



2024. Номер 9, С. 67 – 74

Отримано: 08.04.2024 Перевірено: 16.04.2024 Прийнято: 22.04.2024

DOI: 10.5281/zenodo.12665226

UDC: 636.09-051:614.4:636.5

COMPARISON OF METHODS OF USING THE IMMUNE STIMULATOR “DRONE BREED EXTRACT” TO ENHANCE THE IMMUNE RESPONSE DURING VACCINATION AGAINST NEWCASTLE DISEASE OF POULTRY

R.A. Burdeiniy, D.M. Grinchenko, R.V. Severyn
State University of Biotechnology, Kharkiv, Ukraine
E-mail: grinchencodimamycol@gmail.com

Annotation. We made a preparation based on drone brood larvae. In this study, we conducted research on the optimal method of administration of the immunostimulating drug drone brood extract (ETR). The aim of the work was to study the immunostimulating effect of ETP on the body of chickens with different methods of administration. 3 experimental and control groups of 10 two-week-old chickens were formed. The second group was administered the drug enterally in a dose of 0,5 cm³, the third – intramuscularly in a dose of 0,2 cm³, and the fourth – intraperitoneally in a dose of 0,2 cm³. The first group is the control group, which was not given an immunostimulant. According to the results of serological studies, parenteral methods of introducing the ETR immunostimulatory into the body of chickens turned out to be quite effective. Thus, with intraperitoneal administration, the titer of antihemagglutinins was 7,70±0,05 log₂, and with intramuscular administration – 7,62±0,08 log₂. It should be noted that with enteral administration, this indicator was somewhat lower and amounted to 7,58±0,04 log₂. Thus, ETR immunostimulant showed sufficient immunostimulating properties even when administered enterally. According to the results of biochemical studies, it was established that the chickens of group 4, which were injected intraperitoneally with an immunostimulant, had slightly different indicators from the chickens of group 3, which were injected intramuscularly, as well as the chickens of group 2, where the increase of these indicators was quite high when compared to the control during enteral administration. According to the results of immunomorphological studies, the indicators of lymphoid organs increased with all investigated methods of administration of immunostimulators. The most rational in terms of availability and ease of implementation is the enteral method of application.

Key words: immunostimulant, chickens, drone brood extract, Newcastle disease.

УДК: 636.09-051:614.4:636.5

ПОРІВНЯННЯ МЕТОДІВ ВВЕДЕННЯ ІМУНОСТИМУЛЯТОРА «ЕКСТРАКТУ ТРУТНЕВОГО РОЗПЛОДУ» ДЛЯ ПІДСИЛЕННЯ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ ПРИ ВАКЦИНАЦІЇ ПРОТИ НЬЮКАСЛСЬКОЇ ХВОРОБИ ПТИЦІ

Р.А. Бурдейний, Д.М. Грінченко, Р.В. Северин
Державний біотехнологічний університет, м Харків, Україна
E-mail: grinchencodimamycol@gmail.com

Анотація. Нами було виготовлено препарат на основі личинок трутневого розплоду та перевірили його імуностимулюючі властивості під час вакцинації курчат проти хвороби Ньюкасла. У даному дослідженні ми провели дослідження щодо вивчення оптимального

способу введення імуностимулюючого препарату екстракт трутневого розплоду (ЕТР). Мета роботи. Вивчити імуностимулюючу дію розробленого імуностимулятора ЕТР на організм курей при різних способах введення. Для визначення оптимального способу введення ЕТР було сформовано 3 дослідні та контрольну групи по 10 курчат двотижневого віку. Другій групі вводили препарат ентерально в дозі 0,5 см³, третій – внутрішньом'язово в дозі 0,2 см³ і четвертій – внутрішньоочеревинно в дозі 0,2 см³. Перша група — контрольна, якій не давали імуностимулятор. За результатами серологічних досліджень досить ефективними виявилися парентеральні методи введення в організм курей імуностимулятора ЕТР. Так, при внутрішньоочеревинному введенні титр антигемаглютининів становив $7,70 \pm 0,05 \log_2$, а при внутрішньом'язовому – $7,62 \pm 0,08 \log_2$. Слід зазначити, що при ентеральному застосуванні цей показник був дещо нижчим і становив $7,58 \pm 0,04 \log_2$. Таким чином, імуностимулятор ЕТР виявляв достатні імуностимулюючі властивості навіть при ентеральному застосуванні. За результатами біохімічних досліджень встановлено, що у курчат 4 групи, яким внутрішньоочеревинно вводили імуностимулятор, показники дещо відрізнялися від курчат 3 групи, яким вводили внутрішньом'язово, а також курчат 2 групи, де при ентеральному введенні приріст цих показників був порівняно з контролем досить високим. За результатами імуноморфологічних досліджень показники лімфоїдних органів підвищувалися при всіх досліджуваних методах введення імуностимуляторів. Найбільш раціональним за доступністю і простотою виконання є ентеральний метод застосування.

