



Activité anticoccidienne *in vivo* de l'extrait aqueux des inflorescences de *Thonningia sanguinea* (Balanophoraceae) chez la poule pondeuse

Séverin Konan KOUAKOU¹, Alassane TOURE², Karamoko OUATTARA¹ et Jean David N'GUESSAN^{1*}

¹ Laboratoire de Pharmacodynamie Biochimique, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire.

² Service de Parasitologie, Laboratoire Central Vétérinaire de Bingerville, BP 206 Bingerville, Côte d'Ivoire.

* Auteur correspondant, E-mail : nguessanj@yahoo.fr, Tel.: (225) 05-785-789.

RESUME

La coccidiose causée par des parasites du genre *Eimeria*, est à l'origine de la baisse des performances zootechniques des oiseaux parasités. Les effets de *Thonningia sanguinea* (THOS), extrait végétal, ont été évalués sur le gain de poids, l'indice de consommation (I.C), les indices lésionnels et aussi sur l'aspect clinique, à savoir la morbidité, l'aspect des matières fécales et l'excrétion des oocystes. Pour ce faire, 4 lots de 20 poules ont été constitués. Trois lots de poules sont infectés via l'eau de boisson par 100000 oocystes (75% d'*Eimeria tenella* et 25% d'*Eimeria necatrix*) et un lot non contaminé non traité. Deux des trois lots contaminés (Lot 3 et Lot 4) ont reçu chaque jour et pendant une semaine respectivement une solution de THOS à 10 g /L et une solution contenant un anticoccidien (Superhipracox-p) à la dose indiquée (1 g/L). Les poules ont été infectées le 9^{ème} jour et le traitement a débuté le 24^{ème} jour. Tous les 3 jours, les poules sont pesées et des autopsies sont effectuées. Les résultats montrent que THOS améliore le gain de poids, l'indice de consommation, l'indice lésionnel et ainsi que les paramètres cliniques tels que la morbidité, l'aspect des matières fécales et le taux d'excrétion des oocytes.

© 2010 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés : *Thonningia sanguinea* - coccidiose – *Eimeria* - Superhipracox-p - poule

INTRODUCTION

Les coccidioses sont la traduction sous forme de maladie du parasitisme intracellulaire d'organismes microscopiques appelés coccidies. La coccidiose de la volaille est causée par neuf espèces de coccidies appelées *Eimeria* dont six parasitent la poule pondeuse. Elle est reconnue comme un facteur limitant des productions avicoles avec un impact sanitaire et zootechnique chez les poules (Bichet et al., 2003a). En effet, les coccidies provoquent une entérite souvent hémorragique pouvant conduire à la mort avec 50%, voire 90% de taux de mortalité surtout

chez les jeunes poulets (Vermeulen et al., 2001).

Pour lutter contre cette parasitose, les éleveurs utilisent des produits vétérinaires dont l'usage mal contrôlé et souvent inapproprié a entraîné une résistance des *Eimeria* à certains anticoccidiens usuel (Bichet et al., 2003b; Chapman, 2007 ; Abbas, 2008 ;). Ainsi, la recherche de nouvelles méthodes, plus naturelles, capables de réduire l'infection, de renforcer les défenses de l'hôte par modulation du système immunitaire, d'aider à la guérison et à la réparation des dommages causés par le parasite s'impose. Parmi les stratégies nouvelles, l'utilisation

© 2010 International Formulae Group. All rights reserved.

entre autres de probiotiques, d'extraits de plantes, d'épices, d'huiles essentielles est proposée (Créviu-Gabriel et al., 2001).

L'objectif de cette étude est de traiter la coccidiose induite chez la poule avec un extrait végétal codifié THOS qui est utilisé traditionnellement contre les infections cutanées et le traitement des diarrhées salmonellaires.

MATERIEL ET METHODES

Matériel

Matériel végétal

Le matériel végétal est constitué d'extrait aqueux d'une plante parasite appelée *Thonningia sanguinea* (Balanophoraceae) a été récolté dans la région de Daloa dans l'ouest de la Côte d'Ivoire et authentifié au Jardin Botanique d'Abidjan où un échantillon (Référence : Aké Assi 8355) est conservé.

