

Original Article

Effect of induction of immune responses against Newcastle clone vaccine in SPF chickens fed with probiotics

Mohammad Majid Ebrahimi^{*1}, Naheed Mojtani¹, Shahla Shahsavandi¹,
Naser Ghodsian¹, AliReza Yousefi¹, AhmadReza Mohammadi¹

1. Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran

Received: 2024.10.19

Accepted: 2025.01.16

Revised: 2025.01.04

Published: 2025.10.01

* E-mail: mm.ebrahimi@rvsri.ac.ir

Abstract

Introduction: The use of probiotics as dietary supplements is a practical approach to enhancing immune system performance and increasing resistance to infectious diseases. **Objective:** This study aimed to evaluate the effect of a probiotic on cellular and humoral immune responses in Specific Pathogen Free (SPF) Leghorn chickens following vaccination with the clone Newcastle disease (ND) vaccine. **Materials and Methods:** A total of 120 SPF chickens were randomly assigned to six experimental groups in a 2×3 factorial arrangement and reared until 10 weeks of age. The chickens received the vaccine by the eye-drop method at 7 and 21 days of age and were fed the probiotic throughout the experimental period. Weekly blood samples were collected to evaluate the humoral immune response against Newcastle disease virus (NDV). In addition, cellular immune responses were measured by basophil skin sensitivity and T lymphocyte proliferation tests. **Results:** Among the experimental groups, the combination of the Razi clone vaccine and Hypro-Zyme probiotic significantly improved the antibody titer against NDV ($P<0.05$). This group also exhibited higher basophilic skin sensitivity and increased T lymphocyte proliferation compared to chickens vaccinated with the imported clone vaccine and not fed probiotics ($P<0.05$). **Conclusion:** In general, the results indicated that feeding Hypro-Zyme probiotic increased antibody titers against NDV in SPF chickens vaccinated with the clone vaccine and also stimulated stronger cell-mediated immune responses. Based on these results, feeding Hypro-Zyme probiotic to vaccinated birds is expected to enhance resistance against virulent NDV through improved immune system responses.

Keywords: antibody titer, cutaneous basophil hypersensitivity, T lymphocyte proliferation assay antibody titer, cellular immunity, Newcastle vaccine, probiotics



Authors retain the copyright and full publishing rights.

Published by [Razi Vaccine & Serum Research Institute](#) This article is an open access article licensed under the [Creative Commons Attribution 4.0 International \(CC BY 4.0\)](#)

اثر القای پاسخ های ایمنی علیه واکسن نیوکاسل کلون در جوجه های FPS تغذیه شده با پروبیوتیک

محمد مجید ابراهیمی^{*}، ناهید مژگانی^۱، شهلا شاهسوندی^۱، ناصر قدسیان^۱

علیرضا یوسفی^۱، احمد رضا محمدی^۱

۱. مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات ترویج و آموزش کشاورزی، کرج،



تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۲۸

تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۷/۰۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۱۰/۱۵

* E-mail: mm.ebrahimi@rvsri.ac.ir

چکیده

مقدمه: استفاده از پروبیوتیک ها به عنوان مکمل های خوراکی، از راهکارهای بهبود سیستم ایمنی و افزایش مقاومت در برابر بیماری های عفونی به شمار می آیند. **هدف:** هدف این پژوهش، بررسی اثر استفاده از پروبیوتیک تجاری هایپروزیم بر پاسخ ایمنی سلولی و هومورال جوجه های عاری از عوامل بیماری زای خاص (Specific Pathogen Free: SPF) با منشأ سویه تخم گذار لگهورن متعاقب واکسیناسیون با واکسن نیوکاسل کلون بود. **روش کار:** تعداد ۱۲۰ قطعه جوجه SPF در شش گروه تقسیم (آرایش فاکتوریل ۲×۳) و تا ۱۰ هفتهگی در قالب طرح کاملاً تصادفی آزمایش شدند. پرندگان در ۷ و ۲۱ روزگی یک دز واکسن نیوکاسل کلون (رازی یا وارداتی) یا PBS را به صورت قطره چشمی دریافت کردند. تغذیه پروبیوتیک از یک روزگی تا پایان دوره انجام شد، درحالی که در گروه شاهد تغذیه پروبیوتیک انجام نشد. به منظور ارزیابی پاسخ ایمنی هومورال و اندازه گیری عیار آنتی بادی علیه بیماری نیوکاسل، خون گیری به صورت هفتهگی انجام شد. همچنین، پاسخ ایمنی سلولی با آزمون حساسیت پوستی بازوفیل و آزمون تزاید لنفوسیت T سنجش شد. **یافته ها:** بین گروه های آزمایشی، استفاده هم زمان از واکسن کلون رازی و تغذیه با پروبیوتیک به افزایش میانگین عیار آنتی بادی علیه نیوکاسل در کل دوره منجر شد ($P<0.05$). همچنین این تیمارها باعث بهبود پاسخ حساسیت پوستی بازوفیلی و تزاید لنفوسیت های T نسبت به جوجه های واکسینه شده با واکسن کلون وارداتی و تغذیه نشده با پروبیوتیک شد ($P<0.05$). **نتیجه گیری:** به طور کلی، تغذیه جوجه های SPF با پروبیوتیک هایپروزیم سبب افزایش عیار سرمی نیوکاسل متعاقب واکسیناسیون با واکسن نیوکاسل کلون و همچنین تحریک بیشتر ایمنی سلولی می شود. با این نتایج، می توان انتظار داشت که تغذیه با پروبیوتیک هایپروزیم در پرندگان واکسینه شده، به دلیل تقویت سیستم ایمنی، مقاومت بیشتری در مقابل ویروس های حاد نیوکاسل حاصل شود.

کلمات کلیدی: عیار آنتی بادی، حساسیت پوستی بازوفیل، تزاید لنفوسیت T، ایمنی سلولی، واکسن نیوکاسل، پروبیوتیک

مقدمه

امروزه با توجه به افزایش حساسیت طیور به انواع عفونت‌ها و بیماری‌ها، به‌خصوص بیماری‌های ویروسی، تقویت سیستم ایمنی ضروری است. استفاده از برخی ترکیبات محرک سیستم ایمنی در جیره غذایی طیور تخم‌گذار می‌تواند سبب بهبود سیستم ایمنی پرنده و پاسخ ایمنی در برابر واکنش‌های ویروسی شود. یکی از مهم‌ترین افزودنی‌ها محصولات میکروبی هستند که به‌طور زنده و مستقیم در جیره به مصرف می‌رسند و با عنوان پروبیوتیک شناخته می‌شوند (۱).

