌浮遊液1滴を滴下し、コンラージ棒で均等に広げ、乾燥させる。

・大腸菌浮遊液の作製法

大腸菌(ATCC株 25922)を血液寒天培地で一昼夜培養する。精製水 10 ml にアカントアメーバ保存液 0.1 ml を加えた溶液を作製し、平板に発育したコロニーの1/2を浮遊させ試験管にとる。恒温槽(60℃)に試験管を入れ、10分間ごとにボルテックスをかけながら60分間加熱処理する。試験管が冷めたら、チューブに1 ml ずつ分注して密封し、冷蔵庫で保存する。

2) 検体の採取と接種

i) 角膜擦過物

硬めのスパーテルや円刃刀などを用いて、角膜病変部

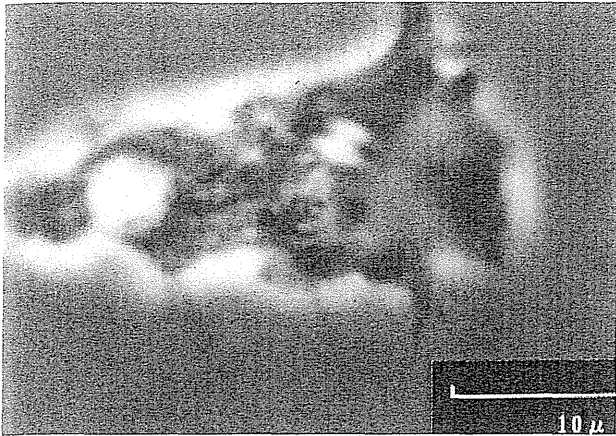


図 47. アカントアメーバの栄養体(位相差顕微鏡).

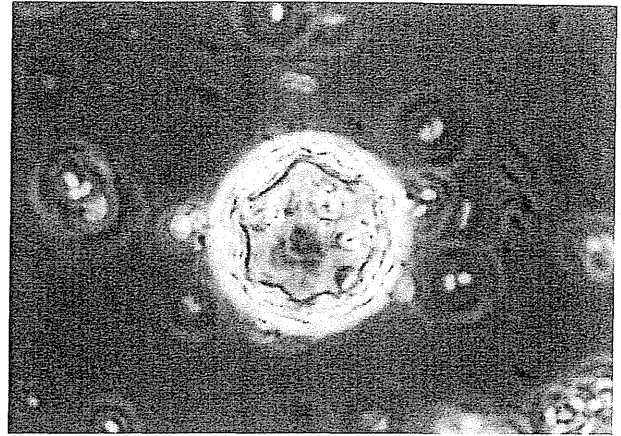


図 48 アカントアメーバのシスト(位相差顕微鏡).

から擦過物を採取する。培地の中央に検体を置き、その上に KCM を 1 滴落とす。

外部機関に培養を依頼する場合には、採取した材料を直接濾紙片に取り、KCM を 1 滴落として室温で十分に乾燥させる。材料の周囲を鉛筆などでマークして、スクリュチューブなどに密封して郵送するとよい。

ii) コンタクトレンズ、コンタクトレンズ保存液

コンタクトレンズはレンズ表面を寒天平板に擦りつけるように塗りつけるか、レンズを拭き取った濾紙片を培地に直接置く。コンタクトレンズ保存液は遠心分離管に入れて 600 G で 7 分間遠心分離し、沈渣をマイクロピペットで滴下する。

3) 培養

30℃の暗所で培養する。2～3 日目には栄養体がみられ、5～7 日目には大部分がシスト化する。

2. 結果の判定

1) 生体観察

平板上の適当なシスト集団上に KCM を 1 滴落とし、白金耳でシストをスライドガラス上にとる。薄いカバーガラスの小片を枕として材料の上にカバーガラスをかけ、ブリッジプレパラートを作製し、位相差顕微鏡で観察する。栄養体では棘状偽足と単核の胞状核を認める。シストは大きさ 10～20 μm で、内・外二重壁と内壁の形状が確認できればアカントアメーバ属と判定できる(図 47, 48)。

2) 簡易染色

いくつかの染色法があるが、細胞内構造の保存、二重壁の判別などの点から brilliant cresyl blue (BCB) 染色が簡便で観察しやすい。また、ギムザ染色でも観察可能である。

i) BCB 染色

- ① シスト浮遊液と KCM で調製した 0.1% BCB 染色液を等量混合する。
- ② ブリッジプレパラートを作製し、検鏡する。

3. 利 点

アカントアメーバの分離培養は、比較的感度の高い病因診断法である。また、薬剤感受性を調べれば、治療薬の選択に関する情報を得ることができる。アカントアメーバの培養は難しくなく、培地さえ用意しておけば簡単に実施できる。培地は冷蔵庫で約 3 か月間保存できる。また、アカントアメーバの分離培養は、臨床検査業者に委託することも可能である。各業者から検体輸送用キットを取り寄せ、取り扱い説明書に従って検体を採取し、提出する。

4. 注 意 点

アカントアメーバ角膜炎の初期では検出できないことがある(偽陰性)。また、アカントアメーバは室内塵など日常生活環境下に高率に存在するので、検査器具や材料の汚染に十分注意する必要がある。