Matériel animal

Pour notre étude, nous avons utilisé 80 poules pondeuses de race Isa-Brown et âgées de 36 jours avec un poids moyen de $450,77 \pm 1.50$ g. Les poules de chaque lot étaient numérotées de 1 à 20.

Méthodes

Extraction de THOS

Les inflorescences de THOS sont découpées et séchées à l'abri du soleil pendant dix jours, puis broyées jusqu'à l'obtention d'une poudre. A 2 L d'eau distillée, sont ajoutés 20 g de poudre de THOS. Le mélange obtenu est agité à la température ambiante pendant 48 h avec un agitateur magnétique. L'homogénat est filtré 7 fois sur du coton hydrophile et une fois sur du papier wattman 3 mm. Le filtrat est évaporé sous vide à 30 °C dans un Rotavapor Büchi. La poudre obtenue constitue l'extrait total aqueux de THOS.

Induction et traitement de la coccidiose

Quatre-vingts poules âgées de 36 jours ont été réparties en 4 lots de 20 poules :

- Un lot (Lot 1) non contaminé et non traité (témoin) ;
- Un lot (Lot 2) contaminé et non traité ;

- Un lot (Lot 3) contaminé et traité avec THOS ;
- Un lot (Lot 4) contaminé et traité avec un anticoccidien classique (Superhipracox-p).

L'inoculum a été préparé à partir d'un échantillon de fientes provenant d'une bande de 250 poules atteintes de coccidiose et enrichi au laboratoire selon la méthode décrite par Davis et al. (1973). Il contenait 100000 oocystes de deux espèces d'*Eimeria* : *Eimeria necatrix* et *Eimeria tenella*.

Les poules ont été contaminées via l'eau de boisson. Après les avoir assoiffé, les 3 lots (Lot 2, Lot 3 et Lot 4) reçoivent chacun au 9^{ème} jour, 1 L d'eau contenant 100000 oocystes (75% d'*E. tenella* et 25% d'*E. necatrix*).

Le traitement de la coccidiose a débuté le 24^{ème} jour. Il a été effectué selon la méthode décrite par Ouattara et al. (2005). Le Lot 3 a reçu chaque jour une solution de THOS à 10 g/L et le Lot 4 reçoit également chaque jour une solution d'anticoccidien classique à la concentration indiquée à savoir 1 g/L pour le contrôle de la coccidiose. Les 2 traitements ont duré une semaine. Les poules ont été pesées individuellement tous les 3 jours. Les analyses des scores lésionnels du tube digestif de 3 poules par lot et des prélèvements de fientes ont été effectués aux 16^{ème}, 24^{ème}, 30^{ème}, 37^{ème} et 42^{ème} jours (J16, J24, J30, J37 et J42).

Les litières des lots ont été constamment renouvelées pour réduire le risque d'une recontamination.

Le suivi ont porté sur les critères retenus dans l'appréciation du niveau de parasitisme des souches d'*Eimeria*, à savoir les gains de poids, l'indice de consommation, la mortalité due à la coccidiose, l'excrétion des oocystes, les lésions intestinales, l'indice clinique et l'aspect des matières fécales.

Analyse statistique des résultats

Nos résultats ont été soumis à une analyse de variance à l'aide d'un logiciel statistique approprié, GraphPad version 3.05 (GraphPad Software, U.S.A.). Le niveau de signification des différences entre les moyennes a été estimé par le

test appelé One-way ANOVA (Dunnett's-test) pour un seuil de 5%.

RESULTATS

Mortalité

Aucune poule n'est morte durant notre étude dans les quatre lots.

Gain de poids

Les poules des lots contaminés (Lot 2, Lot 3 et Lot 4) ont accusé une baisse de gain de poids par rapport au lot non contaminé (Lot1) du 9^{ème} jour au 24^{ème} jour (Figure 1). Cette diminution de gain de poids s'est prolongée jusqu'à la fin de notre étude pour le Lot 2 avec un gain de poids moyen de $13,50 \pm 1,19$ g. Par contre, nous avons observé à partir du 27^{ème} jour, une augmentation du gain de poids des lots Lot 3 et Lot 4 avec $65,25 \pm 1,49$ g pour le Lot 3 et $70,35 \pm 1,00$ g pour le Lot 4 contre $42,25 \pm 0,74$ g pour le Lot 1 au 42^{ème} jour. L'analyse statistique a montré qu'il existe une différence significative ($p < 0,05$) entre les gains de poids des lots contaminés et traités et le lot témoin.