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که برای بهبود و اصلاح جمعیت‌های باکتریایی دستگاه گوارش، به خوراک حیوانات یا انسان اضافه می‌شوند و استفاده از آن‌ها به‌صورت افزودنی به غذا یا آب، باعث افزایش جمعیت باکتری‌های مفید و کاهش یا توقف گسترش استقرار عوامل بیماری‌زا می‌شود (۲). پروبیوتیک‌ها نقش مهمی در حفظ تعادل فلور دستگاه گوارش، بهبود استفاده از خوراک، افزایش جذب مواد مغذی و بهبود عملکرد تولید گوشت و همچنین تعدیل واکنش‌های ایمنی، تنفس، التهاب و عملکرد دستگاه گوارش دارند (۳). این مواد تأثیرات مثبتی بر تعدیل سیستم ایمنی هومورال، سلولی و غیراختصاصی دارند. در روده پرنده، سیستم لنفوییدی مرتبط با دستگاه گوارش (GALT) شامل سلول‌های ایمنی مانند T، B، ماکروفاژها و سلول‌های کشنده طبیعی است و در هفته دوم پس از هچ کامل و بالغ می‌شود (۴). کلونیزاسیون باکتری‌های همسفره (commensal) بلافاصله پس از هچ آغاز می‌شود. این باکتری‌ها با GALT تعامل نزدیکی دارند که می‌تواند پاسخ‌های ایمنی موضعی و سیستمیک را تنظیم کند (۵). با تغذیه از پروبیوتیک، تعداد لنفوسیت‌ها در سلول‌های دیواره روده افزایش می‌یابد و تولید پادتن، به‌ویژه ایمونوگلوبولین A تحریک می‌شود. افزون بر این، افزایش فعالیت بیگانه‌خواری ماکروفاژها، تولید ترکیبات ضد باکتریایی، افزایش ترشح اینترفرون‌های گاما و نیز افزایش تولید ایمونوگلوبولین‌های M و G سیستم ایمنی تحریک می‌شوند. بدین ترتیب برهم‌کنش GALT و باکتری‌های همسفره موجود در پروبیوتیک‌ها می‌تواند موجب تقویت ایمنی ذاتی و اختصاصی، و تنظیم پاسخ‌های ایمنی موضعی و سیستمیک شود (۶).

به‌طور کلی، این پروبیوتیک‌ها قابلیت افزایش عملکرد ایمنی با فعال

کردن سلول‌های ایمنی، افزایش تعداد سلول‌های T و B، بهبود تکثیر و بلوغ این سلول‌ها، افزایش قابلیت شناسایی سیستم ایمنی، و القای سایتوکاین‌ها را دارند. مطالعات نشان داده‌اند گونه‌های مختلف پروبیوتیک مانند *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس روتری*، و *لاکتوباسیلوس سالیواریس* با درجات متفاوت بیان $IFN-\gamma$ ، $IL-1\beta$ ، $IL-10$ ، و $IL-18$ در سلول‌های طحال و سكال تانسيل القا می‌کنند که سبب تنظیم ایمنی ذاتی و اکتسابی می‌شود (۷، ۸) یا بر میزان بیان ژن‌های موثر در سیستم ایمنی مانند $IL-4$ ، $IL-7$ ، $IFN-\alpha$ ، پرفورین، و گرآنزیم دارند (۹، ۱۰).

بهبود عملکرد سیستم ایمنی یکی از مزایای مهم از ترکیب پروبیوتیک‌ها در تولید طیور است و این مکمل‌ها می‌توانند افزون بر بهبود پاسخ ایمنی سیستمیک که با افزایش عیار آنتی‌بادی کل سرم و تغییر چشمگیر در بیان ژن‌های مختلف همراه است (۱۱)، مقاومت طیور در برابر طیف وسیعی از بیماری‌ها مانند آنفلوآنزای پرندگان را افزایش دهند (۱۳-۱۵). بیماری نیوکاسل یکی از بیماری‌های ویروسی مهم در طیور است که موجب عفونت دستگاه تنفسی و مرگ‌ومیر بالای جوجه‌ها می‌شود (۱۶). با رشد صنعت مرغداری، اهمیت پیشگیری از این بیماری بیشتر شده است. واکنش‌های ایمنی، همراه با رعایت اصول بهداشتی، روشی مهم برای کنترل این بیماری است. واکنش‌های زنده نیوکاسل، مانند سویه‌های B1، لاسوتا و کلون، به‌صورت آشامیدنی، قطره چشمی یا اسپری استفاده می‌شوند. واکنش‌های کلون، مانند کلون رازی، به‌دلیل کاهش واکنش‌های جانبی و ایجاد ایمنی مناسب، به‌طور گسترده در مزارع صنعتی استفاده می‌شوند (۱۷-۱۹). اگرچه در شرایط عادی انتظار می‌رود جوجه‌ها پاسخ ایمنی مناسبی به تزریق واکنش نیوکاسل داشته باشند، وجود عوامل مختلف تضعیف‌کننده ایمنی در گله‌های طیور می‌تواند اثربخشی واکنش را کاهش دهد. نشان داده شده است افزودن *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به جیره غذایی، سطح آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل در پرندگان ایمن شده علیه این بیماری را بهبود می‌بخشد (۲۰).

پروبیوتیک‌ها تعادل طبیعی میکرو فلور روده پرنده را برای بهبود وضعیت ایمنی ساده و جلوگیری از عفونت بازایی می‌کنند. با توجه به اهمیت اقتصادی و تغذیه‌ای محصولات طیور، این مطالعه با هدف بررسی اثر پروبیوتیک بر پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی پیامد

واکسیناسیون علیه بیماری نیوکاسل به‌عنوان شاخص‌های ایجاد حفاظت طراحی و انجام شد.

مواد و روش‌ها

جوجه‌ها و گروه‌های آزمایشی

تعداد ۱۲۰ قطعه جوجه‌های عاری از عوامل بیماری‌زای خاص (Specific Pathogen Free: SPF) حاصل از مرغان تخم‌گذار سویه لگهورن در قالب طرح کامل تصادفی با آرایش فاکتوریل ۲×۳ شامل دو سطح تغذیه پروبیوتیک هایپروزیم (با و بدون تغذیه پروبیوتیک) و سه وضعیت واکسیناسیون [واکسن کلون رازی Clone.12IR، واکسن کلون مشابه وارداتی و شاهد (عدم تزریق واکسن)] تقسیم شدند و از یک‌روزگی تا پایان ۱۰ هفته‌گی آزمایش شدند. گروه‌های آزمایشی شامل ۱) جوجه‌های تغذیه‌نشده با پروبیوتیک و واکسینه‌شده با واکسن نیوکاسل کلون رازی؛ ۲) جوجه‌های تغذیه‌نشده با پروبیوتیک و واکسینه‌شده با واکسن نیوکاسل کلون وارداتی؛ ۳) جوجه‌های تغذیه‌شده با پروبیوتیک و واکسینه‌شده با واکسن نیوکاسل کلون رازی؛ ۴) جوجه‌های تغذیه‌شده با پروبیوتیک و واکسینه‌شده با واکسن نیوکاسل کلون وارداتی؛ ۵) جوجه‌های تغذیه‌شده با پروبیوتیک و واکسینه‌نشده؛ و ۶) جوجه‌های تغذیه‌نشده با پروبیوتیک و واکسینه‌نشده بودند. جوجه‌های گروه ۱ تا ۴ به روش قطره چشمی در ۷ و ۲۱ روزگی با واکسن نیوکاسل کلون (تولیدشده در مؤسسه رازی یا وارداتی) به میزان یک دز برای هر پرنده (حاوی 10^6 EID₅₀ ≤ ویروس واکسینال) واکسینه شدند و در گروه شاهد از بافر فسفات (PBS) استفاده شد. در این مطالعه، از پروبیوتیک تجاری هایپروزیم تشکیل‌شده از باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس لیکنفرمیس، انتروکوکوس فاسیوم، پدیوکوکوس اسیدی لاکتیزی، طبق کاتالوگ پیشنهادی شرکت تولیدکننده (از ۱ تا ۱۰ روزگی به میزان ۵۰۰ گرم در تن، از ۱۱ تا ۲۸ روزگی ۴۰۰ گرم در تن و از ۲۹ روزگی تا پایان دوره ۳۰۰ گرم در تن) به جوجه‌های گروه‌های ۱ تا ۴ به‌صورت مخلوط در خوراک تغذیه شد. جیره پایه برای تمامی گروه‌ها یکسان و نیازهای تغذیه‌ای مطابق راهنمای پرورش سویه تخم‌گذار لگهورن تنظیم شد.