Ключові слова: екстракт трутневого розплоду, імуностимуляція, курчата, хвороба Ньюкасла.

Вступ. Актуальність теми. Птахівництво в Україні та світі має тенденцію до інтенсивного розвитку (Яців, 2021; Gržinić et al., 2023). Вирощування та збереження молодняка птиці із забезпеченням їх високою інтенсивністю зростання на всіх стадіях утримання є однією з найбільш актуальних проблем сучасного птахівництва (Lin et al., 2020). Інфекційні захворювання є серйозною проблемою для птахівництва, вони здатні спричиняти масові збитки для виробництва. Управління та контроль за здоров'ям птиці є важливими для життєздатності птахівничої галузі (Nawab et al., 2019).

На організм птиці можуть відразу діяти різні патогени, як бактеріального так і вірусного походження (Souillard et al., 2022; De Oliveira et al., 2018). Для отримання здорового поголів'я птиці, вільного від збудників інфекційних захворювань в усіх країнах світу застосовують специфічну профілактику із використанням вакцин (Bagheri et al., 2023; Talazadeh et al., 2022). Проведене щеплення зумовлює напрацювання відповідних антитіл до антигенів, які містяться у вакцині, таким чином створюється специфічний імунітет до різних патогенів і відповідно, це дозволяє обмежувати поширення інфекції та здійснювати їх контроль (Hein et al., 2021). Вакцинація є найбільш безпечним та надійним методом профілактики інфекційних захворювань свійської птиці. Самі по собі вакцини не можуть ефективно захистити птахів від різноманітних патогенів у польових умовах (Kumar et al., 2010).

Через недоліки деяких вакцин, можуть виникати негативні наслідки вакцинації, що призводять до «виснаження» та передчасної деградації лімфоїдних органів і тканин (Ali et al., 2019). Імунокомпетентна система курчат, особливо добового віку, є ще недостатньо сформованою і відповідно, вона не може повноцінно функціонувати і можуть виникати імунодефіцитні стани (Schmiedeke et al., 2020). Для подолання імунодефіцитних станів перспективним є застосування імуностимуляторів, оскільки вони підвищують імунний статус організму, підсилюють природну резистентність і знижують відхід поголів'я, перш за все молодняка. Крім того, застосування імуностимуляторів дозволяє підсилювати імунну відповідь при вакцинації поголів'я (Ahmad et al., 2020; Bazekin et al., 2021; Бурдейний, 2023).

Аналіз останніх досліджень і публікацій. За останні роки є багато публікацій, щодо застосування імуностимулюючих препаратів не тільки у ветеринарії та й в гуманній медицині. Більше уваги приділяється імуностимулюючим засобам природного походження.

Було досліджено поліфенолові сполуки, які містяться у фруктах, і за результатами цього дослідження, автори вказують на позитивний вплив фруктових відходів на загальний стан імунокомпетентної системи свійської птиці (Hasted Teri-Lyn et al., 2021).

Популярними стають імуномодулюючі препарати на основі ефірних олій та екстрактів. Так, запропонований мультипрепарат ImmunoMax, який готують із м'яти перцевої, шипшини, чебрецю, прополісу та пробіотика. Результати застосування цього препарату вказують, що крім імуностимулюючої дії, препарат підвищує обмінні процеси в організмі курчат (Behboodi et al., 2022).

Досліджувався вплив танінів, отриманих з *Embllica officinalis* (індійського агруса), де автори вказують на добрі імуностимулюючі властивості для організму бройлерів, та використання танінів курчатам підвищує захисний імунітет проти кокцидіозу (Kaleem et al., 2014).

Було оцінено імуностимулюючий вплив флагеліну при вакцинації курчат проти ньюкаслської хвороби, яким двічі вводили аерозольно з двотижневим інтервалом. Результати показали, що курчата, імунізовані білками флагеліну, мали вищі титри антитіл до вірусу ньюкаслської хвороби та що флагелін може індукувати як гуморальну, так і клітинну імунні відповідь (Bagheri et al., 2024).