Indice de consommation (i.c)

Les indices de consommation des trois lots contaminés ont augmenté entre les 9^{ème} et 24^{ème} jours par rapport au lot non infecté. Mais nous avons observé une diminution des indices des Lot 3 et Lot 4 à partir du 27^{ème} jour jusqu'au 42^{ème} jour avec un indice de 2,55 pour le Lot 4 contre 2,8 ; 3,3 et 4,98 respectivement pour les Lot 3, Lot 1 et Lot 2 (Figure 2).

Indice lésionnel

A J16, les autopsies de 3 poules par lot ont montré que toutes les poules étaient infectées dans les 3 lots contaminés. Les lésions dues à *E. necatrix* étaient faibles (scores lésionnel moyen $0,66 \pm 0,33$; $0,33 \pm 0,33$; $0,33 \pm 0,33$) respectivement pour le Lot 2 ; Lot 3 et le Lot 4. Par contre, les indices lésionnels caeaux dus à *E. tenella* étaient compris entre 2,3 et 2,6 (Figure 3 et 4).

A J23 et J30, les lésions au niveau de la partie moyenne de l'intestin grêle dues à *E. necatrix* ont augmenté mais restent cependant

faibles avec un indice moyen maximal de $1,6 \pm 0,33$ pour le Lot 4. Parallèlement, nous avons constaté une aggravation des lésions causées par *E. tenella* dont les indices moyens varient entre 2,3 et 3,6.

A J37 et J42, nous avons observé une diminution des lésions intestinales dans les lots traités avec Superhipracox-p et THOS. Pour le lot contaminé non traité, nous avons remarqué une persistance des lésions intestinales avec un indice moyen maximal de $1,6 \pm 0,33$ au 37^{ème} jour. Les mêmes évolutions ci-dessus ont été observées au niveau des lésions caecales avec un indice lésionnel moyen de $3,6 \pm 0,33$. Au niveau des 2 lots traités, nous avons observé une forte diminution des lésions chez les poules du Lot 4 avec un indice lésionnel de $0,6 \pm 0,33$ contre $1,3 \pm 0,33$ pour le Lot 3 au 42^{ème} jour. L'analyse statistique a montré qu'il existe une différence significative ($p < 0,05$) entre les différents indices lésionnels à J37 et J42.

Aucune lésion n'a été observée dans le lot non contaminé lors des autopsies.

Indice clinique

Les oiseaux des lots contaminés ont présenté un indice clinique caractéristique de la coccidiose à savoir une prostration avec une position en boule, ailes tombantes et plumes ébouriffées. Le lot non contaminé ne présentait aucun signe de coccidiose.

Les fientes des poules des lots infectés avaient une forte variabilité allant de l'aspect normal à une fiente très sanguinolente. Les fientes des poules du lot non contaminé étaient normales. Nous avons observé une amélioration de l'aspect des poules et de leurs fientes pendant le traitement.

Excrétion d'oocystes

Nous avons remarqué une présence d'oocystes dans les fientes de tous les lots infectés. Cette présence a été constante dans le lot infecté non traité avec une excrétion supérieure à 120000 OPG durant l'étude. Par contre, chez les 2 lots traités, nous avons observé une diminution des oocystes excrétés avec 150 OPG pour le Lot 4 contre 5200 OPG pour le Lot 3 au 42^{ème} jour (Figure 5).

