University of Tehran Press

Iaranian Journal of Animal Science

Online ISSN: 2423-7949

Homepage: https://ijas.ut.ac.ir/

Effects of plant extracts of *Camellia sinensis* and *Thymus vulgaris* on sporulation of *Eimeria* oocysts of broiler exereta under laboratory conditions

Ali Khoshnejad[1] | Mohammad Yakhchali[2]✉ | Farnaz Malekifard[3]

1. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. E-mail: ali.agvet@gmail.com
2. Corresponding Author, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. E-mail: m.yakhchali@urmia.ac.ir
3. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. E-mail: fmalekifard@yahoo.com

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:
Received: May 29, 2022
Received in revised form: May 23, 2022
Accepted: May 27, 2022
Published online: April 15, 2023

Keywords:
Camellia sinensis,
Thymus vulgaris,
Eimeria spp.,
Oocysts,
Broiler chicken.

ABSTRACT

Coccidiosis is a parasitic protozoal disease throughout the world caused by *Eimeria* species. This disease is also common in Iran. There are many anticoccidial drugs, however; new drugs release are essential due to drug resistance. Green tea (*Camellia sinensis*) is a plant with antioxidant against diseases and thyme (*Thymus vulgaris*) has also antibacterial, antioxidant and antifungal effects. The anticoccidial drugs prescription are accompany with drug resistance and their poultry meat residue. Thus, the present study was aimed to investigate the effect of *C. sinensis* and *T. vulgaris* extracts on sporulation of *Eimeria* species oocysts of broiler chicken exereta. For this purpose, fecal samples were collected from broiler chicken farms of West Azerbaijan province, Iran. Oocysts were collected using floatation technique. A total number of 5×10^4 oocysts per mL exposed with different concentrations (20, 40, 60, 80 mg/ml) of *C. sinensis* and *T. vulgaris* in different times. Results indicated. *C. sinensis* and *T. vulgaris* extracts anticoccidial effect on sporulation of *Eimeria* oocysts was dose dependent. *C. sinensis* and *T. vulgaris* extracts inhibit sporulation of *Eimeria* oocysts at concentration of 80 and 60 mg/mL after 72h and 48h, respectively. It was concluded that *C. sinensis* and *T. vulgaris* extracts can inhibit sporulation of *Eimeria* oocysts under laboratory condition.

Cite this article: Khoshnejad, A., Yakhchali, M., & Malekifard, F. (2023). Effects of plant extracts of *Camellia sinensis* and *Thymus vulgaris* on sporulation of *Eimeria* oocysts of broiler exereta under laboratory conditions. *Iranian Journal of Animal Science*, 54 (1), 93-104. DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2022.337665.653892

© The Author(s).
Publisher: University of Tehran Press.
DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2022.337665.653892

Extended Abstract

Introduction:

Coccidiosis is a parasitic protozoal disease throughout the world caused by *Eimeria* species. This disease is also common in Iran. There are many anticoccidial drugs, however; new drugs release are essential due to drug resistance. Green tea (*Camellia sinensis*) is a plant with antioxidant against diseases and thyme (*Thymus vulgaris*) has also antibacterial, antioxidant and antifungal effects. The anticoccidial drugs prescription are accompany with drug resistance and their poultry meat residue. Thus, the present study was aimed to investigate the effect of *C. sinensis* and *T. vulgaris* extracts on sporulation of *Eimeria* species oocysts of broiler chickens.

University of Tehran Press

Iaranian Journal of Animal Science

Online ISSN: 2423-7949

Homepage: https://ijas.ut.ac.ir/

Materials and Methods:
Fecal samples were collected from broiler chicken farms of Urmia city suburb, West Azerbaijan province, northwestern Iran; and transferred to Parasitology division of Pathobiology department in Urmia Faculty of Veterinary Medicine. Oocysts were collected using floatation technique and incubated at 25-29 ºC and humidity 60-80% for 7 days with Dichromate K 2.5% till sporelated. The sporelated oocysts were washed several times and counted by using hemocytometer technique. To provide dried extract of *C. sinensis* and *T. vulgaris* in different concentrations (20, 40, 60, 80 mg/ml), they were solved in 10mL of stilled water. To determine components of the alcoholic extracts of each examined plant, it was analyzed using GC-MS (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA). To evaluate *in-vitro* effects of *C. sinensis* and *T. vulgaris* alcoholic extracts on sporelated oocysts of parasitic *Eimeria* of broiler chicken, a total number of 5×10^4 oocysts per mL were exposed with different concentrations (20, 40, 60, 80 mg/ml) of *C. sinensis* and *T. vulgaris* alcoholic extracts in different times.

Results:
GC-MS analyses demonstrated *C. sinensis* and *T. vulgaris* had 21 and 13 essential components which the highest components were caryophiline and Thymol, respectively. Results also indicated that anticoccidial effects of *C. sinensis* and *T. vulgaris* extracts on sporulation of *Eimeria* oocysts was dose dependent. *Camellia sinensis* and *T. vulgaris* extracts inhibit sporulation of *Eimeria* oocysts at concentration of 80 and 60 mg/mL after 72h and 48h, respectively. Different concentrations of *T. vulgaris* was significantly cause of sporulation reduction of *Eimeria* species. In addition, the sporulation rate of *Eimeria* spp. oocysts was significantly decreased with increasing incubation time.

Conclusions:
From the results of this study, it was concluded that *C. sinensis* and *T. vulgaris* alcoholic extracts can inhibit sporulation of *Eimeria* oocysts under laboratory condition. Furthermore, *T. vulgaris* alcoholic extract anticoccidial effect was better than *C. sinensis* with lower dose and time exposure. To investigate treatment effect of *C. sinensis* and *T. vulgaris* alcoholic extracts on broiler chicken coccidiosis, *in-vivo* examination of the both extracts were recommended.

Keywords: *Camellia sinensis*, *Thymus vulgaris*, *Eimeria* spp., Oocysts, Broiler chicken.