Перевірено імуностимулюючі властивості неповного ад'юванту Фрейнда в поєднанні з прополісом при зараженні *Pasteurella multocida*, в результаті дослідні курчата отримали більш високий рівень захисту (Mingfu et al., 2023).

Досліджено екстракт, який виготовили із *Radix astragali*, *Radix codonopsis*, *Herba epimedii* та *Radix glycyrrizae*. Ці рослини зазвичай використовуються в традиційній китайській медицині та у ветеринарії для покращення імунних функцій проти хронічних захворювань у людей і тварин. Перевіряли імуностимулюючі властивості на курчатах по рівню утворення антигемаглютинінів до вірусу ньюкаслської хвороби та вірусу пташиного грипу H5 (H5-AIV). За результатами цього дослідження, виявилось, що лише поєднання 4 трав'яних сумішей найкраще посилює напрацювання антитіл (Liu et al., 2009).

Використання в якості імуностимулюючих засобів рекомбінантних білків або інактивованих патогенів описано при використанні зимозану А. Дослідження вказало, що зимозан А, який є полісахаридом деяких дріжджів, здатний посилювати гуморальну ланку імунітету (Abou Elazab et al., 2017).

Таким чином, пошуки нових та дієвих імуностимулюючих засобів для курчат тривають, як в Україні так і у всьому світі.

Нашу увагу привернули продукти бджільництва. В літературі вже описано імуностимулюючий ефект на організм птиці таких препаратів бджільництва, як прополіс, перга, маточне молочко, та тощо (Ahmad et al., 2020; Pasupuleti et al., 2017). Нами було розроблено імуностимулятор, який виготовляли з личинок трутневого розплоду – (ЕТР), на який отримано патент на корисну модель (Бурдейний та ін., 2024). Даний імуностимулятор є доступними, недорогим, і його можна виготовити в умовах господарства. В попередніх дослідженнях, ми визначили оптимальне дозування екстракту трутневого розплоду (Бурдейний та ін., 2023)

В цьому дослідженні, нами було проведено дослідження по вивченню оптимального методу введення імуностимулятора екстракту трутневого розплоду (ЕТР) курчатам.

Мета роботи. Вивчити імуностимулюючий вплив розробленого імуностимулятора ЕТР на організм курчат за різних методів введення.

Завдання дослідження: виготовити імуностимулятор ЕТР та дослідити його імуностимулюючі властивості для курчат за різних методів введення при вакцинації проти ньюкаслської хвороби.

Матеріали та методи досліджень. У дослідженні використовували інтактних двотижневих курчат породи Легорн з благополучного щодо інфекційних хвороб птахогосподарства. Птиця утримувалась за оптимальних умов віварію, мала вільний доступ до води та корму. Всі маніпуляції над птицею здійснювали відповідно до існуючих нормативних документів (Стаття 26 Закону України №5456-VI від 16.10.2012 р. «Про захист тварин від жорсткого поводження»), що регламентують організацію робіт із використанням експериментальних тварин і дотримання принципів «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

З метою визначення імуностимулюючих властивостей імуностимулятора ЕТР на організм курчат за різних методів введення, імунний статус вираховували за серологічними, біохімічними та імуноморфологічними показниками. Для визначення оптимального методу введення ЕТР було сформовано 3 піддослідних та контрольна групи по 10 курчат. Другій групі препарат задавали ентерально в дозі 0,5 см³, третій – внутрішньом'язово в дозі 0,2 см³ та четвертій – інтраперітонеально в дозі 0,2 см³. Перша група була контрольною, якій не давали імуностимулятор.

Сироватки крові досліджували за загальноприйнятою методикою – реакцією затримки гемаглютинації (РЗГА). Визначення імуноглобулінів основних класів А, М, G у сироватці крові проводили у реакції простої радіальної імунодифузії в гелі за методом G.Mancini et al. (1965). Імуноморфологічні дослідження проводилися на макроскопічному рівні та розраховували індекси тимуса, бурси Фабриціуса та селезінки. Імуностимулюючі властивості імуностимулятора ЕТР визначали через 14 діб після імуностимуляції.