Ⅶ ヘルペスウイルス培養

1. 方 法

サンプルとしては、上皮型が疑われる場合は、上皮欠損部ではなく、その辺縁の上皮を MQA チップなどで擦り取る。実質型では涙液をサンプルとする。これらのサンプルを、直接培養細胞(Vero 細胞など)に接種するのが感度を上げる点からはよいが、冷凍保存しておき、後日接種を行うか、培養実施施設に送付することも可能である。

2. 結果の判定

サンプルを接種した細胞内でウイルスが増殖してくると、細胞に数日～1 週間で ballooning などの細胞変性効果(CPE)が出現してくる。CPE が拡大してきたら増殖したウイルスを回収・冷凍保存し、後日、蛍光抗体法・中和法などを用いてウイルスの種類を同定する。

3. 利 点

陽性であれば角膜ヘルペスと確定診断できるため、ヘルペス診断のゴールド・スタンダードである。また分離されたウイルスを用いて薬剤感受性や病原性を検討した

り、分子疫学的調査に用いることができる。

4. 注 意 点

以上 1~3 は HSV 分離の方法であり、VZV については眼局所からのウイルス分離は困難であり、臨床的な利用は難しい。HSV についても、感度が悪い、結果が出るのに日数を要する、培養細胞を用意する必要がある³³⁾³⁴⁾など、日常の臨床検査としては不向きな面がある。

VIII Polymerase chain reaction(PCR)法

1. PCR 法

PCR 法ではまず、検体を 94°C 前後の高温に供し DNA 二本鎖変性により一本鎖にする。これを denaturation という。次に反応温度を 55~60°C 前後に下げて、それぞれ一本鎖にプライマーを付着させる。これを annealing という。再び温度を 72°C 前後に上げて伸長反応 (extension) を行う。

具体的な方法は、まず得られたサンプルから DNA を抽出し、マイクロチューブ中に抽出 DNA、2 種類のプライマー、デオキシヌクレオシド 3 リン酸 (dNTP)、バッファー、MgCl₂、DNA ポリメラーゼ、H₂O を混合する。サーマルサイクラーを、例えば denaturation 94°C 30 秒、annealing 58°C 30 秒、extension 72°C 60 秒、35 サイクルなどの条件に設定し、試薬と DNA の入ったチューブを反応させる。

また、nested PCR は、アウタープライマーとインナープライマーを使って 2 段階の PCR を行う方法で、より感度が優れる。

結果の判定は、設定したエンドポイントにおける PCR 産物をアガロースゲル(図 49)に電気泳動し、増幅産物が得られたかどうかを確認する。

2. リアルタイム PCR 法

上記の従来型 PCR 法に対して、リアルタイム PCR 法は、目的 PCR 増幅産物を 1 サイクルごとに経時的にモニタリングすることにより定量的な解析が可能で、眼科領域でも報告が行われている³⁵⁾。二本鎖 DNA に特異的に挿入して蛍光を発する色素である SYBR green I を用いるインターカレーター法と配列特異的オリゴヌクレオチドに蛍光物質を標識したプローブを用いる TaqMan 法がある。増幅された DNA 量に比例して得られる蛍光強度を検出することにより、初期鋳型 DNA を定量する。既知の初期鋳型コピー数から段階希釈したスタンダードサンプルにおける増幅曲線にて、閾値 PCR 産物量に達するサイクル数(threshold cycle : Ct 値)を算出して、初期鋳型量と Ct 値との直線関係を示す検量線を作成する。目的サンプルにおいても同様に Ct 値を算出して、検量線に当てはめることによって、目的サンプルの初期鋳型量絶対数を定量できる。また、内在コントロール遺伝子によるサンプル間の補正をすることにより、サンプル間の相対的比較定量を行うこともできる。

サイズマーカー
陰性対照
患者サンプル
陽性対照

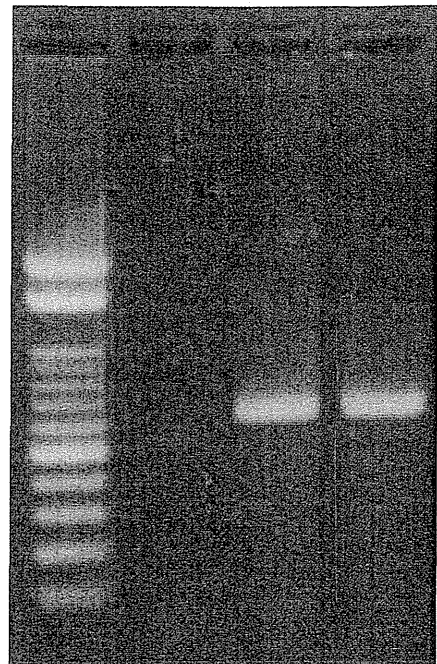


図 49 Polymerase chain reaction (PCR) 産物のアガロースゲル電気泳動。

患者涙液より抽出した DNA より、HSV-1 の UL-2 region に相当するバンド (342 bp) が得られた。

3. 利 点

PCR 法では、涙液、角膜上皮、前房水、硝子体のように採取できる検体が少量で、サンプル中のウイルス量が少ない場合でもウイルス DNA を増幅させることにより検出可能である。また、多数の病原体を短時間で検索することができる。また、本反応の鋳型となる DNA は、凍結させて長期保存できる。

4. 注 意 点

PCR 法ではあくまで DNA の存在が証明されるのみである。したがって、ウイルスであれば活動性ウイルスの存在を証明しているわけではないので、その評価に注意を要する。眼ヘルペス感染症研究会が提唱した上皮型ヘルペスの診断基準では、PCR 法によるウイルス DNA の証明は確定診断、确实診断項目ではなく、補助診断項目に挙げられている。少量の DNA が増幅されるため、検査環境を整え、contamination に注意する必要がある。