انتشارات دانشگاه تهران

علوم دامی ایران

شاپا الکترونیکی: ۷۹۴۹-۲۴۲۳

Homepage: https://ijas.ut.ac.ir/

مطالعه اثر برون‌تنی عصاره‌های چای سبز (*کاملیا سینسیس*) و آویشن (*تیموس ولگاریس*) بر اسپرولاسیون اووسیست‌های *ایمریا* انگل جوجه‌های گوشتی

علی خوش‌نژاد[۱] | محمد یخچالی[۲]✉ | فرناز ملکی‌فرد[۳]

۱. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: ali.agvet@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: m.yakhchali@urmia.ac.ir

۳. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: fmalekifard@yahoo.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۰۸

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۵/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۰۵

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۱/۲۶

کلیدواژه‌ها:
آویشن (*تیموس ولگاریس*)،
ایمریا،
اووسیست،
جوجه گوشتی،
چای سبز (*کاملیا سینسیس*).

چکیده

کوکسیدیوزیس یک بیماری تک‌یاخته‌ای با گسترش جهانی است که توسط گونه‌های *ایمریا* ایجاد می شود. در ایران نیز آلودگی به گونه‌های *ایمریا* مطرح می‌باشد. داروهای موثری برای درمان این بیماری عرضه شده است ولی مقاومت دارویی انگل همواره عرضه داروهای جدید را ضروری ساخته است. چای سبز (*کاملیا سینسیس*)، رادیکال‌های آزاد موجود در بدن را کاهش داده و بدن را در برابر بیماری‌ها محافظت می‌کند آویشن (*تیموس ولگاریس*) نیز دارای خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی و آنتی‌اکسیدان است. در تجویز داروهای ضدکوکسیدیایی، مقاومت دارویی در گونه‌های *ایمریا* و باقیمانده داروهای ضدکوکسیدیایی در گوشت طیور تحت درمان مطرح می‌باشد. بنابراین، مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر عصاره چای سبز و آویشن در مهار اسپرولاسیون اووسیست‌های *ایمریا* انگل جوجه‌های گوشتی انجام شد. به این منظور، نمونه های مدفوع از طیور گوشتی آلوده به *ایمریا* از مزارع مرغ گوشتی اطراف شهرستان ارومیه جمع‌آوری شد. اووسیست‌ها به روش شناورسازی جمع‌آوری شدند. 5×10^4 اووسیست در میلی‌لیتر در معرض غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره الکلی چای سبز و آویشن در زمان های مختلف قرار گرفتند. نتایج مطالعه نشان داد که عصاره‌های مورد استفاده اثر ضدکوکسیدیایی وابسته به دوز دارند. عصاره آویشن در غلظت ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در ۴۸ ساعت و عصاره چای سبز پس از ۷۲ ساعت و در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باعث توقف اسپرولاسیون اووسیست‌های *ایمریا* شدند. نتایج این مطالعه نشان داد عصاره چای سبز و آویشن توانایی توقف اسپرولاسیون اووسیست‌های گونه‌های *ایمریا* را دارند.

استناد: خوش‌نژاد، ع.، یخچالی، م. و ملکی‌فرد، ف (۱۴۰۲). مطالعه اثر برون‌تنی عصاره‌های چای سبز (*کاملیا سینسیس*) و آویشن (*تیموس ولگاریس*) بر اسپرولاسیون اووسیست‌های ایمریا انگل جوجه‌های گوشتی. *نشریه علوم دامی ایران*، ۵۴ (۱)، ۹۳-۱۰۴.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2022.337665.653892

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

CC BY NC

۱. مقدمه

کوکسیدیوزیس یک بیماری تک‌یاخته‌ای با گسترش جهانی است که توسط گونه‌های *ایمریا* ایجاد می شود. در ایران نیز آلودگی به گونه‌های *ایمریا* مطرح می‌باشد. به طوری که فراوانی آلودگی ماکیان در شمال ایران ۷۵ درصد، در جنوب غربی ۶۴ درصد، در شمال غرب ۵۵/۹۶ درصد و در شمال شرق ۳۸ درصد گزارش شده است (Razmi & Kalideri, 2000). در گزارش‌های دیگری تنوع گونه‌ای ایمریا در ماکیان در شمال را ۵ گونه، شمال شرق ۳ گونه و شمال غرب ایران را ۵ گونه گزارش کرده اند (Razmi & Kalideri, 2000). گونه‌های ایمریا با تخریب مخاط روده و ایجاد اختلالات گوارشی در جوجه‌های آلوده موجب بروز تلفات و افزایش ضریب تبدیل غذایی می‌شوند (Shirley, 1992). عوامل مختلفی نظیر حدت تک‌یاخته ایمریا، تعداد اووسیست دفعی، تراکم بالا در مرغداری، تهویه ضعیف، وضعیت ایمنی پایین میزبان، آنتریت باکتریایی، رطوبت زیاد بستر و عدم اثربخشی داروهای ضدکوکسیدیایی می‌توانند گسترش بیماری را تسهیل کنند (Shivaramaiah *et al*., 2014). به علاوه پرندگان آلوده، هزاران اووسیست غیراسپروله (اووسیست تازه دفع شده در مرحله مورولایی) را در بستر دفع می‌کنند و در شرایط مساعد رطوبت و گرمای آن اووسیست اسپروله و عفونت‌زا می‌شود این دوره از رشد انگل کوتاه است و برای ایجاد اختلال در فرآیند اسپرولاسیون به عنوان یک نقطه بحرانی در کنترل این تک‌یاخته مطرح است. زیرا جداره اووسیست ایمریا در برابر عوامل فیزیکی و شیمیایی بسیار مقاوم هستند (Conway & McKenzie, 2007).