Результати досліджень та їх обговорення. З наведеної таблиці видно, що за показниками серологічних досліджень титр антигемаглютининів в РЗГА був вищий у 4 групі, де в поєднанні з вакциною вводився ЕТР інтраперітонеально і становив $7,70 \pm 0,05 \log_2$ ($p < 0,001$), нижчий цей показник виявився у другій групі $7,58 \pm 0,04 \log_2$ ($p < 0,001$) та у третій групі $7,62 \pm 0,08 \log_2$ ($p < 0,001$). У першій групі рівень антигемаглютининів складав $5,3 \pm 0,02 \log_2$.

Таблиця

Результати введення препарату ЕТР разом із щепленням проти ньюкаслської хвороби, (M±m, n=10)

Критерії оцінки	1 група	2 група	3 група	4 група
	вакцина Ла-Сота			
	Контроль	введення імуностимулятора ЕТР		
ентерально дозою 0,5 см ³		внутрішньом'язово дозою 0,2 см ³	інтраперітонеально дозою 0,2 см ³	
Титр в РЗГА, log ₂	5,3±0,02	7,58±0,04*	7,62±0,08*	7,70±0,05*
Рівень IgG, мг/см ³	8,42±0,02	9,02±0,012*	9,511±0,014*	9,534±0,014*
Рівень IgA, мг/см ³	0,58±0,014	0,63±0,014*	0,67±0,012*	0,68±0,014*
Рівень IgM, мг/см ³	1,27±0,03	1,55±0,01*	1,60±0,02*	1,64±0,04*
Індекс тимусу	4,58±0,011	5,72±0,014*	5,76±0,016*	5,80±0,011*
Індекс бурси Фабриціуса	4,26±0,012	5,65±0,014	5,63±0,02	5,64±0,12
Індекс селезінки	1,30±0,013	1,42±0,014*	1,41±0,013*	1,41±0,015*

Примітка: * - $p < 0,01$.

Підвищення антитіл спостерігалось при парентеральному введенні препарату, але і при ентеральному застосуванні відзначено досить високі показники. За результатами накопичення імуноглобулінів класів IgG, IgM та IgA найвищі показники спостерігали у четвертій групі, де разом з обробкою вакциною вводили інтраперітонеально ЕТР дозою 0,2 см³. Так, у курчат цієї групи рівень IgG становив $9,534 \pm 0,014$ мг/см³, IgA – $0,68 \pm 0,014$ мг/см³ та IgM – $1,64 \pm 0,04$ мг/см³.

У курчат третьої групи, де імуностимулятор ЕТР вводився внутрішньом'язово, рівні накопичення імуноглобулінів були незначно нижчими, у порівнянні з курчатами 4 групи. Так, рівень IgG становив $9,511 \pm 0,014$ мг/см³, IgA – $0,67 \pm 0,012$ мг/см³ та IgM – $1,60 \pm 0,02$ мг/см³.

У другій групі курчат, де імуностимулятор ЕТР вводився ентерально, рівень накопичення IgG становив $9,02 \pm 0,012$ мг/см³, IgA – $0,63 \pm 0,014$ мг/см³ та IgM – $1,55 \pm 0,01$ мг/см³.

У контрольній групі курчат, яким вводилася лише вакцина, рівні накопичення імуноглобулінів були значно меншими і становили IgG – $8,42 \pm 0,02$ мг/см³, IgA – $0,58 \pm 0,014$ мг/см³ та IgM – $1,27 \pm 0,03$ мг/см³.

Таким чином, у курчат 4 групи показники незначно відрізнялися від курчат 3-ї, а також 2-ї групи, де при ентеральному введенні підвищення цих показників порівняно з контролем було достатньо високим.

Імунологічними дослідженнями було встановлено, що найкращі показники індексу тимусу $5,80 \pm 0,011$ ($p < 0,001$) були при інтраперитонеальному застосуванні ЕТР. Дещо нижчим цей показник був у 3-й групі курчат, а при ентеральному введенні індекс тимусу дорівнював $5,72 \pm 0,014$ ($p < 0,001$). Цей показник значно відрізнявся від показника в контрольній групі – $4,58 \pm 0,011$.

Індекс бурси Фабриціуса при ентеральному введенні дорівнював $5,65 \pm 0,014$ і був найкращим показником у цьому досліді, а в контролі він дорівнював $4,26 \pm 0,012$.