IX 血清抗体価

1. 方 法

1) 採取

発症初期および発症 2 週後の患者血液を 5 ml 程度採取し、血清を分離する。不可能な場合は発症 2 週後の血

免疫グロブリンクラス別抗体濃度

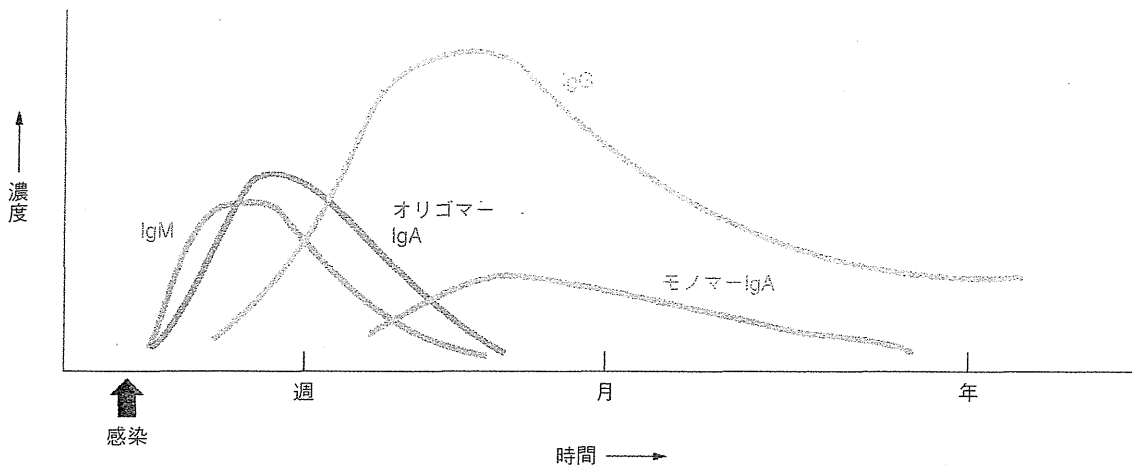


図 50 抗体応答.

清だけを採取する。

2) 検査依頼

測定方法を指定して、検査室あるいは検査会社に検査を依頼する。補体結合反応試験(CF法)、中和試験、赤血球凝集阻止試験(HI法)、蛍光抗体法(FA法)、酵素抗体法(ELISA法)が主に用いられる。CF法は感度が低く、IgG値を主に反映し、スクリーニングとして用いる。ウイルス特異的なIgG抗体価やIgM抗体価の測定には、HI法やELISA法、FA法を用いる。

3) 診断

ペア血清でCF抗体価が4倍以上、その他の方法では2段階以上の抗体価の上昇を証明できれば、そのウイルスによる感染と診断する。

2. 結果の判定

1) 感染に伴う抗体応答の原則

感染時に産生される特異的抗体としては感染初期にIgM、それと同時期にオリゴマーIgAが産生され、感染7~10日後にピークとなり、その後IgGが遅れて上昇し長期にわたり産生される(図50)。

2) 初感染ヘルペスが疑わしい場合

発症2週後の血清においてIgG抗体価とIgM抗体価を測定し、IgG抗体価が上昇せずIgM抗体価が上昇していれば、初感染ヘルペスであると診断できる。発症4

日以内では、感染にもかかわらず抗体価が上昇していないこともある。

3) 眼部帯状疱疹の場合

VZVの再活性化により起こるので、ペア血清を採取し、IgG抗体価ないしCF抗体価で4倍以上の上昇があれば診断できる。IgM抗体価は上昇しない。成人におけるVZV抗体の保有率は60%以上であり、ペア血清による抗体価上昇が証明できない場合は、診断価値は低い。

4) 角膜ヘルペスの場合

HSVの再活性化が原因であり、HSV抗体の保有率は60%以上のため、抗体価の上昇によっても角膜炎の原因ウイルスとは判断できない。

3. 利点

血清の採取のみで検査でき、角膜に対する侵襲がない。

4. 注意点

ウイルス性角膜炎が疑われる場合は、HSV抗体価とVZV抗体価を測定し、発症2週以後で抗体陰性であれば、原因ウイルスの可能性は否定してよい。IgM抗体価が上昇している場合は、初感染と診断する。それ以外は、血清抗体価上昇を認めても、原因ウイルスと判定することはできない。