در دهه ۱۹۴۰میلادی داروهای موثری برای درمان این بیماری عرضه شد. اما مقاومت دارویی انگل همواره عرضه داروهای جدیدتر را ضروری ساخته است. به علاوه استفاده از ترکیبات ضدکوکسیدیایی در آب و دان جوجه‌ها موجب درمان موفق بیماری می‌شود. از مشکلات عمده تجویز داروهای ضدکوکسیدیایی رایج، ایجاد مقاومت دارویی در گونه‌های ایمریا و باقیمانده داروهای ضدکوکسیدیایی در گوشت طیور تحت درمان می‌باشد (Abbas *et al*., 2010). امروزه نیاز قابل توجهی به استفاده از درمان‌های موثر و جدید در کنترل کوکسیدیوزیس در مرغداری‌ها بوده و جستجوی عوامل جایگزین سازگار با محیط زیست ضد ایمریا در اولویت می‌باشد. دربررسی های انجام شده، نقش برخی از گیاهان دارویی به عنوان ترکیبات ضدکوکسیدیایی در بهبود صنعت پرورش طیور به‌ویژه در جوجه‌های گوشتی در سراسر جهان مطرح است (Bozkurt *et al*., 2013). علاوه بر این برخی از عصاره‌های گیاهی سیستم ایمنی را تحریک می‌کنند و موجب افزایش سرعت رشد و بروز آثار ضدکوکسیدیایی می‌گردند (Abbas *et al*., 2011). مطالعات زیادی بر نقش گیاهان دارویی به عنوان راهبردهای جایگزین در کنترل کوکسیدیوزیس پرندگان و بهبود عملکرد طیوردر دنیا و ایران انجام شده است (Fatemi *et al*.,2015). استفاده از عصاره‌های گیاهی به عنوان دارو می‌تواند مقاومت کوکسیدیاها در برابر داروها و تاثیر باقی‌مانده‌های دارویی در گوشت بر سلامت مصرف کننده را کاهش دهند. زیرا عصاره‌های گیاهی نه تنها محصولات طبیعی هستند بلکه دارای مولکول های با خواص درمانی می‌باشند که هیچ مقاومتی نسبت به آنها گزارش نشده است (Ola-Fadunsin & Ademola, 2014). پلی‌فنل‌های چای سبز (کاملیا سیننسیس)، رادیکال‌های آزاد موجود در بدن را کاهش داده و بدن را در برابر بیماری‌ها محافظت می‌کند (Sigei *et al*., 2015). عصاره‌های متانولی، استونی و پلی‌فنل‌های چای سبز تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر بسیاری از میکروارگانیسم‌ها مانند کوکسی‌های گرم مثبت و باسیل‌های گرم منفی و نیز برخی از قارچ‌های بیماری‌زا و ویروس‌ها دارند (Chatterjee *et al*., 2020).

آویشن (*تیموس ولگاریس*) گیاهی است از تیره نعناعیان با ارتفاع ۱۰ تا ۳۰ سانتی‌متر و دارای خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی و نگهدارنده قوی و آنتی‌اکسیدان است. از برگ آویشن در بسیاری از صنایع از قبیل صنایع دارویی و بهداشتی و انواع نوشیدنی استفاده می‌شود. آویشن ترکیباتی نظیر فنل‌ها و هیدروکربن و مونوترپن و الکل ها دارد و تیمول ترکیب اصلی فنل در گیاه آویشن است (Prasanth *et al*., 2014). آویشن خواص آنتی‌اکسیدان، ضدعفونی کننده، ضد قارچ، ضد باکتری و ضد کرم

و افزایش میزان رشد در طیور گوشتی دارد (Raeisi *et al*., 2014). بنابراین، مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر ضدکوکسیدیایی عصاره‌های الکلی چای سبز و آویشن در شرایط برون‌تنی بر اسپرولاسیون اووسیست‌های *ایمریا* انگل جوجه‌های گوشتی انجام شد.

۲. مواد و روش‌ها

۲. ۱. روش تهیه عصاره الکلی چای سبز و آویشن

گیاه چای سبز و آویشن از بازار محلی ارومیه خریداری شد. هر کدام از گیاهان جداگانه خرد و به مدت یک هفته در سایه نگهداری شد، تا خشک شود. گیاه خشک شده با استفاده از مخلوط کن تجاری به روش مکانیکی پودر شد. برای تهیه عصاره‌ی متانولی، به ۱۰۰ گرم از پودر خشک گیاه ۴۰۰ میلی‌لیتر متانول مطلق اضافه گردید و به مدت یک ساعت به آرامی توسط شیکر مگنت‌دار مخلوط شد. محلول به دست آمده در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت باقی ماند. محلول دوباره مخلوط گردید و با استفاده از کاغذ صافی، صاف شد و حلال توسط ماشین گرداننده بخار تبخیر شد. سپس ماده باقی مانده منجمد و خشک گردید. ماده ته‌نشین شده (۴ گرم) در محفظه شیشه‌ای استریل ریخته شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده ذخیره گردید (Moazeni & Khademolhoseini, 2016). برای آماده کردن محلول عصاره‌های چای سبز و آویشن در غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶و ۰/۸ گرم از عصاره‌های خشک در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد.

۲. ۲. تعیین ترکیبات عصاره‌های الکلی گیاهان– طیف سنجی جرمی

برای تعیین ترکیبات موجود در عصاره‌های الکلی، ۱۰ میلی‌لیتر از هر کدام با استفاده از دستگاه GC-MS (Model 6890N; Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) دارای ستون HP-5MS (طول۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلیمتر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر) آنالیز گردید. برنامه دمای ستون شامل دمای اولیه کوره ۵۰ درجه سانتی‌گراد، دمای محفظه انژکتور ۲۹۰ درجه سانتی‌گراد و هلیوم به عنوان گاز حامل با سرعت ۱/۵ میلی‌متر در دقیقه بود. همچنین از طیف سنج جرمی با ولتاژ یونیزاسیون ۷۰ استفاده شد. شناسایی ترکیبات موجود در عصاره براساس مقایسه زمان نگهداری آن‌ها با نمونه‌های معتبر درستون مویرگی با نمونه‌های معتبر و داده‌های در دسترس صورت گرفت.