ارزیابی عیار سرمی آنتی‌بادی علیه ویروس بیماری نیوکاسل

برای ارزیابی ایمنی هومورال، عیار آنتی‌بادی سرمی علیه ویروس

بیماری نیوکاسل به‌صورت هفتگی اندازه‌گیری شد. بدین‌منظور، از سیاهرگ بال تمامی پرنده‌ها از هفته اول تا دهم خون‌گیری و سرم نمونه‌ها جداسازی شد. عیار آنتی‌بادی با استفاده از آزمون ممانعت از هم‌آگلوتیناسیون (Hemagglutination Inhibition: HI) با آنتی‌ژن اختصاصی ویروس دارای چهار واحد هم‌آگلوتینین (HA: Haemagglutination)، گلبول قرمز شسته شده ۱٪ جوجه و با مشاهده رسوب گلبول‌های قرمز و عدم توده‌ای شدن آن‌ها اندازه‌گیری شد. بالاترین رقت سرم که سبب مهار کامل چهار واحد HA آنتی‌ژن اختصاصی شد، عیار HI در نظر گرفته شد.

آزمون حساسیت پوستی بازوفیل

(Cutaneous Basophil Hypersensitivity: CBH)

سه هفته پس از دومین نوبت واکسیناسیون (۴۲ روزگی)، پنج جوجه از هر گروه آزمایشی انتخاب و آزمون حساسیت پوستی بازوفیلی برای ارزیابی ایمنی سلولی انجام شد. ضخامت پرده بین انگشتان پای پرنده‌گان اندازه‌گیری شد و سپس ۰/۱ mL فیتوهم‌آگلوتینین ۱۰٪ به غشای انگشت پای راست و همین میزان بافر فسفات (PBS) به‌عنوان شاهد، به غشای انگشت چپ هر جوجه تزریق شد. پس از ۲۴ ساعت، ضخامت غشای ایجاد شده به‌دلیل تزریق فیتوهم‌آگلوتینین در مقایسه با ضخامت پوست پای شاهد محاسبه و بین گروه‌ها مقایسه شد.

ارزیابی تزاید لنفوسیت T (T Lymphocyte Proliferation Assay) سه هفته پس از دومین واکسن، یک میلی‌لیتر نمونه خون از سیاهرگ بال جوجه‌ها گرفته شد. لایه‌های سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC, Peripheral Blood Mononuclear Cells) با استفاده از محلول فایکول جدا شدند. برای این منظور، مقدار مساوی خون هپارینه با محیط RPMI-1640 رقیق شد. خون رقیق‌شده به‌آرامی به فایکول هم‌حجم با خون رقیق‌نشده افزوده شده و در 800g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس PBMC‌ها که در حد فاصل فایکول و خون رقیق‌شده جمع شده بودند به‌آرامی جمع‌آوری شده و در 450g به مدت ده دقیقه سانتریفوژ شدند. میزان زنده بودن PBMC‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو تعیین شد. تعداد $10^5 \times 2$ سلول در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاوی محیط RPMI 1640، ۱۰ درصد FBS (Fetal Bovine Serum) و mM25 HEPES رسانده شده و مقدار 100 μ l از آن در هر گوده میکروپلیت ۹۶

تحلیل آماری

توزیع نرمال داده‌ها با استفاده از آزمون‌های کلموگروف - اسمیرنوف و شاپیرو - ویلک با استفاده از رویه UNIVARIATE در نرم‌افزار SAS 9.4 آزمایش شد. سپس در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل ۲×۳، داده‌ها با استفاده از مدل خطی تعمیم یافته (GLM) تحلیل واریانس شدند. میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای Tukey در سطح معناداری $P < 0/05$ مقایسه شدند. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد میانگین (SEM) ارائه شده است.

نتایج

ارزیابی عیار آنتی‌بادی علیه بیماری نیوکاسل

میانگین عیار آنتی‌بادی علیه بیماری نیوکاسل در گروه‌های مختلف آزمایشی در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که اثر واکسن و پروبیوتیک بر میانگین عیار آنتی‌بادی علیه ویروس بیماری نیوکاسل طی ۱۰ هفته آزمایش معنادار بود ($P < 0/01$). براساس یافته‌ها، واکسن نیوکاسل رازی با میانگین عیار ۴/۷۷ نسبت به واکسن کلون وارداتی با عیار ۴/۰۵ عملکرد بهتری (به میزان Log_2 ۰/۷۲) داشت. باوجوداین، هر دو گروه واکسن کلون رازی و

خانه‌ای در سه تکرار ریخته شد. برای هر نمونه لنفوسیت، سه گوده در نظر گرفته شد. در گوده اول محیط RPMI-1640، گوده دوم ویروس نیوکاسل کلون، و گوده سوم ماده میتوزن فیتوهمگلوتنین (Phytohemagglutinin; PHA) با غلظت ۵ $\mu\text{g/ml}$ ریخته شده و حجم نهایی آن‌ها با محیط RPMI-1640 به ۲۰۰ μl رسانده شد. پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در ۳۷°C در انکوباتور دارای ۵ درصد CO_2 ، ۰۱ μl از محلول MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) با غلظت نهایی ۵ $\mu\text{g/ml}$ به هر گوده اضافه شد و میکروپلیت به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار داده شد. پس از آن مایع رویی گوده تخلیه شد و با اضافه کردن ۱۵۰ μl دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) به هر گوده، کریستال‌های فورمازان تشکیل شده حل شدند. کریستال‌های فورمازان در آب غیرمحلول است و باید پیش از رنگ‌سنجی توسط ماده حلالی مانند DMSO به حالت محلول درآیند. پس از ۱۵ دقیقه میزان جذب هر گوده در طول موج ۶۳۰ nm تعیین و میانگین $\pm$ انحراف معیار برای سه بار آزمایش محاسبه شد. ضریب تحریک (Stimulation Index; SI) از فرمول زیر محاسبه شد:

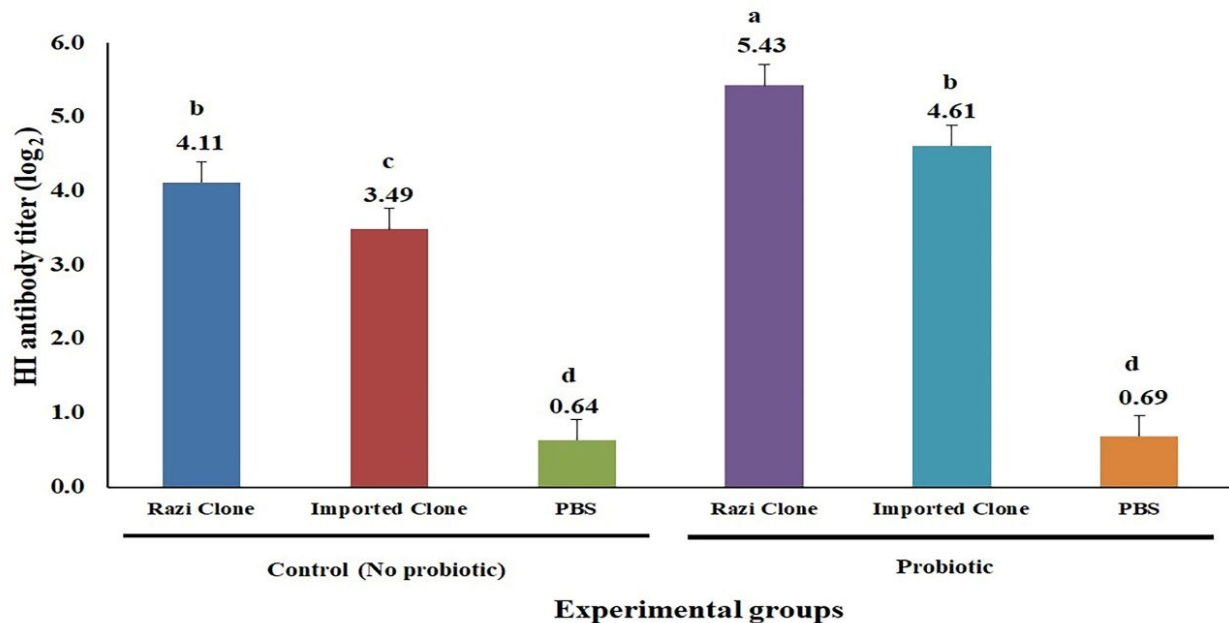
$$\text{SI} = \frac{\text{Mean OD of stimulated lymphocytes} - \text{Mean OD of blank}}{\text{Mean OD of unstimulated lymphocytes}}$$

جدول ۱. اثر واکسن نیوکاسل کلون و مکمل پروبیوتیک بر عیار آنتی‌بادی IH در جوجه‌های FPS

Main Factor	HI antibody titer (Log 2)
Vaccine	
Razi Clone	4.77 ^a
Imported Clone	4.05 ^b
Control (No vaccine)	0.66 ^c
SEM	0.19
Probiotic	
Probiotic	3.58 ^a
Control (No probiotic)	2.75 ^b
SEM	0.16
P value	
Vaccine	<0.01
Probiotic	<0.01
Probiotic $\times$ Vaccine	0.05

a-c: میانگین‌های با حروف بالانویس انگلیسی متفاوت اختلاف معنادار دارند ($P < 0.05$).

SEM: خطای استاندارد میانگین.



شکل ۱. اثر متقابل تیمارهای آزمایشی (تزریق واکسن نیوکاسل کلون و تغذیه پروبیوتیک) بر عیار آنتی‌بادی علیه نیوکاسل در جوجه‌های FPS. ستون‌های با بالانویس‌های مختلف (a-d) از نظر آماری متفاوت‌اند ($P < 0/05$).

جوجه‌های واکسیناسیون‌شده با واکسن نیوکاسل رازی در هر دو گروه تغذیه‌شده با پروبیوتیک یا تغذیه‌نشده با پروبیوتیک، از ۲۸ روزگی (یک هفته پس از دومین نوبت واکسیناسیون) تا پایان دوره به‌طور معناداری عیار بالاتری نسبت به جوجه‌های واکسیناسیون‌شده با واکسن کلون وارداتی داشت ($P < 0/05$). اگرچه تغذیه پروبیوتیک در گروه واکسن کلون رازی و وارداتی در هر مقطع زمانی موجب افزایش نسبی عیار آنتی‌بادی علیه بیماری نیوکاسل نسبت به گروه متناظر خود شد (جوجه‌های واکسینه‌شده با واکسن کلون رازی و کلون وارداتی که با پروبیوتیک تغذیه نشده بودند)، اما این افزایش عیار، اختلاف معناداری را ایجاد نکرد ($P > 0/05$).

نتایج آزمون حساسیت پوستی بازوفیلی

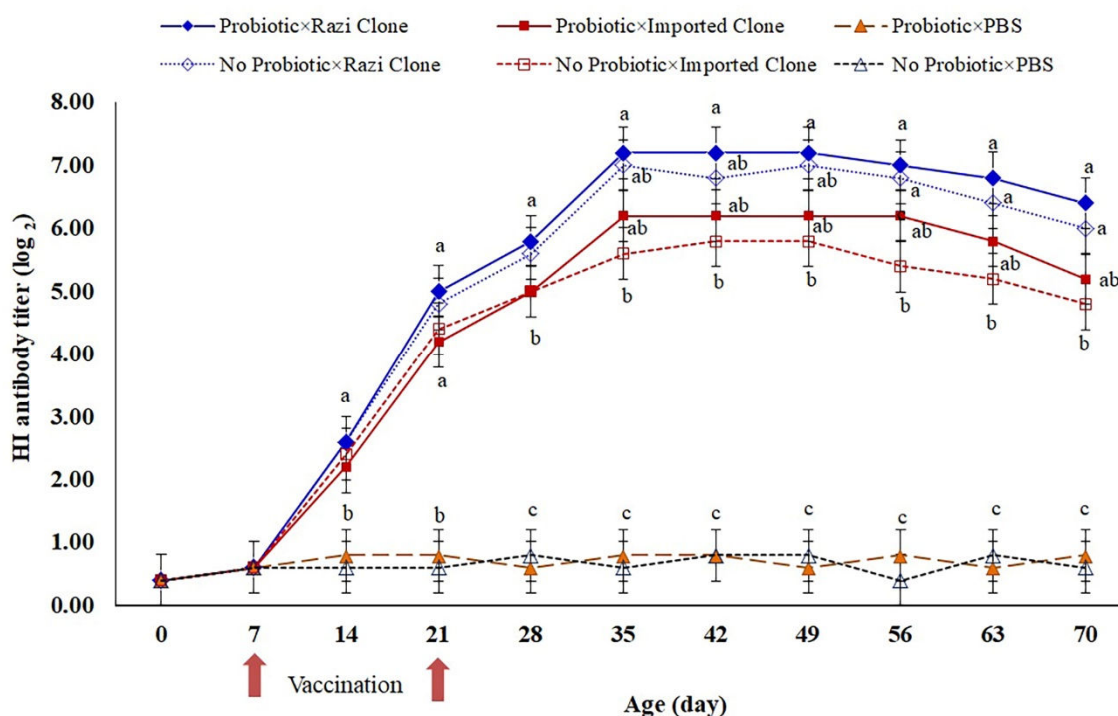
اثر واکسیناسیون با واکسن‌های مختلف نیوکاسل و تغذیه با پروبیوتیک بر میانگین پاسخ به آزمون حساسیت پوستی بازوفیلی در جدول ۲ گزارش شده است. میانگین ضخامت پوستی اندازه‌گیری‌شده در جوجه‌های واکسیناسیون‌شده با واکسن رازی به‌طور معناداری نسبت به جوجه‌های واکسیناسیون‌شده با واکسن کلون وارداتی بیشتر بود ($P < 0/05$ ؛ ۰/۳۸ در برابر ۰/۳۱). همچنین تغذیه با پروبیوتیک

وارداتی عیار بالاتری نسبت به گروه شاهد داشتند. افزون بر این، استفاده از پروبیوتیک میانگین عیار آنتی‌بادی را به‌طور متوسط به‌میزان $\text{Log}_2 0/83$ در جوجه‌هایی که با پروبیوتیک تغذیه شدند، بهبود داد ($P < 0/01$).