文 献

- 1) 感染性角膜炎全国サーベイランス・スタディグループ：感染性角膜炎全国サーベイランス一分離菌・患者背景・治療の現況一。日眼会誌 110：961-972, 2006.
- 2) 宇野敏彦, 福田昌彦, 大橋裕一, 下村嘉一, 石橋康久, 稲葉昌丸, 他：重症コンタクトレンズ関連角膜感染症全国調査。日眼会誌 115：107-115, 2011.
- 3) 大橋裕一, 木下 茂, 細谷比左志, 李 三榮, 荒木かおる, 切通 彰, 他：角膜上皮の新しい病態—epithelial crack line。臨眼 46：1539-1543, 1992.
- 4) Inoue Y, Shimomura Y, Fukuda M, Miyazaki D, Ohashi Y, Sasaki H, et al：Multicenter clinical study of the herpes simplex virus immunochromatographic assay kit for the diagnosis of herpetic epithelial keratitis. Br J Ophthalmol 2012；doi：10.1136/bjophthalmol-2012-302254.
- 5) Itahashi M, Higaki S, Fukuda M, Shimomura Y：Detection and quantification of pathogenic bacteria and fungi using real-time polymerase chain reaction by cycling probe in patients with corneal ulcer. Arch Ophthalmol 128：535-540, 2010.
- 6) Ikeda Y, Miyazaki D, Yakura K, Kawaguchi A, Ishikura R, Inoue Y, et al：Assessment of real-time polymerase chain reaction detection of *Acanthamoeba* and prognosis determinants of *Acanthamoeba* keratitis. Ophthalmology 119：1111-1119, 2012.
- 7) 井上幸次, 大橋裕一, 秦野 寛, 下村嘉一, 坂本雅子, 岡本 豊；眼感染症薬剤感受性スタディグループ：前眼部・外眼部感染症における起炎菌判定—日本眼感染症学会による眼感染症起炎菌・薬剤感受性多施設調査(第一報)—。日眼会誌 115：801-813, 2011.
- 8) 秦野 寛, 井上幸次, 大橋裕一, 下村嘉一, 坂本雅子, 岡本 豊；眼感染症薬剤感受性スタディグループ：前眼部・外眼部感染症起炎菌の薬剤感受性—日本眼感染症学会による眼感染症起炎菌・薬剤感受性多施設調査(第二報)—。日眼会誌 115：814-824, 2011.
- 9) 石橋康久, 本村幸子：アカントアメーバ角膜炎の臨床所見—初期から完成期まで—。日本の眼科 62：893-896, 1991.
- 10) 塩田 洋, 矢野雅彦, 鎌田泰夫, 片山智子, 三村康男：アカントアメーバ角膜炎の臨床経過の病期分類。臨眼 48：1149-1154, 1994.
- 11) 下村嘉一(眼ヘルペス感染症研究会)：上皮型角膜ヘルペスの新しい診断基準—New criteria of diagnosis for herpetic epithelial keratitis—。眼科 44：739-742, 2002.
- 12) 山秋 久, 柊木雅晴, 北川和子：金沢医大眼科における眼部帯状ヘルペス症例の検討。臨眼 38：170-171, 1984.
- 13) Uchida Y, Kaneko M, Hayashi K：Varicella dendritic keratitis. Am J Ophthalmol 89：259-262, 1980.
- 14) Yamamoto S, Pavan-Langston D, Kinoshita S, Nishida K, Shimomura Y, Tano Y：Detecting herpesvirus DNA in uveitis using the polymerase chain reaction. Br J Ophthalmol 80：465-468, 1996.
- 15) Koizumi N, Yamasaki K, Kawasaki S, Sotozono C, Inatomi T, Mochida C, et al：Cytomegalovirus in aqueous humor from an eye with corneal endotheliitis. Am J Ophthalmol 141：564-565, 2006.
- 16) Suzuki T, Hara Y, Uno T, Ohashi Y：DNA of cytomegalovirus detected by PCR in aqueous of patient with corneal endotheliitis after penetrating keratoplasty. Cornea 26：370-372, 2007.
- 17) Chee SP, Bacsal K, Jap A, Se-Thoe SY, Cheng CL, Tan BH, et al：Corneal endotheliitis associated with evidence of cytomegalovirus infection. Ophthalmology 114：798-803, 2007.
- 18) Koizumi N, Suzuki T, Uno T, Chihara H, Shiraishi A, Hara Y, et al：Cytomegalovirus as an etiologic factor in corneal endotheliitis. Ophthalmology 115：292-297, 2008.
- 19) 砂田淳子, 上田安希子, 井上幸次, 大橋裕一, 宇野敏彦, 北川和子, 他：感染性角膜炎全国サーベイランス分離菌における薬剤感受性と市販点眼薬の postantibiotic effect の比較。日眼会誌 110：973-983, 2006.
- 20) 岡本茂樹, 石橋康久, 井上幸次, 内尾英一, 大橋裕一, 北川和子, 他：アシクロビル眼軟膏の副作用調査。臨眼 51：1112-1114, 1997.
- 21) 新村真人, 西川武二, 川島 眞, 本田まりこ, 漆畑修, 島田眞路, 他：塩酸バラシクロビル錠の帯状疱疹に対する第Ⅲ相臨床試験—アシクロビル錠を対照とした二重盲検比較試験—。臨床医薬 14：2867-2902, 1998.
- 22) 川島 眞, 新村真人, 大河原 章, 吉川邦彦, 堀嘉昭, 山西弘一, 他：ファムシクロビルの帯状疱疹に対する臨床効果—アシクロビルを対照薬とした第Ⅲ相二重盲検比較試験—。臨床医薬 12：4015-4045, 1996.
- 23) 渡辺大輔, 浅野喜造, 伊東秀記, 川井康つぐ, 川島眞, 下村嘉一, 他：ヘルペス感染症研究会(JHIF)帯状疱疹ワークショップ—帯状疱疹の診断・治療・予防のコンセンサス—。臨床医薬 28：161-173, 2012.
- 24) 田原和子, 浅利誠志, 遠藤卓郎：Acanthamoeba 角膜炎または角膜真菌症の同時迅速診断法。JAR-MAM 7：37-44, 1995.
- 25) Shiraishi A, Kobayashi T, Hara Y, Yamaguchi M, Uno T, Ohashi Y：Rapid detection of *Acanthamoeba* cysts in frozen sections of corneal scrapings with Fungiflora Y. Br J Ophthalmol 93：1563-1565, 2009.
- 26) 荒木博子, 高野博子, 中川ひとみ, 中川裕子, 中川尚：Impression cytology による偽樹枝状角膜炎からの水痘-帯状ヘルペスウイルス抗原の検出。臨眼 86：1002-1005, 1992.
- 27) Wilhelmus KR, Abshire RL, Schlech BA：Influence of fluoroquinolone susceptibility on the therapeutic response of fluoroquinolone-treated bacterial keratitis. Arch Ophthalmol 121：1229-1233, 2003.