۲. ۳. جمع‌آوری اووسیست‌ها

نمونه‌های مدفوع جوجه‌های گوشتی در مرغداری‌های اطراف شهرستان ارومیه جمع‌آوری شد و به آزمایشگاه انگل‌شناسی، دانشکده دامپزشکی انتقال یافتند. پس از جداسازی اووسیست‌ها به روش شناورسازی و با استفاده از محلول آب نمک اشباع، اووسیست‌ها در دی‌کرومات پتاسیم ۲/۵ درصد و دمای ۲۹–۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۸۰–۶۰ درصد به مدت ۷ روز انکوبه گردیدند تا اسپروله شوند (Shirley, 1992). اووسیست‌های اسپروله چند بار با سرم فیزیولوژی ۹ در هزار شستشو داده شدند و در ۱۵۰۰g× به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا رسوب یابند. با شمارش تعداد اووسیست اسپروله در یک میلی‌لیتر به روش هماسیتومتر، میزان ۷×۱۰^{۵} در میلی لیتر اووسیست اسپروله به ۱۰ قطعه جوجه گوشتی خورانیده شد و به این ترتیب پس از گذرانیدن دوره آشکاری (زمان خورانیدن تا دفع اووسیست در مدفوع)، اووسیست‌های مورد نیاز برای آزمایش تهیه شدند. ۱۰– ۶ روز پس از ایجاد آلودگی، نمونه‌ی مدفوع جمع‌آوری شد و با یک مخلوط کن گردابی به مدت ۵ دقیقه هم زده شدند و دو بار از الک عبورداده شدند. محلول ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و سپس مایع رویی دور ریخته شد. رسوب با محلول آب نمک اشباع مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰g× سانتریفیوژ گردید. پس از جمع‌آوری اووسیست‌های شناور

شده، اووسیست‌ها چند بار با سرم فیزیولوژی ۹ در هزار شستشو داده شدند و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال تا زمان مجاورسازی با عصاره گیاهی نگهداری شدند (Conway & McKenzie, 2007).

۲. ۴. سنجش اثر عصاره الکلی چای سبز و آویشن بر اسپرولاسیون در شرایط برون‌تنی

برای ارزیابی آثار برون‌تنی هر یک از عصاره‌های الکلی چای سبز و آویشن بر اسپرولاسیون اووسیست *ایمریا*های انگل جوجه‌های گوشتی، ۵×۱۰^{۴} اووسیست غیراسپروله برای هر عصاره به تفکیک استفاده شد. گروه‌های آزمایش با ۳ تکرار شامل شاهد منفی (دی‌کرومات پتاسیم۲/۵درصد)، اتانول ۷۰ درصد، دیکلازوریل (یک ppm) و غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌های الکلی چای سبز و آویشن بودند (Gadelhaq *et al*., 2018). با اضافه کردن عصاره‌های الکلی چای سبز و آویشن به لوله های حاوی اووسیست هوادهی مداوم در انکوباتور با دمای ۲۹-۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۸۰-۶۰ درصد به مدت ۷۲ ساعت انکوباسیون انجام شد. در ساعت‌های ۱۲ و ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ شمارش اووسیست‌های با لام هموسیتومتر انجام شد و درصد اووسیست‌های اسپروله و غیر اسپروله ثبت شدند.

۲. ۵. ارزیابی آماری

داده‌ها با استفاده از مدل خطی عمومی (GLM) نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ با در نظر گرفتن زمان‌های ارزیابی (قبل و پس از افزودن عصاره)، با رویه داده‌های تکرار شونده در زمان (Repeated measurement) و با آزمون تعقیبی Tukey-Kramer test تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ بود.

۳. نتایج

در آنالیز کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی عصاره چای سبز ۲۱ ترکیب شناسایی شدند و جزء اصلی عصاره چای سبز کاریوفیلین (۱۴/۱۹درصد) بود (جدول ۱). همچنین درآنالیز کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی عصاره آویشن ۱۳ ترکیب شناسایی شدند که جزء اصلی عصاره آویشن تیمول (۴۸/۵۰درصد) بود (جدول ۲).

غلظت‌های مختلف عصاره الکلی چای سبز با افزایش مدت زمان انکوباسیون به طور معنی‌داری موجب کاهش اسپرولاسیون گونه‌های *ایمریا* شد ($p<۰/۰۵$؛ جدول ۳). در زمان‌های ۱۲ ساعت و ۲۴ ساعت انکوباسیون، تفاوت در میزان اسپرولاسیون گونه‌های *ایمریا* در غلظت ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گروه عصاره الکلی چای سبز در مقایسه با گروه شاهد و گروه دیکلازوریل معنی‌دار نبود (جدول ۳). در زمان ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت انکوباسیون، با افزایش غلظت عصاره الکلی چای سبز، اسپرولاسیون گونه‌های *ایمریا* به میزان معنی‌داری کاهش یافت ($p <۰/۰۵$؛ جدول ۳). در زمان ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت انکوباسیون، بیشترین میزان اسپرولاسیون گونه‌های *ایمریا* در گروه‌های شاهد و دیکلازوریل بود (جدول ۲). در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر گروه عصاره الکلی چای سبز و گروه اتانول۷۰ درصد، اسپرولاسیون گونه‌های *ایمریا* انجام نشد (جدول ۳).

میزان اسپرولاسیون در غلظت‌های مختلف عصاره الکلی گیاه آویشن (۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با افزایش زمان انکوباسیون به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد ($p <۰/۰۵$ ؛ جدول ۴). در زمان ۷۲ ساعت انکوباسیون، در غلظت۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اسپرولاسیون به میزان معنی‌داری صورت نگرفت ($p <۰/۰۵$ ؛ جدول ۴). همچنین در زمان ۴۸ ساعت انکوباسیون و غلظت ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اسپرولاسیون انجام نشد ($p <۰/۰۵$ ؛ جدول ۴).

جدول ۱. ترکیبات اصلی عصاره چای سبز

ردیف	اسم علمی	RT (دقیقه)	سطح (درصد)
۱	اسکوالن	۳۱/۶۴	۵/۲۲
۲	متیل استئارات	۲۲/۴۷	۱/۶۰
۳	متیل لینولینیت	۲۲/۱۴	۱/۱۳
۴	متیل لینولینیت	۲۲/۰۵	۰/۵۶
۵	نفتالن	۲۱/۹۱	۱/۴۵
۶	α –بولنسن	۲۱/۵۵	۵/۱۱
۷	α –مورولن	۲۱/۳۶	۰/۸۹
۸	ارموفیلین	۲۰/۸۲	۳/۰۱
۹	γ –مورولن	۲۰/۴۲	۳/۱۵
۱۰	n –هگزادکانوئیک اسید	۲۰/۲۱	۳/۱۱
۱۱	متیل هگزادکانوئیت	۱۹/۵۸	۳/۰۴
۱۲	هومولون	۱۹/۶۱	۲/۱۸
۱۳	کاریوهایلن	۱۸/۲۰	۱۴/۱۹
۱۴	α– گین	۱۸/۹۲	۸/۱۹
۱۵	γ– المن	۱۸/۶۹	۲/۰۴
۱۶	ایلانژن	۱۶/۲۱	۰/۳۷
۱۷	سیکلوساتیون	۱۶/۰۷	۰/۱۴
۱۸	α– کوبین	۱۵/۳۳	۸/۹۹
۱۹	اودسما–۳و۷(۱۱)–دی ان	۱۲/۱۷	۰/۵۴
۲۰	ژرانیول	۱۱/۷۸	۰/۸۹
۲۱	آلوآرومادندرن	۱۰/۲۸	۰/۶۴