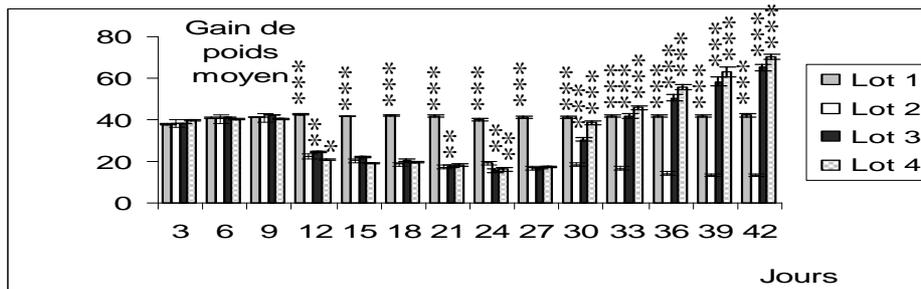


Figure 1 : Gain de poids moyen (g) des poules par lot.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type (n = 20). * il y a une différence significative à P < 0,05 par rapport à la moyenne du lot contaminé non traité ; ** il y a une différence significative à P < 0,01 par rapport à la moyenne du lot contaminé non traité ; *** il y a une différence significative à P < 0,001 par rapport à la moyenne du lot contaminé non traité.

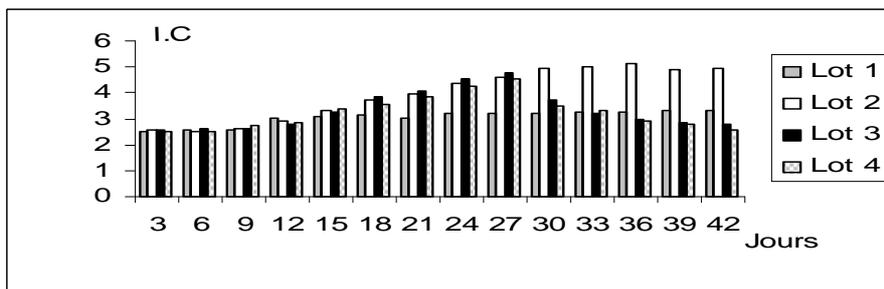


Figure 2 : Indice de consommation (I.C.) des poules par lot.

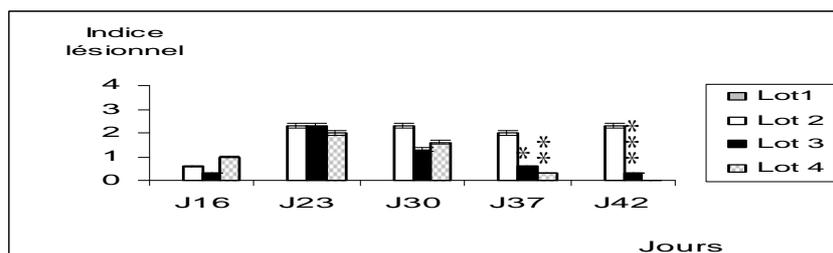


Figure 3 : Indice lésionnel moyen des poules du à *E. necatrix*.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type (n = 20). * il y a une différence significative à P < 0,05 par rapport à la moyenne du lot contaminé non traité ; ** il y a une différence significative à P < 0,01 par rapport à la moyenne du lot contaminé non traité ; *** il y a une différence significative à P < 0,001 par rapport à la moyenne du lot contaminé non traité.

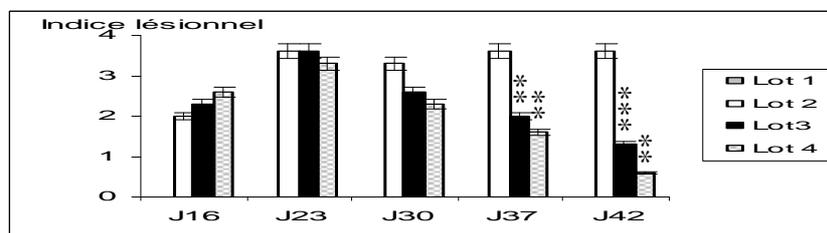


Figure 4 : Indice lésionnel moyen des poules du à *E. tenella*.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type (n = 20). ** il y a une différence significative à P < 0,01 par rapport à la moyenne du lot contaminé non traité ; *** il y a une différence significative à P < 0,001 par rapport à la moyenne du lot contaminé non traité.