- 28) 塩田 洋：角膜真菌症の特徴. 眼科 30：231-236, 1988.
- 29) 内田勝久, 山口英世：抗真菌薬の創薬における前臨床薬効評価の現状と課題. 真菌誌 45：83-91, 2004.
- 30) 竹林 宏, 塩田 洋, 内藤 毅, 木内康仁, 三村康男：角膜真菌症の検討. 臨眼 51：33-36, 1997.
- 31) Horikami H, Ishii K, Yamaura H, Ishibashi Y：Disinfection against *Acanthamoeba's* cyst from human keratitis. Zool Sci 9：1277, 1992.
- 32) 石井圭一, 石橋康久：両生アカントアメーバによる角膜炎. 原生動物学雑誌 22：4-9, 1989.
- 33) 井上幸次, 大橋裕一：検査のこつ ウイルス性外眼部疾患へのアプローチ 3—単純ヘルペスウイルス—, 眼紀 39：1938-1939, 1988.
- 34) 森 康子, 西川憲清, 井上幸次, 桑山信也, 下村嘉一, 眞鍋禮三：ヘルペス性眼疾患におけるウイルス分離率について. 眼紀 42：822-825, 1991.
- 35) Fukuda M, Deai T, Hibino T, Higaki S, Hayashi K, Shimomura Y：Quantitative analysis of herpes simplex virus genome in tears from patients with herpetic keratitis. Cornea 22 (Suppl 1)：S55-S60, 2003.
-

1 *Avian Pathology*

2 Full Paper

3

4 Characterization of *Eimeria brunetti* isolated from a poultry farm in Japan

5

6 Fumiya KAWAHARA^{1)*}, Guohong ZHANG¹⁾, Takayuki SUZUKI¹⁾, Akira IWATA¹⁾,

7 Kisaburo NAGAMUNE^{2),3)} and Tetsuo NUNOYA¹⁾

8

9 ¹⁾Nippon Institute for Biological Science, 9-2221-1 Shin-machi, Ome, Tokyo
10 198-0024, Japan

11 ²⁾National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo
12 162-8640, Japan

13 ³⁾Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba,
14 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

15

16 *CORRESPONDENCE TO: KAWAHARA, F., Nippon Institute for Biological
17 Science, 9-2221-1 Shin-machi, Ome, Tokyo 198-0024, Japan. e-mail:
18 funuwo@gmail.com

19

20 Running head: CHARACTERIZATION OF *E. BRUNETTI* IN JAPAN

21

22 ABSTRACT. None of anticoccidial vaccines (Trivalent TAM™, monovalent Neca™
23 and imported pentavalent Paracox®-5) contain *Eimeria brunetti* in Japan, which
24 has not been regarded as a cause of coccidiosis, because of its low prevalence.
25 However, we have recently reported the evidence of a high nationwide prevalence
26 of this species. In this report, we describe the characteristics of *E. brunetti* which
27 have never been clearly defined in Japan. Mortality rates and other disease
28 characteristics caused by our strain (Nb strain) were similar to those reported
29 previously in other studies. Despite great reduction of body weight gains among
30 groups infected with over 1×10^3 oocysts, the intestinal lesions in the infected
31 chickens were rather mild compared to previous studies. Sulfa drugs and
32 lasalocid were so effective that the *E. brunetti* infection was almost completely
33 blocked. Consequently, it is suggested that the characteristics of *E. brunetti* are
34 various among the strains, but the pathogenicity of the Japanese Nb strain is
35 enough strong to cause clinical coccidiosis.

36

37 KEY WORDS: anti-drug sensitivity, *Eimeria brunetti*, Japan, live vaccine,
38 pathogenicity.

39

40 Chicken coccidiosis induced by *Eimeria* parasites causes huge economic losses
41 to intensive poultry industries worldwide [12]. Seven species of *Eimeria* have
42 been reported to infect chickens so far. Among these species, *E. acervulina*, *E.*
43 *brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix* and *E. tenella* are highly pathogenetic, causing
44 production losses in industry due to clinical or subclinical coccidiosis.

45 Generally, the poultry industry uses specific anticoccidial drugs or live
46 anticoccidial vaccines as prophylactic therapies to prevent and control the
47 disease. There are concerns about drug residues in poultry products and a strong
48 consumer desire to ban drugs from animal feeds. As a result, the demand for
49 products derived from organic chickens, without feeding of chemicals or
50 antibiotics, tends to increase in Japan as European countries. It is estimated
51 that live anticoccidial vaccines in Japan are applied to one hundred million
52 chickens per year [13].