شکل ۱ اثر متقابل تیمارهای آزمایشی (تزریق واکسن نیوکاسل کلون و تغذیه پروبیوتیک) بر میانگین عیار آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل در کل دوره آزمایشی را نشان می‌دهد. براساس یافته‌ها بالاترین میانگین عیار (۵/۴۳) زمانی حاصل شد که جوجه‌ها با واکسن کلون رازی واکسیناسیون و با پروبیوتیک تغذیه شدند ($P < 0/05$).

همچنین، تغذیه پروبیوتیک در گروه واکسن کلون رازی یا کلون وارداتی موجب افزایش معنادار عیار آنتی‌بادی نسبت به گروه‌های متناظر تغذیه‌نشده با پروبیوتیک شد (به‌ترتیب ۵/۴۳ در برابر ۴/۱۱ و ۴/۶۱ در برابر ۳/۴۹؛ $P < 0/05$).

روند تغییرات تیتراژ آنتی‌بادی علیه بیماری نیوکاسل در شش گروه آزمایشی طی ۱۰ هفته آزمایش در شکل ۲ نشان داده شده است. براساس نتایج، یک هفته پس از نخستین نوبت واکسیناسیون، اختلاف معناداری بین عیار جوجه‌های واکسیناسیون‌شده و گروه شاهد ایجاد و تا پایان دوره این اختلاف وجود داشت. همچنین،



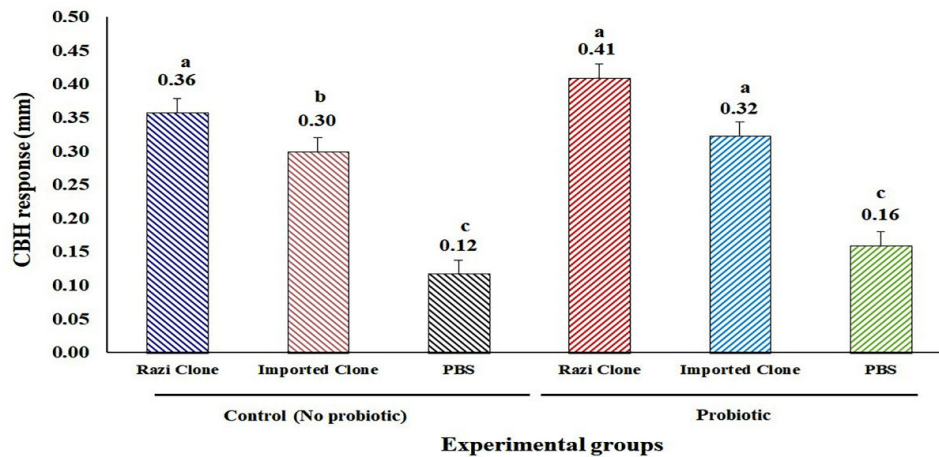
شکل ۲. اثر متقابل تیمارهای آزمایشی (تزریق واکسن نیوکاسل کلون و تغذیه پروبیوتیک) طی زمانهای مختلف بر روند افزایش عیار آنتی بادی علیه نیوکاسل در جوجه‌های FPS و در هفته‌های پس از واکسیناسیون. در هر هفته، میانگین با حروف مختلف (a-d) از نظر آماری متفاوت است ($P < 0.05$). جوجه‌ها واکسن کلون را در ۷ و ۲۱ روزگی دریافت کردند.

جدول ۲. اثر واکسن نیوکاسل کلون و مکمل پروبیوتیک بر پاسخ ازدیاد حساسیت بازوفیل پستی (HBC) در جوجه‌های FPS

Main Factor	CBH response (mm)
Vaccine	
Razi Clone	0.38 ^a
Imported Clone	0.31 ^b
Control (No vaccine)	0.14 ^c
SEM	0.01
Probiotic	
Probiotic	0.30 ^a
Control (No probiotic)	0.26 ^b
SEM	0.01
P value	
Vaccine	<0.001
Probiotic	0.05
Probiotic × Vaccine	0.88

a-c: میانگین‌های با حروف بالانویس انگلیسی متفاوت اختلاف معنادار دارند ($P < 0.05$).

SEM: خطای استاندارد میانگین.



شکل ۳. اثر متقابل تیمارهای آزمایشی (تزریق واکسن نیوکاسل کلون و تغذیه پروبیوتیک) بر پاسخ ازدیاد حساسیت بازوفیل پوستی (HBC) در جوجه‌های FPS. ستون‌هایی با بالا نوشته‌های مختلف (a-c) از نظر آماری متفاوت‌اند ($P < 0/05$).

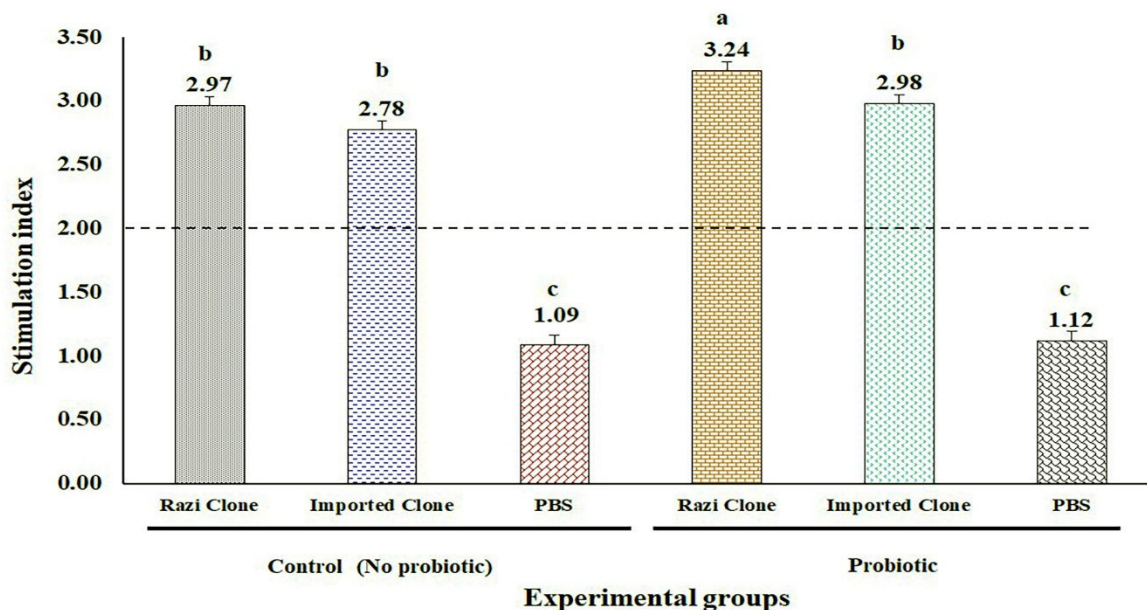
نیز موجب افزایش پاسخ به آزمون حساسیت پوستی بازوفیلی شد ($P < 0/05$).
اثر متقابل تیمارهای آزمایشی (تزریق واکسن نیوکاسل کلون و تغذیه پروبیوتیک) بر پاسخ آزمون حساسیت پوستی بازوفیلی در شکل ۳ نشان داده شده است. بالاترین پاسخ در گروه واکسن رازی تغذیه شده با پروبیوتیک مشاهده شد. اگرچه این گروه اختلاف معناداری با پاسخ در گروه واکسن کلون رازی تغذیه نشده با پروبیوتیک یا گروه واکسن کلون وارداتی تغذیه شده با پروبیوتیک وجود نداشت ($P < 0/05$).