جدول ۲. ترکیبات اصلی عصاره آویشن

ردیف	اسم علمی	RT (دقیقه)	سطح (درصد)
۱	–سایموo	۸/۲۱	۰/۳۲
۲	لینالول	۱۰/۸۷	۱/۰۶
۳	–ترپنول ۴	۱۳/۹۷	۰/۳۹
۴	ترپینول	۱۴/۵۱	۰/۷۶
۵	تیمول	۱۸/۷۵	۴۲/۲۶
۶	تیمولo-	۱۹/۱۴	۴۸/۵۰
۷	استات تیمول	۲۲/۰۲	۰/۵۴
۸	اوندک] ۷,۲,۰[ان،۱۱،۱۱،۴–۴– بایسیکلو	۲۳/۹۰	۱/۴۱
۹	آرومادندرن	۲۴/۶۹	۰/۵۳
۱۰	اسپاتولنول	۳۰/۰۵	۱/۴۲
۱۱	فارنسن	۳۰/۲۶	۱/۲۲
۱۲	۱۵،۱۱،۷،۳–تترامتیل– ۲– هگزادسن–۱–اول	۳۹/۱۹	۰/۹۲
۱۳	–هگزادکانوئیک اسیدn	۴۳/۱۴	۰/۴۸

در زمان ۱۲ ساعت و ۲۴ ساعت انکوباسیون، بالاترین میزان اسپرولاسیون در مقایسه با گروه شاهد، گروه دارو و گروه ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود (جدول ۴). در ۱۲ ساعت و ۲۴ ساعت پس از انکوباسیون، اسپرولاسیون با افزایش غلظت عصاره آویشن به طور معنی‌داری کاهش یافت (p <۰/۰۵؛ جدول ۴). در زمان ۴۸ ساعت پس از انکوباسیون، اختلاف بین گروه شاهد و گروه دارو معنی‌دار نبود. با افزایش در میزان غلظت عصاره الکلی آویشن میزان اسپرولاسیون

به طور معنی‌داری کاهش یافت، به طوری که در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اسپرولاسیون صورت نگرفت (جدول ۴). در زمان ۷۲ ساعت انکوباسیون، با افزایش غلظت عصاره آویشن میزان اسپرولاسیون کاهش پیدا کرد و از غلظت ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به بالا اسپرولاسیون صورت نگرفت. اسپرولاسیون در غلظت‌های ۶۰ و ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره الکلی آویشن و اتانول ۷۰ درصد اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۴).

جدول ۳. میزان اسپورزایی اووسیت‌های *ایمریا* در جوجه های گوشتی بعد از قرار گرفتن در معرض غلظت‌های مختلف عصاره چای سبز (میانگین ± انحراف استاندارد)

گروه		اسپرولاسیون (درصد)				p
زمان (ساعت) / غلظت (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)		۱۲	۲۴	۴۸	۷۲	
شاهد(-)		۱۰۰±۰ ^{Aa}	۹۷/۱۷±۰/۷۵ ^{Ba}	۹۳/۹۶±۰/۶۹ ^{Ca}	۹۰±۱/۱ ^{Da}	p <۰/۰۱
دیکلازوریل		۱۰۰±۰ ^{Aa}	۹۶/۶۹±۰/۷۱ ^{Ba}	۹۳/۶۵±۱/۸۳ ^{Ca}	۸۹/۹۰±۱/۴۳ ^{Da}	p <۰/۰۱
اتانول ۷۰		۲۳/۴۶±۱۵/۱ ^{Ae}	۰±۰ ^{Be}	۰±۰ ^{Bf}	۰±۰ ^{Be}	p <۰/۰۱
کاملیا سیننسیس (چای سبز)	۲۰	۱۰۰±۰ ^{Aa}	۹۷±۰/۷۳ ^{Ba}	۸۶/۲۷±۰/۹۵ ^{Cb}	۷۱/۶۸±۰/۹۴ ^{Db}	p <۰/۰۱
	۴۰	۹۱/۱۲±۰/۳۷ ^{Ab}	۶۳/۰۹±۰/۷۹ ^{Bb}	۵۴/۷۰±۱/۴۶ ^{Cc}	۴۲/۷۰±۰/۹۰ ^{Dc}	p <۰/۰۱
	۶۰	۶۳/۲۷±۰/۶۴ ^{Ac}	۴۴/۷۱±۱/۸۱ ^{Bc}	۲۵/۳۱±۱/۹۲ ^{Cd}	۱۷/۹۸±۱/۲۱ ^{Dd}	p <۰/۰۱
	۸۰	۵۷/۲۰±۰/۶۴ ^{Ad}	۱۵/۷۰±۱/۷۲ ^{Bd}	۴/۳۳±۱/۴۱ ^{Ce}	۰±۰ ^{De}	p <۰/۰۱
p		p <۰/۰۱	p <۰/۰۱	p <۰/۰۱	p <۰/۰۱	

Different superscripts (A-D) within the same row indicate a significant effect of treatment within each duration of storage. Different superscripts (a-e) within the same column indicate a significant effect of storage within each treatment.