53 Three live coccidiosis vaccines have been registered and sold in Japan.
54 Trivalent TAM™ (Nisseiken Co., Ltd., Tokyo, Japan) contains precocious
55 attenuated strains of *E. acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella*. Monovalent
56 Neca™ (Nisseiken Co., Ltd.) contains a precocious attenuated strain of *E.*
57 *necatrix*. Pentavalent Paracox®-5 (MSD Animal Health, Milton Keynes, UK)
58 which contains precocious attenuated strains of *E. acervulina*, *E. maxima*, *E.*
59 *mitis* and *E. tenella* has been imported from the UK. However, none of these
60 products contain *E. brunetti* because its occurrence in chicken flocks has been
61 regarded to be less intensive in Japan to date. No oocysts of *E. brunetti* were
62 detected on several national surveys of broiler flocks in 1970's [8-10]. In 1990,
63 two strains of *E. brunetti* were first isolated from poultry farms in Hokkaido and

64 Kumamoto. This suggested a greater prevalence of *E. brunetti*, as these are the
65 northern-most and southern-most parts of Japan, respectively [7]. No further
66 surveys or cases have been reported since 1991.

67 *E. brunetti* infections have been recently diagnosed in many cases from
68 samples submitted to our laboratory from commercial chicken farms [3]. This has
69 forced us to review our concept of *E. brunetti* as a species capable of causing
70 coccidiosis in Japan also. Characteristics of the Japanese isolate of *E. brunetti*
71 haven't been evaluated still yet. For the verification, we describe a Japanese
72 strain of *E. brunetti*, focusing on its pathogenicity and sensitivity to drugs in
73 this paper.

74

75

MATERIALS AND METHODS

76

77 *Parasite:* The isolates of *E. brunetti*, as Nb strain, was derived from a single
78 oocyst isolated from feces of breeder chickens in Miyazaki prefecture and has
79 been maintained in our laboratory using specific-pathogen-free (SPF) layer
80 chickens. The correct species identification and purity of the strain were
81 confirmed by PCR employing an assay directed towards the ITS-1 [3].

82 *Experimental design:* *E. brunetti* infection was induced in a group of ten
83 35-day-old SPF chickens by oral inoculation with 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 or 1×10^5
84 sporulated oocysts/bird. The birds were raised in wire-floored cages for 7 days
85 and then necropsied. Experimental infections were evaluated using growth ratio,
86 mortality and intestinal lesion scores. The growth ratio was obtained
87 individually with the following formula: (body weight at termination - body

88 weight at initiation) / body weight at initiation \times 100. Intestinal lesion scores
89 were graded according to Johnson's method [2]. The oocysts excreted in feces
90 were counted daily from 4 to 11 days post-inoculation (DPI). To observe the
91 developing stages of infection with *E. brunetti*, 35-day-old SPF chickens were
92 given 1×10^5 oocysts/bird, and then intestinal tissues were taken daily from two
93 of these chickens from 1 to 8 days. The tissues were paraffin embedded, and
94 sections were stained with hematoxylin and eosin. The density of the population
95 of parasites was ranked at the observation site as 0 (no organisms), +1 (less than
96 10% of host cells are infected) and +2 (more than 10% of host cells are infected).

97 *Evaluation of drug resistance:* To evaluate the drug sensitivity, a group of ten
98 14-day-old SPF chickens were orally inoculated with 1×10^5 sporulated
99 oocysts/bird, kept in wire-floored cages for 7 days and then necropsied. Four
100 medicated infected, one unmedicated infected and one unmedicated uninfected
101 (control) groups were included in this study. As sulfa anticoccidial drugs,
102 diaveridine (19.2 ppm)/sulfaquinoxaline (76.8 ppm) obtained from Sumika
103 Enviro-Science Co., LTD. (Nishinomiya, Japan) and ormetoprim (75
104 ppm)/sulfamonomethoxine (225 ppm) obtained from Meiji Seika Pharma Co., Ltd.
105 (Tokyo, Japan) were used in the drinking water on days 0 to 3 after infection. As
106 ionophorous polyether anticoccidial drugs, salinomycin (50 ppm) obtained from
107 Nichiku Yakuhin Kogyo Corporation (Ayase, Japan) and lasalocid (75 ppm)
108 obtained from Scientific Feed Laboratory Co., Ltd. (Tokyo, Japan) were used in
109 the feed continuously. The sensitivity against anticoccidial drugs is represented
110 by calculating the anticoccidial index (ACI) according to the method of Merck
111 Sharp & Dohme Company Ltd.[5] as follows: $ACI = (\text{relative growth ratio} +$

112 survival ratio) - (lesion index + oocyst index). The strain was considered
113 sensitive if the ACI was >161, partially resistant if the ACI was 121 to 160 and
114 resistant if the ACI was <120.

115 *Animal Care and Use:* The experiments presented here were carried out
116 according to protocols pre-approved by the Animal Care and Use Committee of
117 Nippon Institute for Biological Science (Tokyo, Japan) in accordance with
118 Regulation of Animal Experimentation of Nippon Institute for Biological Science.

119

120 RESULTS

121

122 Experimentally infected chickens showed a great reduction in their body
123 weight gain which correlated with the dose of oocysts (Table 1). There were three
124 mortalities in the group that was infected with 1×10^5 oocysts. Despite showing
125 the great reduction of body weight gains, the intestinal lesions in the infected
126 chickens were rather mild. Typical lesions were found in the rectum, including
127 slight swelling, a color change into whitish-orange and formation of a
128 bellows-like-shape with folded circular rings along the tube. In the other
129 intestinal compartment, the only abnormality observed was a slight paling of the
130 serosal surface. There was no correlation between the output patterns and the
131 number of inoculated oocysts. Oocysts were seen in droppings from 5 to 10 DPI
132 among almost groups (Table 2). It indicates that prepatent and patent periods of
133 the strain were about 5 and 6 days, respectively.