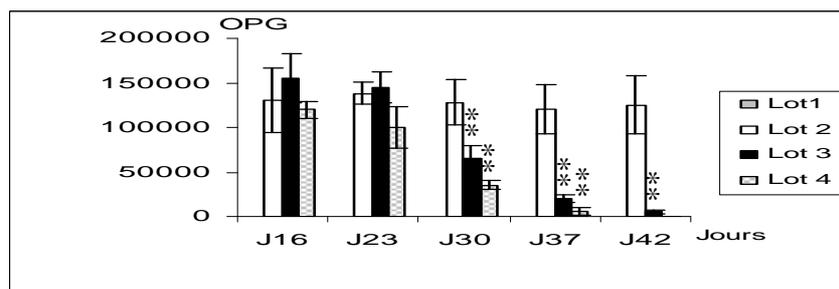


Figure 5 : Excrétion des oocystes par gramme (OPG) de matière fécale par lot.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart type (n = 20). ** il y a une différence significative à $P < 0,01$ par rapport à la moyenne du lot contaminé non traité.

DISCUSSION

Les gains de poids moyens des poules traitées respectivement avec THOS (Lot 3) et Superhipracox-p (Lot 4) ont été significativement différents ($p < 0,05$) de ceux des poules du lot contaminé non traité (Lot 2) et non contaminé et non traité (Lot 1) au 42^{ème} jour d'expérimentation. Les gains de poids moyens des lots traités étaient supérieurs à partir du 36^{ème} jour au lot non contaminé non traité et au lot contaminé non traité à partir du 30^{ème} jour d'expérimentation. Les gains de poids moyens des poules infectées ont connu une amélioration après traitement. THOS a amélioré donc le gain de poids des poules contaminées et traitées. M'baïasbé (1998) et Ouattara et al. (2007) ont montré l'effet bénéfique de THOS sur la croissance pondérale des poules saines et atteintes de salmonelloses. Mais le gain de poids du Lot 4 est resté supérieur à celui du lot infecté et traité avec THOS pendant le traitement. Cette amélioration a été observée aussi au niveau de l'indice de consommation qui est inférieur à celui du Lot 1 et du Lot 2 au 42^{ème} jour avec un indice de 2,8 pour le Lot 3 et 2,55 pour le Lot 4 contre 3,3 et 4,98 respectivement pour le Lot 1 et le Lot 2. THOS a réduit l'indice de consommation des poules infectées avec *E. necatrix* et *E. tenella*. En effet, selon Crévieu-Gabriel et al. (2001), les extraits végétaux à base de tanins et de saponines améliorent les performances zootechniques des poulets.

THOS est un extrait riche en tanins et saponines ; ce qui pourrait expliquer l'amélioration de l'indice de consommation

des poules atteintes de coccidiose (Kouakou et al., 2006). Les indices lésionnels dus au développement de *E. necatrix* des lots contaminés et traités ont été faibles par rapport à ceux du Lot 2 après le 30^{ème} jour. Cet indice est resté légèrement supérieur à la moyenne (2,3) après le 30^{ème} jour pour le Lot 2. THOS a permis donc de contrôler le développement de *E. necatrix*.

Les lésions causées par *E. tenella* ont été importantes notées de 3 à 4 (score moyen 3,6) pour le Lot 2. Ces lésions ont été améliorées chez les poules des lots traités avec THOS et Superhipracox-p pendant et après traitement avec un indice lésionnel de $1,3 \pm 0,33$ et $0,6 \pm 0,33$ respectivement pour le Lot 3 et le Lot 4. Sur la période de traitement, THOS a significativement ($p < 0,05$) diminué les indices lésionnels dus à *E. tenella* par rapport au Lot 2. THOS a permis la réduction des lésions causées par *E. necatrix* et *E. tenella*, ce qui a entraîné une amélioration de la performance zootechnique des poules telles que l'indice de consommation et l'indice lésionnel quand on sait que celle-ci est affectée lorsque l'indice lésionnel est supérieur ou égal à 2 (Naciri, 2000). L'effet bénéfique des extraits végétaux contre des infections multiples ou monospécifiques avec soit *E. tenella*, soit *E. acervulina* a été déjà mis en évidence par plusieurs auteurs (Youn et al., 2001 ; Jaipurkar et al., 2002 ; Florou-Paneri et al., 2003 ; Christaki et al., 2004 ; Du, 2004 ; Kurkure, 2006 ; Chandrakesan, 2009).