جدول ٤. میزان اسپورزایی اووسیت‌های *ایمریا* در جوجه های گوشتی بعد از قرار گرفتن در معرض غلظت‌های مختلف عصاره آویشن میانگین ± انحراف استاندارد)

گروه		اسپرولاسیون (درصد)				p
زمان (ساعت) / غلظت (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)		۱۲	۲۴	۴۸	۷۲	
شاهد(-)		۱۰۰±۰ ^{Aa}	۹۷/۱۷±۰/۷۵ ^{Ba}	۹۳/۹۶±۰/۶۹ ^{Ca}	۹۰±۱/۱ ^{Da}	p <۰/۰۱
دیکلازوریل		۱۰۰±۰ ^{Aa}	۹۶/۶۹±۰/۷۱ ^{Ba}	۹۳/۶۵±۱/۸۳ ^{Ca}	۸۹/۹۰±۱/۴۳ ^{Da}	p <۰/۰۱
اتانول ۷۰		۲۳/۴۶±۱/۱۵ ^{Ae}	۰±۰ ^{Bd}	۰±۰ ^{Bf}	۰±۰ ^{Be}	p <۰/۰۱
تیموس وولگاریس (آویشن)	۲۰	۱۰۰±۰ ^{Aa}	۹۶/۶۸±۱/۰۶ ^{Ba}	۸۳/۸۴±۱/۶۸ ^{Cb}	۶۷/۱۰±۱/۵۲ ^{Db}	p <۰/۰۱
	۴۰	۸۶/۸۱±۱/۳۳ ^{Ab}	۵۱/۸۳±۱/۷۴ ^{Bb}	۴۵/۲۵±۱/۲۰ ^{Cc}	۳۵/۷۹±۱/۶۲ ^{Dc}	p <۰/۰۱
	۶۰	۵۷/۹۶±۱/۸۱ ^{Ac}	۳۳/۵۶±۱/۷۴ ^{Bc}	۲۶/۸۳±۱/۷۰ ^{Cd}	۰±۰ ^{Dd}	p <۰/۰۱
	۸۰	۴۰/۴۶±۲/۲۱ ^{Ad}	۲/۰۷±۰/۷۱ ^{Bd}	۰±۰ ^{Be}	۰±۰ ^{Bd}	p <۰/۰۵
p		p <۰/۰۱	p <۰/۰۱	p <۰/۰۱	p <۰/۰۱	

Different superscripts (A-D) within the same row indicate a significant effect of treatment within each duration of storage. Different superscripts (a-e) within the same column indicate a significant effect of storage within each treatment.

۴. بحث

در سال‌های اخیر قوانین سخت‌گیرانه‌تری در استفاده از مواد افزودنی، محرک‌های رشد، آنتی بیوتیک‌ها، ترکیبات ضدکوکسیدیایی و حتی ضدعفونی‌کننده‌ها وضع شده است. به علاوه نبود ضدعفونی‌کنندهای غیرسمی موثر بر کوکسیدیاها و محدودیت‌های وضع شده در استفاده از داروهای کوکسیدیو استات در تولیدات طیور، منجر به تحقیقات

وسیعی برای شناسایی یک روش جایگزین موثر و ایمن در کنترل کوکسیدیوزیس نظیر عصاره گیاهان شده است (Jitviriyanon *et al*., 2016). نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره‌های الکلی چای سبز و آویشن اثر قابل توجهی بر اسپرولاسیون اووسیست‌های ایمریا داشت. در مطالعات قبلی اثر ضدکوکسیدیایی برخی از ترکیبات گیاهی در شرایط آزمایشگاهی بر جوجه‌های گوشتی گزارش شده است (Pieri *et al*., 2014).

در مطالعه‌ی حاضر تأثیر غلظت‌های متفاوت عصاره‌های چای سبز و آویشن با توجّه به خواص این عصاره‌ها در شرایط آزمایشگاهی بر روی اسپرولاسیون اووسیست های *ایمریا* در طیور گوشتی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصله از تأثیر غلظت‌های متفاوت عصاره‌های ذکر شده بر روی اووسیست های *ایمریا* در شرایط آزمایشگاهی، اثر ضدکوکسیدیایی عصاره‌های الکلی چای سبز و آویشن وابسته به غلظت بود. به‌طوری‌که با افزایش غلظت عصاره‌های چای سبز و آویشن، اثر مهاری آن بر اسپرولاسیون اووسیست‌های گونه‌های *ایمریا* افزایش می‌یافت. از طرف دیگر در این تحقیق، با افزایش زمان مجاورت عصاره چای سبز و آویشن در هر یک از غلظت‌ها، تأثیر مهاری شان براسپرولاسیون اووسیست‌های گونه‌های *ایمریا* افزایش یافت. این یافته با نتایج سایر مطالعات که نشانگر اثرات ضد انگلی وابسته به غلظت عصاره چای سبز و آویشن بودند، مشابهت داشت (Hajihossein *et al*., 2020; Isakakroudi *et al*., 2018).

اخیراً در بسیاری از تحقیقات اثرات چای سبز بر میکروارگانیسم‌های مختلف گزارش شده است. در مطالعه‌ای، اثر کشندگی عصاره ۶ نوع چای از جمله چای سبز و چای سیاه در رشد باکتری‌های گرم مثبت گزارش شد (Chan *et al*., 2011). در مطالعه دیگری، اثربخشی غلظت‌های عصاره آبی چای سبز بر *انتروکوکوس فکالیس* به میزان قابل توجهی کمتر از هیپوکلریت سدیم ۱ درصد گزارش گردید. همچنین چای سبز میزان آلودگی به کرم *همونکوس کونترتوس* را کاهش داد (Fakae *et al*., 2020). چای سبز اثر ضد مالاریای آرتمیزینین را بدون تداخل با مسیر فولات تقویت کرد. همچنین عصاره چای سبز اشکال پروماستیگوت و آماستیگوت *لیشمانیا برازیلینس* و *لیشمانیاآمازونیستیس* را مهار کرد علاوه بر این، چای سبز فعالیت مهاری علیه گونه‌های *بابزیا* و تریپانوزوما *کروزی* داشته است (Inacio *et al*., 2014). نتایج تأثیر ضد انگلی چای سبز، در مطالعات ذکرشده با مطالعه حاضر که عصاره چای سبز موجب مهار اسپرولاسیون اووسیت‌های *ایمریا* شد، مشابهت داشت.