134 Histological observation of the developing stages of the parasite is summarized
135 in Table 3, showing the infection rate of host cells and stage transition of

136 parasites on each day after inoculation. Mature (arrowheads) and immature
137 (arrows) schizonts were observed in the mucosal cells and subepithelial zone of
138 the disrupted villi of the jejunum at 4 days after infection (Fig.1). Mature female
139 gametocytes (arrowheads) and mature male gametocytes (arrow) were observed
140 in the mucosal cells and subepithelial zone of the villi of the rectum at 6 days
141 after infection (Fig.2). The number of female gametocytes was much larger than
142 that of male gametocytes. The onset of parasite development occurred in the
143 upper portion of the small intestine, and subsequently parasites were found in
144 the lower tract. The parasite density in the jejunum of *E. brunetti*-infected SPF
145 chickens was the highest among the locations examined, although the gross
146 lesions were mild (Table 2). The ACIs of medicated and unmedicated infected
147 groups are presented in Table 4. Of the four medicated infected groups, only the
148 ACI of the salinomycin group was in the partial resistant. Other drugs were so
149 effective that the *E. brunetti* infection was almost completely blocked.

150

151

DISCUSSION

152

153 Severe lesions were often observed in the field chickens infected with *E.*
154 *brunetti* (data not shown). However, such lesions did not develop in the intestines
155 of SPF chickens under experimental conditions in this study. This may be due to
156 differences between commercial field chickens and SPF chickens to *E. brunetti*
157 infection in the susceptibility. Otherwise, this may associate with *Clostridium*
158 *perfringens* infection. Because necrotic enteritis and coccidiosis often occur
159 concurrently in a field flock [11]. Gross lesions resulting from co-infection

160 become much severe. Actually, *C. perfringens* was also isolated from field
161 chickens infected with *E. brunetti* in almost cases (data not shown). According to
162 our observations in SPF chickens, the organisms first colonized the upper
163 intestine and moved down to the lower portion. The accumulation of parasites
164 was higher in the jejunum than in the other compartments examined. However,
165 the major parasitic site has been generally considered to be the lower small
166 intestine [1,4].

167 Contrary to previous reports [8-10], our recent study revealed that *E. brunetti*
168 is very prevalent in Japan [3]. In this study, we showed that *E. brunetti*
169 infections with a Japanese isolate cause similar mortalities and suppression of
170 body weight gain as other tested isolates [1,4]. So, the Japanese Nb strain has
171 similar high pathogenicity to oversea strains. Furthermore, the involvement of *E.*
172 *brunetti* in field coccidiosis cases must be evaluated. The drug sensitivity was
173 also found to be normal, although our strain was slightly resistant to salinomycin.
174 This coccidiostatic drug is generally thought to be slightly ineffective against *E.*
175 *brunetti* [6].

176 The reasons for the recent increase in the diagnosis of *E. brunetti* infections in
177 Japan remain unclear. Improvements of the techniques for the detection of *E.*
178 *brunetti* in field samples based on PCR, rather than morphological diagnosis,
179 could account for this, at least in part. Traditional classification techniques use
180 criteria, such as oocyst size, parasitic site in the intestine, gross lesion figures
181 and variations in prepatent time. It has been well documented that several
182 species overlap in their measured values or patterns using these criteria, leading
183 to confusion in the species-determination process, especially when mixed

184 infections are present. We suspect that the clinical signs attributed to *E.*
185 *brunetti* infections in breeder pullet flocks have been misdiagnosed as those of *E.*
186 *necatrix*. Actually, we experienced that only *E. brunetti* was detected by PCR in
187 considerable samples which the field veterinarians had diagnosed as *E. necatrix*
188 infection (data not shown).

189 Opinions on the prevalence of *E. brunetti* were basically derived from
190 information supplied from field surveys [8-10]. These were performed exclusively
191 on broiler flocks, while recent data for detection came from breeder pullet and
192 layer chicken flocks [3]. *E. brunetti* was commonly thought to infect both younger
193 and older chicken flocks [4]. Therefore, the epidemiology of *E. brunetti* should be
194 evaluated using surveys from not only broiler flocks, but also breeder pullet and
195 layer chicken flocks.

196 From the recent and present findings, the broad distribution and pathogenicity
197 of *E. brunetti* in Japan has emerged. This indicates that an appropriate plan to
198 confront the risk associated with outbreaks of this species is required. The fact
199 that *E. brunetti* outbreaks are usually found in older chicken flocks means that
200 using coccidiostatic drugs that are normally applied extensively to broilers would
201 not be suitable for this species. Vaccination would be the best method to mitigate
202 this risk, but appropriate vaccines effective against this species are not available
203 in Japan. Therefore, development of an effective *E. brunetti* vaccine that is safe
204 for use in the poultry industry in Japan is urgently required.

205

206

ACKNOWLEDGMENTS

207

208 The authors thank Eri Tomeno, Fumio Koyama and Hitomi Tomioka for their
209 technical assistance.

210

211

REFERENCES

212

213 1. Davies, S. F. M. 1963. *Eimeria brunetti*, an additional cause of intestinal
214 coccidiosis in the domestic fowl in Britain. *Vet. Rec.* 75: 1-4.