Les matières fécales ont été diarrhéiques et parfois très sanguinolentes

dans tous les lots infectés avant traitement. Mais nous avons observé une amélioration de l'aspect des fientes dans le Lot 3 et Lot 4 après traitement. Cette amélioration pourrait se justifier par l'effet de THOS et Superhipracox-p sur les lésions causées par les deux espèces au cours de la guérison. Nous avons constaté une diminution des oocystes dans les fientes des poules des Lot 3 et Lot 4 à partir du 30^{ème} jour. Ce qui pourrait aussi s'expliquer par la sensibilité des deux espèces vis-à-vis de THOS et de Superhipracox-p.

La mortalité a été nulle dans tous les lots. Mais les poules contaminées et non traitées ont été cliniquement atteintes à la fin de notre étude. THOS a entraîné une diminution de la morbidité. Ces résultats observés pourraient s'expliquer par les propriétés antioxydantes de THOS mise en évidence par N'guessan et al., (2007) qui ont isolé deux molécules antioxydantes acide gallique, acide brévilfolin carboxylique de THOS. Par ailleurs, deux autres molécules antioxydantes nommées Thonningianins A et B ont été également isolées des racines de la même plante (*Thonningia sanguinea*) par Ohtani et al. (2000). Tzung-Hsun et al. (2005) et Ben-Shaul et al. (2000) ont montré l'intérêt des substances antioxydantes apportées par l'alimentation pour réduire les lésions tissulaires dans les processus infectieux et améliorer le fonctionnement et la durée de vie des cellules immunitaires. Les études menées par Saarinen et al. (2001) ont montré que l'utilisation d'extraits végétaux pouvait réduire le stress oxydatif chez le poulet, donc réduire les lésions et retarder le développement du parasite. Outre les effets antioxydants et immunostimulants des extraits de plantes et notamment des saponines et les tannins que ces extraits renferment, on peut également évoquer les effets cytotoxiques de ces substances pour expliquer les effets positifs des extraits de plantes (Francis et al., 2002 ; Makkar, 2003).

Conclusion

THOS a permis l'amélioration de certains paramètres zootechniques et cliniques chez les poules atteintes de coccidiose

provoquée par *E. necatrix* et *E. tenella*. En effet, THOS a entraîné une augmentation du gain de poids tout en réduisant l'indice de consommation et l'indice lésionnel. Il a permis donc de réduire la morbidité, l'excrétion des oocystes et d'améliorer l'aspect des matières fécales. THOS pourrait constituer une alternative aux anticoccidiens classiques dans le traitement de la coccidiose de la poule pondeuse.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbas RZ, Iqbal Z, Sindhu Z-D, Khan MN, Arshad M. 2008. Identification of cross-resistance and multiple in *Eimeria tenella* field isolates to commonly used anticoccidials in Pakistan. *Poult Res.*, **17**: 361 - 368.
- Ben-Shaul V, Lomnitski L, Nyska A, Carbonatto M, Peano S, Zurovsky Y, Bergman M, Eldridge SR, Grossman S. 2000. Effect of natural antioxidants and apocynin on LPS-induced endotoxemia in rabbit. *Hum. Exp. Toxicol.*, **19**(11): 604 – 614.
- Bichet H, Sanaa M, Dorchie PH., Reperant JM. 2003. Impact sanitaire et zootechnique des coccidioses cliniques chez la poule pondeuse au Sénégal. *Revue Méd. Vét.*, **154**(6): 431 – 438.
- Bichet H, Sanaa M, Dorchie PH, Reperant JM. 2003. Mise en évidence de coccidies multi-résistantes chez la poule pondeuse au Sénégal. *Revue Méd. Vét.*, **154**(6): 439-446.
- Chandrakesan P, Muralidharan K, Kumar VD, Ponnudurai G, Harikrishnan TJ, Rani KSVN. 2009. Efficacy of herbal complex against caecal coccidiosis in broiler chickens. *Vet. Arhiv.* **79**(2): 199 – 203.
- Chapman HD, Rathinan T. 2007. Sensitivity of field isolates of *Eimeria* to Monensin in the Turkey. *Avian. Diseases.*, **51**: 954 – 957.
- Christaki E, Florou-Paneri P, Giannenas I, Papazahariadou M, Botsoglou NA, Spais AB. 2004 Effect of a mixture of herbal extracts on broiler chickens infected with *Eimeria tenella*. *Anim. Res.*, **53**: 137-144.