آویشن خواصی از قبیل ضد قارچ و ضد باکتری و ضد کرم و آنتی‌اکسیدان و ضدعفونی‌کننده دارد (Prasanth *et al*., 2014). فعالیت ضدمیکروبی آویشن به ترکیبات فنولی آن مثل تیمول و کارواکرول نسبت داده شده است. تیمول و کارواکرول با نفوذ به دیواره اووسیست و آسیب سیتوپلاسم موجب غیرفعال شدن آن می‌گردند (Williams, 1997; Molan & Liu, 2009). اثرات ضد ایمریایی اویشن در بوقلمون در شرایط آزمایشگاهی اثبات گردید (Isakakroudi *et al*., 2018). در مطالعه حاضر خاصیت ضد ایمریایی عصاره آویشن در مهار اسپرولاسیون اووسیست ایمریا ی طیور گوشتی نشان داده شد. در این مطالعه میزان اسپورولاسیون اووسیست ایمریا هایی که در معرض غلظت‌های مختلف آویشن قرار گرفته بود، با افزایش غلظت عصاره و زمان مواجهه کاهش یافت. همچنین در این مطالعه عصاره آویشن در غلظت ۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر بعد از ۷۲ ساعت مواجه باعث ممانعت صددرصد از اسپرولاسیون اووسیست ایمریا می شد. که این می‌تواند به علت وجود ترکیبات فنلی مانند ترکیبات تیمول و کارواکرول در این عصاره باشد. در مطالعات دیگر اثر ضد انگلی عصاره آویشن بر انگل های *اکانتومبا*، *لیشمانیا* و *تریکوموناس واژینالیس* نشان داده شده است. در اکثر این مطالعات اثر وابسته به دز عصاره اویشن به‌عنوان یک ماده ضد انگلی گزارش شده است (Shabestary *et al*., 2017; Barati *et al*., 2009; Azadbakht *et al*., 2003).

به موازات استفاده از عصاره‌ی چای سبز و آویشن، توانایی اتانول ۷۰ درصد و دیکلازوریل در غیرفعال سازی

اووسیست‌ها نیز بررسی شد. الکل اتانول ۷۰ درصد یک ماده شیمیایی ضدعفونی کننده است که فعالیت ضدکوکسیدیایی آن در سایر مطالعات نیز گزارش گردیده است (Gadelhaq *et al*., 2018). اتانول با تخریب دیواره اووسیست و دناتوره‌کردن پروتئین‌ها و متعاقب آن با لیز سلولی اثر ضد اووسیستی خود را اعمال می‌کند. همچنین اثر ضد اووسیستی دیکلازوریل توسط سایر محققین بر اووسیست‌ها گونه‌های ایمریا انگل ماکیان گزارش شده است (Fatemi *et al*., 2015). در حالی که در مطالعه حاضر داروی دیکلازوریل تأثیر چندانی بر اسپورزایی اووسیست های ایمریایی نداشت. البته تاثیر درمانی دیکلازوریل بر مراحل جنسی و غیرجنسی انگل به‌طور عمده در بدن ماکیان گزارش شده است (Bozkurt *et al*., 2013).

۵. نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه، در شرایط برون‌تنی عصاره‌های الکلی چای سبز و آویشن اسپروزوئیت اووسیست‌های *ایمریا* را مهار کرد. عصاره آویشن با دوز کمتر و در زمان کوتاه‌تر اثر ضدکوکسیدیایی بهتری نسبت به عصاره چای سبز داشت. برای بررسی اثر درمانی عصاره‌های الکلی چای سبز و آویشن در کوکسیدیوزیس جوجه‌های گوشتی مطالعات درون‌تنی عصاره‌های الکلی چای سبز و آویشن توصیه می گردد.

۶. تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه که با تصویب و حمایت مالی از پایان‌نامه به شماره ۵۱۴۴ امکان انجام مطالعه را فراهم آوردند و نیز همکاران در شبکه دامپزشکی شهرستان ارومیه، تشکر و قدردانی می نمایند.

۷. تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافعی بین نویسندگان وجود ندارد.

۸. منابع

ارجمند شبستری، ع، خالویی، م.، ارجمند زادگان، م.، اسلامی راد، ز. و قاسمی خواه، ر (۱۳۹۶). بررسی اثر اسانس گیاهان آویشن، نعنا، پونه و عصاره هیدروالکلی گل راعی بر روی کیست انگل آکانتامبا در شرایط آزمایشگاهی .*مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک*، ۲۰(۸)، ۱-۸.

براتی، م.، شریفی، ا.، شریفی فر، ف (۱۳۸۸). بررسی اثرات ضدلیشمانیایی عصاره های آویشن شیرازی، اسپند و مورد با روش رنگ سنجی به صورت برون تنی (*In vitro*). مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ۱۷(۱)،۳۲-۴۱.

حاجی حسین، ر.، اسلامی راد، ز.، رفیعی، ف.، نادری، غ. و اسدی، م (۱۳۹۸). اثر ضد آکانتامبایی عصاره چای سیاه و چای سبز در شرایط برون‌تنی .*فصلنامه گیاهان دارویی*، ۱۹ (۷۳) ، ۱۶۳-۱۶۹.

References

Abbas, R. Z., Iqbal, Z., Khan, M. N., Zafar, M. A., & Zia, M. A. (2010). Anticoccidial activity of *Curcuma longa* L. in broilers. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53, 63-67.

Abbas, R. Z., Iqbal, Z., Blake, D., Khan, M. N., & Saleemi, M. K. (2011). Anticoccidial drug resistance in fowl coccidia: the state of play revisited. *World's Poultry Science Journal*, 67(2), 337-350.

Abbas, R. Z., Colwell, D. D., & Gilleard, J. (2012). Botanicals: an alternative approach for the control of avian coccidiosis. *World's Poultry Science Journal*, *68*(2), 203-215.

Arjmand Shabestary, A., Khaloei, M., Arjomandzadegan, M., Eslamirad, Z., & Ghasemikhah, R. (2017). Effects of *Zataria*, *Mentha pulegium*, *Oregano* spp Essential Oil and hydroalcholic extract of *Hypericum perforatum o*n cyst of *Acanthamoeba* spp. *in vitro*. *Journal of Arak University Medical Sciences,* 20(8), 1-8. (In Persian)

Azadbakht, M., Ziaei, H., Abdollahi F,Shabankhani, B. (2003). Effect of Essential Oil of *Artemisia artemisia*, Shirazi Thyme and Case on *Trichomonas vaginalis*. *Medicinal Plants*, 8, 35-40.