215 2. Johnson, J. and Reid, W. M. 1970. Anticoccidial drugs: lesion scoring
216 techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp. Parasitol.*
217 28: 30-36.

218 3. Kawahara, F., Taira, K., Nagai, S., Onaga, H., Onuma, M. and Nunoya, T.
219 2008. Detection of five avian *Eimeria* species by species-specific real-time
220 polymerase chain reaction assay. *Avian Dis.* 52: 652-656.

221 4. McDougald, L. R. and Fitz-Coy, S. H. 2008. Coccidiosis. pp. 1068-1080. *In:*
222 Diseases of poultry, 12th ed. (Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald,
223 L.R., Nolan, L.K. and Swayne, D.E. eds.) Blackwell Publishing Ames.

224 5. Merck Sharp & Dohme Company Ltd. 1998. The control of coccidiosis. pp. 2-4.
225 *In:* MSD Technical Booklet.

226 6. Migaki, T. T., Chappel, L. R. and Babcock, W. E. 1979. Anticoccidial efficacy
227 of a new polyether antibiotic, salinomycin, in comparison to monensin and
228 lasalocid in battery trials. *Poult. Sci.* 58: 1192-1196.

229 7. Nakamura, T., Kawaguchi, H. and Imose, J. 1990. Identification of *Eimeria*
230 *brunetti* using glucose isomerase and lactate dehydrogenase. *Nihon Juigaku*
231 *Zasshi.* 52: 859-860.

- 232 8. Oikawa, H., Kawaguchi, H., Nakamoto, K. and Tunoda, K. 1974. Field
233 surveys on coccidial infection in broiler in Japan-results obtained in spring and
234 summer in 1973. *Nihon Juigaku Zasshi*. 36: 321-328.
- 235 9. Oikawa, H., Kawaguchi, H., Nakamoto, K. and Tunoda, K. 1975. Field
236 surveys on coccidial infection in broiler in Japan-results obtained in autumn and
237 winter and summarized in 1973. *Nihon Juigaku Zasshi*. 37: 271-279.
- 238 10. Oikawa, H., Kawaguchi, H., Nakamoto, K. and Tunoda, K. 1977. Field
239 surveys on coccidial infection in broiler in Japan in 1974 and 1975. *Nihon*
240 *Juigaku Zasshi*. 39: 127-134.
- 241 11. Opengart, K. 2008. Necrotic enteritis. pp. 872-879. *In*: Diseases of poultry,
242 12th ed. (Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K.,
243 Swayne, D.E. eds.) Blackwell Publishing Ames.
- 244 12. Shirley, M. W., Smith, A. L. and Tomley, F. M. 2005. The biology of avian
245 *Eimeria* with an emphasis on their control by vaccination. *Adv. Parasitol.* 60:
246 285-330.
- 247 13. The National Veterinary Assay Laboratory. 2011. p. 61. *In*: Annual report of
248 the National Veterinary Assay Laboratory.
249

250 **Figure legends**

251 Fig. 1. Microscopic findings of the jejunum. 4DPI. Mature (arrowheads) and
252 immature (arrows) schizonts are observed in the mucosal cells and subepithelial
253 zone of the disrupted villi. HE stain. Bar = 10 μ m.

254 Fig. 2. Microscopic findings of the rectum. 6DPI. Mature female gametocytes
255 (arrowheads) and mature male gametocytes (arrow) are observed in the mucosal
256 cells and subepithelial zone of the villi. The number of female gametocytes is
257 much larger than that of male gametocytes. HE stain. Bar = 10 μ m.

258

259
260

Table 1. The pathogenicity of the Japanese Nb strain of *E. brunetti*.

Number of oocysts inoculated per bird	Mortality rate	Mean growth ratio ^A (relative growth ratio)	Mean lesion score ^B	
			Jejunum, ileum	Rectum
1 × 10 ²	0/10	38.7 ± 8.3 (0.89)	1.7 ^C	0.8 ^C
1 × 10 ³	0/10	22.2 ± 8.7 ^C (0.51)	1.3 ^C	0.6 ^C
1 × 10 ⁴	0/10	9.3 ± 8.2 ^{BC} (0.21)	1.3 ^C	1.1 ^C
1 × 10 ⁵	3/10	-4.2 ± 4.9 ^C (-0.1)	1.9 ^C	1.4 ^C
None	0/10	43.7 ± 7.4 (1.0)	0	0

^A(body weight at termination - body weight at initiation) / body weight at initiation.

^BJohnson and Reid (1970)

^CValues with superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$) from uninfected control group.

261
262

263 Table 2. Oocyst output of the Japanese Nb strain of *E. brunetti*.
 264

Number of oocysts inoculated per bird	Days after inoculation							
	4	5	6	7	8	9	10	11
1×10^2	-	4.7 ^A	7.4	7.4	7.2	6.1	5.3	-
1×10^3	-	-	7.6	7.6	7.2	5.1	-	-
1×10^4	-	4.2	7.7	8.1	7.2	6.1	5.8	-
1×10^5	-	4.1	7.2	7.7	7.3	5.3	-	-
None	-	-	-	-	-	-	-	-

^AOocysts/g feces (OPG) is shown by log. Detection limit is log2.0.

265
 266