جدول ۳. اثر تجویز واکسن نیوکاسل کلون و مکمل پروبیوتیک بر شاخص تحریک سنجش تکثیر لنفوسیت T در جوجه‌ها

Main Factor	Stimulation index (SI)
Vaccine	
Razi Clone	3.10 ^a
Imported Clone	2.88 ^b
Control (No vaccine)	1.11 ^c
SEM	0.05
Probiotic	
Probiotic	2.45 ^a
Control (No probiotic)	2.28 ^b
SEM	0.04
P value	
Vaccine	<0.01
Probiotic	<0.01
Probiotic × Vaccine	0.25

a-c: میانگین‌های با حروف بالانویس انگلیسی متفاوت اختلاف معنادار دارند ($P < 0.05$).

SEM: خطای استاندارد میانگین.



شکل ۴. اثر متقابل تیمارهای آزمایشی (تزریق واکسن نیوکاسل کلون و تغذیه پروبیوتیک) بر شاخص تحریک سنجش تکثیر لنفوسیت T در جوجه‌های FPS. ستون‌هایی با بالانوشته‌های مختلف (a-c) از نظر آماری متفاوت‌اند ($P < 0/05$).

نسبت به گروه کلون وارداتی تغذیه‌نشده با پروبیوتیک یا گروه شاهد اختلاف‌ها معنادار بود ($P < 0/05$).

نتایج آزمون تزیاید لنفوسیت T

اثر واکسن و تغذیه پروبیوتیک بر پاسخ آزمون تزیاید لنفوسیت T در جدول ۳ ارائه شده است. استفاده از واکسن کلون رازی نسبت به کلون واراتی یا گروه شاهد موجب افزایش معنادار شاخص تحریک (SI) شد (به ترتیب ۳/۱۰، ۲/۸۸ و ۱/۱۱؛ $P < ۰/۰۱$). افزون بر این، تغذیه پروبیوتیک نیز این شاخص را به میزان ۰/۱۷ نسبت به گروه شاهد افزایش داد ($P < 0/01$).

اثر متقابل تیمارهای آزمایشی (تزریق واکسن نیوکاسل کلون و تغذیه پروبیوتیک) بر پاسخ آزمون تزیاید لنفوسیتی T در شکل ۴ نشان داده شده است. براساس یافته‌ها بالاترین شاخص تحریک در جوجه‌هایی مشاهده شد که واکسن کلون رازی دریافت کردند و با پروبیوتیک تغذیه شدند، به‌طوری که نسبت به گروه واکسن کلون رازی تغذیه‌نشده با پروبیوتیک و هر دو گروه واکسن کلون وارداتی تغذیه‌شده یا تغذیه‌نشده با پروبیوتیک شاخص بالاتری داشت (به ترتیب ۳/۲۴ در برابر ۲/۷۹، ۲/۹۸، ۲/۷۸؛ $P < ۰/۰۱$).

بحث

هدف امنیت زیستی جلوگیری از ورود عوامل بیماری‌زا به گله‌های پرورش طیور برای دستیابی به تولید مطلوب و جلوگیری از زیان‌های اقتصادی است. با افزایش حساسیت طیور اصلاح نژاد شده به انواع عفونت‌ها و بیماری‌ها، تقویت سیستم ایمنی برای افزایش مقاومت پرنده امری ضروری است. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که استفاده از برخی ترکیبات محرک سیستم ایمنی در جیره غذایی طیور می‌تواند سبب بهبود سیستم ایمنی ذاتی پرنده، افزایش پاسخ ایمنی اکتسابی در برابر واکسیناسیون، و ایجاد حفاظت یکنواخت شود (۲۱، ۲۲). در این مطالعه، اثر پروبیوتیک بر پاسخ‌های ایمنی هومورال و ایمنی سلولی در جوجه‌های SPF ایمن‌شده با واکسن نیوکاسل کلون رازی ارزیابی و نتایج با واکسن مشابه وارداتی مقایسه شد. افزودن پروبیوتیک به جیره غذایی بر افزایش سطح آنتی‌بادی سرمی جوجه‌های ایمن‌شده با این واکسن تأثیر مثبت داشته و عیار آن حدود یک واحد ($\log_2$) در آزمایش HI بالاتر رفت. مطالعات دیگر نیز به بهبود پاسخ آنتی‌بادی

IFN- β , IL-8, IL-13, و IL-18 در طحال و همچنین بیان IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, و IL-18 در بورس القای شود (۲۶, ۲۹, ۳۰). مطالعه ما نشان داد پاسخ ایمنی سلولی در جوجه‌های واکسینه و تغذیه‌شده با پروبیوتیک در مقایسه با گروهی که پروبیوتیک دریافت نکرده بودند بهبود یافته است. آزمایش CBH یکی از روش‌های سنجش پاسخ ایمنی در نتیجه نفوذ سلول‌های التهابی، به‌ویژه لنفوسیت‌ها و بازوفیل‌ها پیماد تزریق داخل جلدی PHA-P است. این میتوز در پوست فضای بین انگشتان ۳ و ۴ جوجه‌ها تزریق می‌شود، یعنی جایی که پیماد تحریک آنتی‌ژن، واکنش وابسته به تیموس با واسطه سلول‌های T به سهولت ارزیابی می‌شود. طی این تحریک، سایتوکاین‌هایی مانند IFN- γ توسط سلول‌های T پاسخ‌دهنده فعال تولید می‌شوند. در این مطالعه، بالاترین شاخص تحریک در جوجه‌هایی که واکسن کلون رازی دریافت کردند و با پروبیوتیک تغذیه شدند، نسبت به گروه واکسن کلون رازی تغذیه‌نشده با پروبیوتیک و مقایسه با هر دو گروه متناظر دریافت‌کننده واکسن وارداتی مشاهده شد. به‌طور کلی، بیشتر جوجه‌هایی که با واکسن زنده علیه بیماری نیوکاسل واکسینه می‌شوند، IFN- γ را پس از تحریک آنتی‌ژنی ۲ تا ۴ هفته پس از واکسیناسیون تولید می‌کنند (۲۴, ۳۱). شاخص تحریک بالاتر در پرندگان ایمن‌شده با واکسن زنده و تغذیه‌شده با پروبیوتیک نسبت به پرندگانی که با پروبیوتیک تغذیه نشده‌اند، بیانگر اثر این مکمل در بهبود پاسخ ایمنی سلولی علیه ویروس بیماری نیوکاسل است. پارامترهای متعددی در تعیین اثربخشی پروبیوتیک‌ها در تحریک پاسخ ایمنی دخیل‌اند. تعدیل فعالیت‌های ایمنی آن‌ها در افزایش پاسخ آنتی‌بادی به نوع آنتی‌ژن، رژیم ایمن‌سازی، نوع و تعداد گونه‌های باکتری موجود در پروبیوتیک‌ها، و زمینه ژنتیکی میزبان وابسته است (۸, ۲۵). سویه‌های باکتری پروفایل‌های مختلفی از بیان سایتوکاین‌ها را القا می‌کنند، به همین دلیل آثار متفاوتی بر پاسخ میزبان دارند. مثلاً، جیره‌های غذایی حاوی لاکتوباسیلوس رویتری تولید آنتی‌بادی‌های IgM ضد سالمونلا و عملکرد سلول‌های T در جوجه‌های تازه سربرآورده را افزایش می‌دهد. در پاسخ به لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس، بیان ژن‌های STAT2, STAT4, IL-18, MyD88, اینترفرون آلفا و گاما که سایتوکاین‌های Th1 را در سلول‌های سکا تانسیل القا می‌کنند، افزایش یافته است. سایتوکاین‌های Th2 مانند IL-4 و IL-10،