Barati M, Sharif A, Sharififar F. Antiallomagnetic (2009). Effects of extracts of *Zataria multiflora*, *Peganum* and *Myrtus* were extracted by colorimetric method. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*, 7(1), 32-36. (In Persian)

Bozkurt, M., Giannenas, I., Küçükyilmaz, K., Christaki, E., & Florou-Paneri, P. (2013). An update on approaches to controlling coccidia in poultry using botanical extracts. *British Poultry Science*, *54*(6), 713-727.

Chan, E. W., Soh, E. Y., Tie, P. P., & Law, Y. P. (2011). Antioxidant and antibacterial properties of green, black, and herbal teas of *Camellia sinensis*. *Pharmacognosy Research*, *3*(4), 266.

Chatterjee, S., Ghosh, R., & Mandal, N. C. (2020). Inhibition of biofilm-and hyphal-development, two virulent features of *Candida albicans* by secondary metabolites of an endophytic fungus *Alternaria tenuissima* having broad spectrum antifungal potential. *Microbiological Research*, *232*, 126386.

Conway, D. P., & McKenzie, M. E. (2007). *Poultry coccidiosis: diagnostic and testing procedures*. John Wiley & Sons.

Fakae, L. B., Stevenson, C. W., Zhu, X. Q., & Elsheikha, H. M. (2020). *In vitro* activity of *Camellia sinensis* (green tea) against trophozoites and cysts of *Acanthamoeba castellanii*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, *13*, 59-72.

Fatemi, A., Razavi, S. M., Asasi, K., & Goudarzi, M. T. (2015). Effects of *Artemisia annua* extracts on sporulation of *Eimeria* oocysts. *Parasitology Research*, *114*(3), 1207-1211.

Gadelhaq, S. M., Arafa, W. M., & Abolhadid, S. M. (2018). *In vitro* activity of natural and chemical products on sporulation of *Eimeria* species oocysts of chickens. *Veterinary Parasitology*, *251*, 12-16.

Gottardi, W., & Block, S. S. (1991). Disinfection, sterilization and preservation. *Lea & Febiger: Philadelphia*, 152-165.

Hajihossein, R., Eslamirad, Z., Rafiei, F., Naderi, G., & Assadi, M. (2020). Anti-Acanthamoeba effect of *Camellia sinensis* extract (black and green tea) *in vitro*. *Journal of Medicinal Plants*, 19(73), 163-169. (In Persian)

Inacio, J. D., Gervazoni, L., Canto-Cavalheiro, M. M., & Almeida-Amaral, E. E. (2014). The effect of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate in vitro and in vivo in *Leishmania braziliensis*: involvement of reactive oxygen species as a mechanism of action. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *8*(8), e3093.

Isakakroudi, N., Talebi, A., Allymehr, M., & Tavassoli, M. (2018). Effects of essential oils combination on sporulation of turkey (*Meleagris gallopavo*) *Eimeria* oocysts. *Archives of Razi Institute*, *73*(2), 113-120.

Jitviriyanon, S., Phanthong, P., Lomarat, P., Bunyapraphatsara, N., Porntrakulpipat, S., & Paraksa, N. (2016). In vitro study of anti-coccidial activity of essential oils from indigenous plants against *Eimeria tenella*. *Veterinary Parasitology*, *228*, 96-102.

Moazeni, M., & Khademolhoseini, A. A. (2016). Ovicidal effect of the methanolic extract of ginger (*Zingiber officinale*) on *Fasciola hepatica* eggs: an in vitro study. *Journal of Parasitic Diseases*, *40*(3), 662-666.

Molan, A. L., Liu, Z., & De, S. (2009). Effect of pine bark (*Pious radiata*) extracts on sporulation of coccidian oocysts. *Folia Parasitologica* (Prague), 56(1), 1.

Ola-Fadunsin, S. D., & Ademola, I. O. (2014). Anticoccidial effects of Morinda lucida acetone extracts on broiler chickens naturally infected with *Eimeria* species. *Pharmaceutical Biology*, 52(3), 330-334.

Pieri, F. A., Silva, V. O., Vargas, F. S., Veiga Junior, V. F., & Moreira, M. A. S. (2014). Antimicrobial activity of *Copaifera langsdorffii* oil and evaluation of its most bioactive fraction against bacteria of dog's dental plaque. *Pakistan Veterinary Journal*, 34(2).

Prasanth Reddy, V., Ravi Vital, K., Varsha, P. V., & Satyam, S. (2014). Review on *Thymus vulgaris* traditional uses and pharmacological properties. *Medicinal and Aromatic Plants*, 3(164), 2167-0412.

Raeisi, M., Safamehr, A., Khodaei Ashan, S., & Habibi, R. (2015). Thyme (*Thymus vulgaris* L.) and Oregano (*Oreganum vulgare* L.) essential oils for broilers: effect on performance, antioxidant indices and blood biochemical parameters. *Animal Sciences Journal*, 27(105), 103-120. (in Persian)

Razmi, G. R., & Kalideri, G. A. (2000). Prevalence of subclinical coccidiosis in broiler-chicken farms in the municipality of Mashhad, Khorasan, Iran. *Preventive Veterinary Medicine*, 44(3-4), 247-253.

Shirley, M. W. (1992). Research on avian coccidia: an update. *British Veterinary Journal*, *148*(6), 479-499.

Shirley, M. W., Smith, A. L., & Tomley, F. M. (2005). The biology of avian *Eimeria* with an emphasis on their control by vaccination. *Advances in Parasitology*, *60*, 285-330.

Shivaramaiah, C., Barta, J. R., Hernandez-Velasco, X., Téllez, G., & Hargis, B. M. (2014). Coccidiosis: recent advancements in the immunobiology of *Eimeria* species, preventive measures, and the importance of vaccination as a control tool against these Apicomplexan parasites. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, *5*, 23.

Sigei, E. C., Muturi, M., & Bii, C. (2015). Antifungal activities of *Camellia sinensis* crude extract, mixture with milk, on selected pathogenic and mycotoxic fungi. *Journal of Medicinal Plants Research*, *9*(42), 1070-1080.

Williams, R. B. (1997). Laboratory tests of phenolic disinfectants as oocysticides against the chicken coccidium *Eimeria tenella*. *The Veterinary Record*, *141*(17), 447-448.