- Créviu-Gabriel I, Naciri M. 2001. Effet de l'alimentation sur les coccidioses chez le poulet. *INRA Prod. Anim.*, **14**(4): 231-246.
- Davis LR, Hammond DM, Long PL. 1973. *The Coccidia*. University Park Press: Baltimore; 411-458.
- Du A, Hu S. 2004. Effects of herbal complex against *Eimeria tenella* infection in chickens. *J. Vet. Med.*, **51**: 194 – 197.
- Florou-Paneri P, Christaki E, Giannenas I, Papazahariadou M, Botsoglou NA, Spais AB. 2003. Effect of dietary Olympus tea (*siderites scardica*) supplementation on performance of chickens challenged with *Eimeria tenella*. *J. An. Feed Sci.*, **13**(2): 301-311.
- Francis G, Kerem Z, Makkar HPS, Becker K. 2002. The biological action of saponins in animal systems. *Brit. J. Nutr.*, **88**: 587 – 605.
- Jaipurkar SG, Deshpande PD, Narladkar BW, Rajurkar SR. 2002. Evaluation of herbal anticoccidials against experimentally induced caecal coccidiosis in broiler chickens. *Indian Vet. J.*, **79**(9): 891-895.
- Kouakou AV, N'guessan JD, Kra AM, Guede-Guina F. 2006. Activité antifongique et screening phytochimique de THOS (extrait aqueux de *Thonningia sanguinea*). *J. Soc. Ouest. Afr. Chim.*, **22**: 21-25.
- Makkar HPS. 2003. Tannin assays, effects end fate of tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich tree and shrub foliage. *Small Ruminant Research*, **49**: 241-256.
- M'baïasbé YJ. 1998. Influence de la salmonellose sur la poule pondeuse et sur les œufs de consommation : Essais thérapeutiques. Thèse Biosciences, Université de Cocody Abidjan, p 96.
- Naciri M. 2000. *Coccidioses du Poulet*. INRA-Bayer. Edition Bayer Pharma Santé Animale: Puteaux, France.
- N'guessan JD, Bidié AP, Lenta BN, Weniger B, André P, Guédé- Guina F. 2007. *In vitro* assays for bioactivity-guided isolation of antisalmonella and antioxidant compound in *Thonningia sanguinea*. *Afr. J. Biotechnol.*, **6**(14): 1685-1689.
- Ohtani II, Gotoh, N, Tanaka J, Higa T, Gyamfi A, Aniya Y. 2000. Thonningianins A and B, New Antioxidants from the African Medicinal herb *Thonningia sanguinea*. *J. Nat. Prod.*, **63**: 676-679.
- Ouattara K, Coulibaly A, N'guessan JD, Djaman AJ, Guede-Guina F. 2005. Activité anti-diarrhéique de *Thonningia sanguinea* (THOS) sur les infections à *Salmonella enterica* serotype Enteritidis lysotype 6 chez la poule pondeuse. *Rev. Ivoir. Sci. Technol.*, **6**: 151-160.
- Ouattara K, Coulibaly A, N'guessan JD, Djaman AJ, Guede-Guina F. 2007. Effets *Thonningia sanguinea* (THOS) sur la qualité des oeufs et le taux de ponte des poules au cours d'une salmonellose expérimentale à *Salmonella enterica* serotype Enteritidis lysotype 6. *Agron. Afr.*, **19**(1): 1-102.
- Saarinen MT, Kettunen H, Pulliainen K, Peuranen S, Tiihonen K, Remus J. 2001. A novel method to analyze betaine in chicken liver: effect of dietary betaine and choline supplementation on the hepatic betaine concentration in broiler chicks. *J. Aric. Food. Chem.*, **49**: 559–563.
- Tzung-Hsun T, Po-Jung T, Su-Chen H. 2005. Antioxidant and anti-inflammatory activities of several commonly used spices. *Journal of Food Science*, **70**: 93–97.
- Vermeulen AN, Schaap DC, Schetters TM. 2001. Control of coccidiosis in chickens by vaccination. *Vet. Parasitol.*, **100**: 13–20.
- Youn HJ, Noh JW. 2001. Screening of the anticoccidials effects of herb extracts against *Eimeria tenella*. *Vet. Par.*, **96**(4): 257-26.