Індекс селезінки у групі з ентеральним введенням ЕТР дорівнював $1,42 \pm 0,014$ ($p < 0,001$) і майже такі показники були в інших піддослідних групах при значному відриві від цього індексу в контрольній групі – $1,30 \pm 0,013$.

Таким чином, усі методи введення ЕТР мають імуностимулюючі властивості. Найбільш раціональним за доступністю і простотою реалізації є ентеральний метод.

Порівнюючи отримані результати, із результатами, які були отримані Behboodi H.R. et al., (2022) та Hasted Teri-Lyn et al., (2021), які відповідно досліджували імуностимулюючі властивості препарату *ImmunoMax* та поліфенолові сполуки, що містяться у фруктах, автори досягли збільшення живої маси дослідних курчат та збільшення кількості лімфоцитів та лейкоцитів в крові. Kaleem et al. (2014) при дослідженні впливу танінів, отриманих з *Emblica officinalis* вказують про збільшення титрів антитіл до еймерій. В нашому дослідженні, крім визначення титрів гемаглютининів до вірусу хвороби ньюкасла досліджували рівень імуноглобулінів та морфофункціональні зміни в імунокомпетентних органах, тобто визначали більший спектр показників, які більш достовірно вказують на імуностимулюючі властивості розробленого препарату.

Vagheri et al. (2024) в своїх дослідженнях, при застосуванні флагеліну, який отримували із опромінених клітин кишкової палички (*E. coli*). Отриманий препарат вводили аерозольно із вакциною проти ньюкаслської хвороби, та спостерігали збільшення маси легень курчат, що інтерпретувалося як імунна відповідь. Разом з тим, вказують, що частина курчат загинула. Звісно, така імуностимуляція є досить сумнівною.

Разом з тим, в роботі Liu et al. (2009), в якій досліджували вплив екстрактів трав з *Radix astragali*, *Radix codonopsis*, *Herba epimedii* та *Radix glycyrrhizae*, вказують на те, що введення екстракту курчатам з наявними імунодефіцитами значно підвищує титри антитіл до вірусу пташиного грипу, але ці титри в порівнянні з контрольною групою, були значно нижчими. Порівнюючи з нашим дослідженням, то показники в дослідних групах були більшими в порівнянні з контрольною групою курчат.

Abou Elazab et al. (2017), описують дослідження щодо визначення шляхів введення імуностимулятора зимозану А, та вказують, що імуностимулятор краще вводити перорально або підшкірно, тобто, більше напрацьовувалося антитіл в порівнянні із контрольною групою. Ці дослідження підтверджують, що при застосуванні імуностимулюючих препаратів кращим методом введення є ентеральний, оскільки він є найбільш раціональним та менш травматизуючим.

За проведеними нами дослідженнями по визначенню ефективного методу введення імуностимулятора ЕТР, який вводили інтраперітоніально, внутрішньом'язово та ентерально, встановлено, що всі вони були досить ефективними, але більш раціональним та безпечним був ентеральний метод.

Bhadouriya S. et al. (2019), Mingfu N. et al. (2023) вказують, що при застосуванні імуностимуляторів та ад'ювантів необхідно додержуватися правильного дозування та методів їх введення. Mingfu N. et al. (2023) вказують, що введення високих доз імуностимулятора MetII, який готували шляхом додавання до неповного ад'юванта Фрейнда екстракту прополісу, призвело до негативного ефекту, птиця загинула.

Висновки.

1. Для збереження молодняка птиці від дії різних патогенів виникла необхідність застосування імуностимулюючих препаратів, оскільки ці лікарські засоби здатні стимулювати імунокомпетентну систему курчат, яка, особливо в добовому віці, є ще недостатньо сформованою і відповідно, вона не може повноцінно функціонувати.

2. За результатами серологічних досліджень, досить ефективними методами введення імуностимулятора ЕТР в організм курчат були парентеральні. Так, при інтраперітонеальному введенні титр антигемаглютининів становив $7,70 \pm 0,05 \log_2$ та при внутрішньом'язовому введенні – $7,62 \pm 0,08 \log_2$. Слід зазначити, що при ентеральному введенні цей показник був незначно нижчим і становив $7,58 \pm 0,04 \log_2$. Таким чином, імуностимулятор ЕТР проявив достатні імуностимулюючі властивості навіть при ентеральному введенні.