به ویروس بیماری نیوکاسل در جوجه‌های گوشتی تیمارشده با پروبیوتیک اشاره کرده‌اند (۲۳, ۲۴). ارزیابی تأثیر مکمل‌های غذایی با آنتی‌بیوتیک، اسید آلی، پروبیوتیک و پری‌بیوتیک بر مورفولوژی روده و عیار ویروس نیوکاسل جوجه‌های گوشتی در مزارع تجاری هم بیانگر این است که این مکمل‌ها اثر مشخص و فزاینده‌ای بر پاسخ ایمنی به این ویروس در جوجه‌های گوشتی ندارد. با این حال، پارامترهای مورفومتریک پرزهای ایلئوم بهبود یافته، و همبستگی مثبت بین وزن بدن و ارتفاع پرز یا ناحیه پرز در بخش ایلئوم این جوجه‌ها مشاهده شده است (۲۴).

مکانیسم‌های دقیقی که فعالیت‌های تعدیل‌کننده ایمنی پروبیوتیک‌ها را واسطه می‌کنند مشخص نیست. با این حال، نشان داده شده است که پروبیوتیک‌ها افزون بر تأمین مواد مغذی با جلوگیری از کلونیزاسیون روده‌ای عوامل بیماری‌زا یک فعالیت کمکی قوی اعمال می‌کنند که مسئول افزایش پاسخ‌های ایمنی میزبان است. این مکمل‌ها اثر تثبیت‌کننده روده‌ای ایجاد می‌کنند و تعداد لنفوسیت‌ها و سلول‌های لنفوییدی را در لامینا پروپریا و لنفوسیت‌های داخل اپی‌تلیال در روده کوچک افزایش می‌دهند (۲۵). برهم‌کنش بین سلول‌های میزبان و باکتری‌های همسفره روده یا اجزای ساختاری آن‌ها ممکن است به تعدیل پاسخ‌های ایمنی منجر شود، زیرا این باکتری‌ها در تماس نزدیک با سلول‌های سیستم ایمنی هستند (۶). میکروبیوتای روده کوچک و GALT سلول‌های سیستم ایمنی شامل سلول‌های T و B، ماکروفاژها، و سلول‌های کشته‌شده طبیعی را دربرمی‌گیرند. شناسایی باکتری‌های همسفره یا اجزای ساختاری آن‌ها توسط گیرنده‌های شبه Toll (TLR) موجود در سطح سلول‌های دندریتیک لامینا پروپریا روده می‌تواند به فعال شدن و بلوغ این سلول‌ها منجر شود (۳, ۷). این فعال‌سازی با محرک‌های آنتی‌ژنی سبب ایجاد پاسخ‌های T کمکی (Th1 و Th2) و ترشح سایتوکاین‌ها می‌شود که برای تولید آنتی‌بادی و تغییر ایزوتیپ ایمنोगلوبولین‌ها مهم‌اند (۲۶). آنتی‌ژن‌های تحویل داده‌شده به روده پرنده توسط سلول‌های اپی‌تلیال یا سلول‌های روده تخصصی جذب می‌شوند. نتیجه تحویل آنتی‌ژن القای پاسخ آنتی‌بادی به‌صورت سیستمی و موضعی است (۲۷, ۲۸). در پرندگان تغذیه‌شده با پروبیوتیک، پاسخ‌های آنتی‌بادی اختصاصی به آنتی‌ژن سلولی وابسته به تیموس قوی‌تری با افزایش درصد سلول‌های CD4⁺ و CD25⁺ در طحال، و افزایش بیان IFN- α ,

2021;11(6):1620. doi:10.3390/ani11061620

3. Chandrasekaran P, Weiskirchen S, Weiskirchen R. Effects of Probiotics on Gut Microbiota: An Overview. *Int. J. Mol. Sci.* 2024;25(11):6022. doi:10.3390/ijms25116022

4. Bar-Shira E, Sklan D, Friedman A. Establishment of immune competence in the avian GALT during the immediate post-hatch period. *Dev. Comp. Immunol.* 2003;27(2):147-57. doi:10.1016/S0145-305X(02)00077-2

5. Shehata AA, Yalçın S, Latorre JD, Basiouni S, Attia YA, Abd El-Wahab A, et al. Probiotics, prebiotics, and phyto-genic substances for optimizing gut health in poultry. *Microorganisms.* 2022;10(2):395. doi:10.3390/microorganisms10020395

6. Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science.* 2000;288(5474):2222-6. doi:10.1126/science.288.5474.2222

7. Brisbin JT, Zhou H, Gong J, Sabour P, Akbari MR, Haghighi HR, et al. Gene expression profiling of chicken lymphoid cells after treatment with *Lactobacillus acidophilus* cellular components. *Dev. Comp. Immunol.* 2008;32(5):563-74. doi:10.1016/j.dci.2007.10.001

8. Ayana GU, Kamutambuko R. Probiotics in Disease Management for Sustainable Poultry Production. *Adv. Gut & Microb. Res.* 2024;2024(1):4326438. doi:10.1016/j.agmr.2024.4326438

9. Azad MAK, Sarker M, Wan D. Immunomodulatory effects of probiotics on cytokine profiles. *Biomed. Res. Int.* 2018;2018:8063647. doi:10.1155/2018/8063647

10. Khan R, Naz S. The applications of probiotics in poultry production. *World's Poult Sci J.* 2013;69(3):621-32. doi:10.1017/S0043933913000195

11. Yurong Y, Ruiping S, ShiMin Z, Yibao J. Effect of probiotics on intestinal mucosal immunity and ultrastructure of cecal tonsils of chickens. *Arch. Anim. Nutr.* 2005;59(4):237-46. doi:10.1080/17450390500110403

12. Abaidullah M, Peng S, Kamran M, Song X, Yin Z. Current findings on gut microbiota mediated immune modulation against viral diseases in chicken. *Viruses.* 2019;11(8):681. doi:10.3390/v11080681

13. Shojadoost B, Kulkarni RR, Brisbin JT, Quinteiro-Filho W, Alkie TN, Sharif S. Interactions between lactobacilli and chicken macrophages induce antiviral responses against avian influenza virus. *Res. J. Vet. Sci.* 2019;125:441-50. doi:10.1016/j.rvsc.2019.08.023

14. Yang W-T, Yang G-L, Shi S-H, Liu Y-Y, Huang H-B, Jiang Y-L, et al. Protection of chickens against H9N2 avian influenza virus challenge with recombinant *Lactobacillus*

توسط لاکتوباسیل ها مانند لاکتوباسیلوس رامنوسوس القا می شوند. نتیجه تولید سایتوکاین های Th2، گسترش سلول های B و تعویض ایزوتیپ ایمونوگلوبولین مورد نیاز برای تولید آنتی بادی است (۳۲). با وجود اثبات کارایی و اثربخشی واکسن ها در پیشگیری و کنترل بیماری های عفونی، برخی عوامل تضعیف کننده سیستم ایمنی می تواند بر موفقیت واکسن اثرگذار باشد. یک راهکار استفاده از ترکیبات تعدیل کننده سیستم ایمنی با هدف بهینه سازی پاسخ ایمنی و محافظت از گله ها در برابر عوامل عفونی مانند ویروس بیماری نیوکاسل است. در مطالعه ما اثر یک پروبیوتیک تجاری در تقویت پاسخ ایمنی حاصل از تجویز واکسن نیوکاسل کلون ارزیابی شد. براساس نتایج به دست آمده، جوجه های SPF تغذیه شده با پروبیوتیک پاسخ ایمنی هومورال و سلولی بهتری را متعاقب واکسیناسیون با واکسن نیوکاسل کلون داشتند. این نتیجه می تواند بر اثر برهم کنش بین گونه های پروبیوتیکی و سیستم ایمنی میزبان باشد که به تقویت پاسخ های ایمنی منجر می شود. اگرچه در خصوص سازوکار دقیق این برهم کنش ها و مسیرهای اثرگذاری پروبیوتیک ها بر پاسخ های ایمنی تخصصی نیاز به مطالعات بیشتری است.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج و شرکت زیست طبیعت گرا با شماره ۰۱۲۰۰۰-۹۱۰-۸۱-۸۱ انجام شده است. نویسندگان از مدیریت و کارکنان واکسن های ویروسی طیور مؤسسه رازی و مدیریت شرکت زیست طبیعت گرا بابت همکاری در اجرای پروژه کمال تشکر را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می دارند که در این پژوهش هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

منابع

1. Włażlak S, Pietrzak E, Biesek J, Dunisławska A. Modulation of the immune system of chickens a key factor in maintaining poultry production—a review. *Poult. Sci.* 2023;102(8):102785. doi:10.1016/j.psj.2023.102785
2. Krysiak K, Konkol D, Korczyński M. Overview of the use of probiotics in poultry production. *Animals.*

- plantarum expressing conserved antigens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017;101:4593-603.
15. Yitbarek A, Astill J, Hodgins DC, Parkinson J, Nagy É, Sharif S. Commensal gut microbiota can modulate adaptive immune responses in chickens vaccinated with whole inactivated avian influenza virus subtype H9N2. *Vaccine.* 2019;37(44):6640-7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.09.046>.
 16. Alexander D, Senne D. Newcastle disease and other paramyxoviruses. In: *A Laboratory Manual for the Isolation Identification and Characterization of Avian Pathogens.* 1998. p. 135-41.
 17. Afonso CL, Miller PJ, Grund CH, Koch G, Peeters B, Selleck PW, Srinivas GB. Newcastle disease (infection with Newcastle disease virus). In: *Office International des Epizooties, World Organization for Animal Health, Chapter 3.3.14.* 2018. p. 964-85. Paris, France.
 18. Dimitrov KM, Afonso CL, Yu Q, Miller PJ. Newcastle disease vaccines—A solved problem or a continuous challenge? *Vet. Microbiol.* 2017;206:126-36. doi:10.1016/j.vetmic.2016.07.006.
 19. Kapczynski DR, Afonso CL, Miller PJ. Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Dev. Comp. Immunol.* 2013;41(3):447-53. doi:10.1016/j.dci.2013.06.010.
 20. Gharajalar SN, Mirzai P, Nofouzi K, Madadi MS. Immune enhancing effects of *Lactobacillus acidophilus* on Newcastle disease vaccination in chickens. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2020;72:101520. doi:10.1016/j.cimid.2020.101520
 21. Haghighi HR, Gong J, Gyles CL, Hayes MA, Zhou H, Sanei B, et al. Probiotics stimulate production of natural antibodies in chickens. *Clin. Vaccine. Immunol.* 2006;13(9):975-80. doi:10.1128/CVI.00052-06.
 22. Khaksefidi A, Ghoorchi T. Effect of probiotic on performance and immunocompetence in broiler chicks. *J. Poult. Sci.* 2006;43(3):296-300. doi:10.2141/jpsa.43.296.
 23. Talebi A, Amirzadeh B, Mokhtari B, Gahri H. Effects of a multi-strain probiotic (PrimaLac) on performance and antibody responses to Newcastle disease virus and infectious bursal disease virus vaccination in broiler chickens. *Avian Pathol.* 2008;37(5):509-12. doi:10.1080/03079450802453237.
 24. Nguyen TLV, Ho TKH, Nguyen VN, Le HN, Tran HT, Duong CM. Effects of dietary supplementation with antibiotic, organic acid, probiotic and prebiotic on the intestinal morphology and Newcastle disease virus titers of broilers in commercial farms. *J. Agric. Dev.* 2022;21(6):32-9. doi:10.6168/jad.2022.21.6.32.
 25. Kabir SL, Rahman M, Rahman M, Rahman M, Ahmed S. The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. *Int. J. Poult. Sci.* 2004;3(5):361-4. doi:10.3923/ijps.2004.361.364.
 26. Abd El-Hack ME, El-Saadony MT, Shafi ME, Qattan SYA, Batiha GE, Khafaga AF, et al. Probiotics in poultry feed: A comprehensive review. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr (Berl).* 2020;104(6):1835-50. doi:10.1111/jpn.13359.
 27. Broom LJ, Kogut MH. The role of the gut microbiome in shaping the immune system of chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2018;204:44-51. doi:10.1016/j.vetimm.2018.07.002.
 28. Kogut MH, Lee A, Santin E. Microbiome and pathogen interaction with the immune system. *Poult. Sci.* 2020;99(4):1906-13. doi:10.1016/j.psj.2019.12.055.
 29. Lan Y, Verstegen M, Tamminga S, Williams B. The role of the commensal gut microbial community in broiler chickens. *World's Poult. Sci. J.* 2005;61(1):95-104. doi:10.1079/WPS200437.
 30. Abd El-Hack ME, El-Saadony MT, Shafi ME, Qattan SYA, Batiha GE, Khafaga AF, et al. Probiotics in poultry feed: A comprehensive review. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr (Berl).* 2020;104(6):1835-50. doi:10.1111/jpn.13359.
 31. Lambrecht B, Gonze M, Meulemans G, Van Den Berg TP. Assessment of the cell-mediated immune response in chickens by detection of chicken interferon- γ in response to mitogen and recall Newcastle disease viral antigen stimulation. *Avian Pathol.* 2004;33(3):343-50. doi:10.1080/03079450410001719783.
 32. Mirpuri J, Sotnikov I, Myers L, Denning TL, Yarovinsky F, Parkos CA, et al. *Lactobacillus rhamnosus* (LGG) regulates IL-10 signaling in the developing murine colon through upregulation of the IL-10R2 receptor subunit. *PLoS One.* 2012;7(12):e51955. doi:10.1371/journal.pone.0051955.