3. За результатами біохімічних досліджень виявили, що у курчат 4 групи, яким імуностимулятор вводили інтраперітонеально, показники незначно відрізнялися від курчат 3-ї групи, яким препарат вводили внутрішньом'язово, а також курчат 2-ї групи, де при ентеральному введенні підвищення цих показників порівняно з контролем було достатньо високим.

4. За результатами імуноморфологічних досліджень індекси лімфоїдних органів, підвищувалися при усіх досліджуваних методах введення імуностимулятора. Найбільш раціональним за доступністю і простотою реалізації є ентеральний метод.

References

1. Бурдейний, Р. А., Грінченко, Д. М., Северин, Р. В. & Гонтарь, А. М. (2024). Спосіб виготовлення імуностимулятора (Патент України № 155545) Державна служба інтелектуальної власності України. <https://base.uipv.org/searchINV/search.php?action=viewdetails&IdClaim=288412>
2. Бурдейний, Р., Грінченко, Д., Северин, Р. & Гонтарь, А. (2023). Вивчення імуностимулюючої дії екстракту трутневого розплоду (ЕТР) при щепленні курчат проти ньюкаслської хвороби. *One Health Journal*, 1 (I), 53–56. <https://doi.org/10.31073/onehealthjournal2023-I-06>
3. Яців, С. Ф. (2021) Стан і перспективи розвитку птахівництва у сільськогосподарських підприємствах України. *Агросвіт*, 16, 26–33. <https://doi.org/10.32702/2306-6792.2021.16.26>
4. Abou Elazab, M. F., Inoue, Y., Kamei, H., Horiuchi, H. & Furusawa, S. (2017) Zymosan A enhances humoral immune responses to soluble protein in chickens. *Journal of Veterinary Medical Science*, 79 (8), 1335-1341. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0636>
5. Ahmad, S., Graça, M., Fratini, F., Altaye, S. & Li, J. (2020) New insights into the biological and pharmaceutical properties of royal jelly. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 (2), 1 - 26. <https://doi.org/10.3390/ijms21020382>

6. Ali, M. F., Abdel Hafez, M. S. & Mohamed, M. A. (2019). The ameliorating effect of some immune-stimulants on bursal and tracheal lesions of broiler chickens challenged with ND virus. *The Journal of Basic and Applied*, 80, 4. <https://doi.org/10.1186/s41936-019-0073-7>
7. Bagheri, M., Khani, M. H., Zahmatkesh, A., Barkhordari, M., Ebrahimi, M. M., Asli, E., Shahsavandi, S., Banihashemi, S. R., Esmaeilnejad-Ahranjani, P. & Moradi Bidhendi, S. (2022). Evaluation of cellular and humoral immune response in chickens immunized with flagellin-adjuvanted inactivated newcastle disease virus. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 85, 101796. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2022.101796>
8. Bagheri, S., Mitra, T., Paudel, S., Abdelhamid, M. K., Könnnyü, S., Wijewardana, V., Kangethe, R. T., Cattoli, G., Lyrakis, M., Hess, C., Hess, M. & Liebhart, D. (2023). Aerosol vaccination of chicken pullets with irradiated avian pathogenic *Escherichia coli* induces a local immunostimulatory effect. *Front Immunology*, 14, 1185232. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1185232>
9. Bazekin, G., Skovorodin, E., Dolinin, I., Gatiyatullin, I., Chudov, I. & Ezhkova, A. (2021). The Effect of new immunostimulants of tissue and plant origin on the morphological characteristics of the immune system's central organs and the dynamics of serum immunoglobulins. *Advances in Animal and Veterinary Sciences*, 9 (11), 1800-1809. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2021/9.11.1800.1809>
10. Behboodi, H. R., Hosseini, D., Salarieh, A., Gholampour, M., Panahi, M., Alemi, M., Baradaran, A. & Nazarpak, H. H. (2022). Impact of drinking water supplementation of a blend of peppermint, coneflower (*Echinacea purpurea*), thyme, propolis, and prebiotic on performance, serum constituents, and immunocompetence of broiler chickens. *Tropical Animal Health and Production*, 54(5), 289. <https://doi.org/10.1007/s11250-022-03274-9>
11. Bhadouriya, S., Sharma, B. K., Kakker, N. K., & Chhabra, R. (2019). Toll like receptors and cytokines as immunostimulatory adjuvants in poultry vaccines: current status and future trends. *World's Poultry Science Journal*, 75(3), 417-428. <https://doi.org/10.1017/S0043933919000242>
12. De Oliveira, M. G., Rizzi, C., Galli, V., Lopes, G. V., Haubert, L., Dellagostin, O. A., & da Silva, W. P. (2019). Presence of genes associated with adhesion, invasion, and toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates and effect of temperature on their expression. *Canadian Journal of Microbiology*, 65 (4), 253-260. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0539>
13. Gržinić, G., Piotrowicz-Cieślak, A., Klimkowicz-Pawlas, A., Górny, R. L., Ławniczek-Wałczyk, A., Piechowicz, L., Olkowska, E., Potrykus, M., Tankiewicz, M., Krupka, M., Siebielec, G. & Wolska, L. (2022). Intensive poultry farming: A review of the impact on the environment and human health. *Science of The Total Environment*, 858 (3), 160014. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160014>
14. Hasted, T-L, Sharif, S, Boerlin, P., & Diarra, M. S. (2021). Immunostimulatory Potential of Fruits and Their Extracts in Poultry. *Frontiers in Immunology*, 12, 641696. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.641696>
15. Hein, R, Koopman, R, García, M, Armour, N, Dunn, J. R, Barbosa, T, & Martinez, A. (2021). Review of Poultry Recombinant Vector Vaccines. *Avian Disians*, 65 (3), 438-452. <https://doi.org/10.1637/0005-2086-65.3.438>
16. Kaleem, Q. M., Akhtar, M., Awais, M. M., Saleem, M., Zafar, M., Iqbal, Z., Muhammad, F. & Anwar, M. I. (2014). Studies on *Emblica officinalis* derived tannins for their immunostimulatory and protective activities against coccidiosis in industrial broiler chickens. *The Scientific World Journal*, 22, 378473. <https://doi.org/10.1155/2014/378473>
17. Kumar, S., Koul, M. & Rai, A. (2010). Role of immunostimulatory molecules in poultry vaccines. *Recent Pat Biotechnol.* 4 (3), 41.
18. Lin, S. Y., Yao, B. Y., Hu, C. M. J. & Chen, H. W. (2020). Induction of robust immune responses by CpG-ODN-Loaded hollow polymeric nanoparticles for antiviral and vaccine applications in chickens. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 3303-3318. <https://doi.org/10.2147/IJN.S241492>

19. Liu, F. X., Sun, S. & Cui, Z. Z. (2010). Analysis of immunological enhancement of immunosuppressed chickens by Chinese herbal extracts. *Journal of Ethnopharmacol*, 127 (2), 251-256. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.11.012>
20. Mingfu, N., Qiang, G., Yang, L., Ying, H., Chengshui, L. & Cuili, Q. (2023). The antimicrobial peptide MetchnikowinII enhances Ptfα antigen immune responses against avian *Pasteurella multocida* in chickens. *Journal of Veterinaru Medical Science*, 85 (9), 964-971. <https://doi.org/10.1292/jvms.22-0579>
21. Nawab, A., An, L., Wu, J., Li, G., Liu, W., Zhao, Y., Wu, Q. & Xiao, M. (2019). Chicken toll-like receptors and their significance in immune response and disease resistance. *International Reviews of Immunology*, 38 (6), 284-306. <https://doi.org/10.1080/08830185.2019.1659258>
22. Pasupuleti, V., Sannugam, L., Ramesh, N. & Gan, S. (2017) Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1259510. <https://doi.org/10.1155/2017/1259510>
23. Schmiedeke, J.K., Hoffmann, D., Hoffmann, B., Beer, M. & Blohm, U. (2020). Establishment of Adequate Functional Cellular Immune Response in Chicks Is Age Dependent. *Avian Diseases*, 64 (1), 69-79. <https://doi.org/10.1637/0005-2086-64.1.69>
24. Souillard, R., Laurentie, J., Kempf, I., Le Caër, V., Le Bouquin, S., Serror, P. & Allain, V. (2022). Increasing incidence of Enterococcus-associated diseases in poultry in France over the past 15 years. *Veterinary Microbiology*, 269, 109426. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109426>
25. Talazadeh, F., Mayahi, M., & Fathi, M. (2022). Evaluation of immunostimulatory effects of a commercial herbal extract on avian influenza subtype H9N2 and Newcastle disease vaccination in chickens. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 73 (2), 4023 – 4030. <https://doi.org/10.12681/jhvms.26157>
26. Mancini, G. Carbonara, A. O. Heremans, J. F. (1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, 2 (3), 235–254.