



Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC)
CSIC-UCLM-JCCM

Estudio experimental del uso de inmunomoduladores orales en codorniz europea (*Coturnix coturnix*)

Trabajo Fin de Máster realizado por

Alberto José Martínez Ovejero

V^o B^o de la Directora

Ursula Höfle

Máster Universitario en Investigación Básica y Aplicada en Recursos
Cinegéticos

IREC (CSIC-UCLM-JCCM)
Universidad de Castilla-La_Mancha

Área: Sanidad Animal

Noviembre 2014

ÍNDICE

Resumen.....	2
1. Introducción.....	3
1.1 El sistema inmune aviar.....	3
1.2 Inmunosupresión en aves.....	4
1.2.1 Inmunosupresión y producción avícola.....	5
1.2.2 Estrés e inmunosupresión en centros de recuperación de fauna silvestre.....	6
1.3 Inmunomoduladores.....	7
1.3.1 Factor de transferencia.....	8
1.3.1.1 Factor de transferencia como estimulador inmune en humanos (4Life).....	8
1.3.2 Echinacea.....	9
1.4 Hipótesis de estudio.....	10
1.5 Objetivo.....	11
2. Material y métodos.....	11
2.1 Animales de estudio.....	11
2.2 Inmunomoduladores experimentales y tratamientos.....	11
2.3 Antígenos.....	12
2.4 Toma de muestras.....	13
2.5 Retos.....	13
2.6 Análisis de laboratorio.....	14
2.7 Análisis estadísticos.....	15
3. Resultados.....	17
4. Discusión.....	21
5. Conclusión.....	24
6. Bibliografía.....	25

Resumen

El sistema inmune aviar es una estructura que permite a las aves resistir a las enfermedades o sobrellevar una infección. En determinadas circunstancias este se puede ver afectado y consecuentemente reducir su respuesta frente a agentes externos dañinos. Dos de los motivos que dañan el sistema inmune y reducen su respuesta son el estrés y el hacinamiento, factores que afectan especialmente a las aves internadas en centros de recuperación de fauna silvestre y aves de corral criadas en explotaciones avícolas respectivamente. El objetivo del presente estudio es evaluar la eficacia de inmunomoduladores basados en el factor de transferencia y compararlos con la Echinacea (*Echinacea purpurea*), un inmunomodulador ampliamente conocido. Para ello se realizó un tratamiento experimental en 44 codornices europeas (*Coturnix coturnix*) divididos en cuatro grupos experimentales. Dos de ellos recibieron tratamientos con inmunomoduladores que contenían factor de transferencia, otro fue tratado con Echinacea y un último sirvió como grupo control. Se realizó una observación diaria de las aves y se tomaron muestras de peso, sangre y heces en los días 15, 30, 45 y 60 después del inicio del tratamiento oral. El día 43 después del inicio del tratamiento se inyectó Phytohemaglutinina (PHA) intracutáneo en el patagio derecho de cada ave y anotando el aumento del grosor del patagio a los 48 horas, como reto al sistema inmune celular. El día 57 después del inicio del tratamiento se retó al sistema inmune humoral; se realizó un reto del sistema humoral mediante la inyección de lipopolysaccharida (LPS de *E. coli*). Con los análisis efectuados en los grupos tratados con inmunomoduladores solo se detectó una reducción significativa de la reacción celular en el grupo tratado con la mayor concentración de transfer factor. Este dato y un aparente aunque no significativo incremento de la respuesta humoral indican que las sustancias inmunomoduladoras empleadas podrían tener un efecto beneficioso, aunque necesita de estudios adicionales para su evaluación. Los resultados indican que es recomendable seguir trabajando en esta línea porque se observan tendencias positivas hacia una mejora del sistema inmune en los grupos tratados con los inmunomoduladores.

1. Introducción

1.1 El Sistema Inmune Aviar

El sistema inmune aviar es una estructura que permite a las aves resistir a las enfermedades o sobrellevar una infección; estas pueden estar causadas por células extrañas y organismos invasivos o células propias anormales. Al igual que el sistema inmune de los mamíferos se caracteriza por la capacidad para diferenciar lo propio de lo extraño mediante el complejo mayor de histocompatibilidad, respuesta específica y la memoria inmune (Wakenell, 1999).

El sistema inmune está compuesto por células del tejido primario inmune y el tejido secundario linfoide. Dentro del tejido primario inmune se encuentran la Bolsa de Fabricio, la médula ósea y el timo. El divertículo de Meckel, la glándula pineal, la glándula de Harder, las glándulas accesorias del bazo, los folículos linfoides y las tonsilas cecales pertenecen al tejido secundario linfoide, que en las aves está muy desarrollado (Fletcher and Barnes, 1997).

Las aves tienen tres clases principales de anticuerpos: IgM, IgG y IgA.

Las células T son los principales efectores celulares en aves. Las células T ayudan y son empleadas en funciones citotóxicas por el complejo mayor de histocompatibilidad.

En las aves la diferenciación de las células B tiene lugar en la Bolsa de Fabricio y son las encargadas de la respuesta humoral. Las células T, sin embargo, se diferencian en el timo y son los encargados de la respuesta mediada por células (Cooper et al., 1966).

La respuesta inmune viene regulada por varios mecanismos: Complejo mayor de histocompatibilidad y Las citoquinas. Por otro lado, los macrófagos llevan a cabo dos funciones de gran importancia: Fagocitosis y digestión de los cuerpos extraños que penetran en el organismo (Glick et al., 2000).

En las aves existen tres tipos de respuesta inmune:

- Específica humoral.
- Específica realizada por células.

- No específica.

La primera y la segunda entran en acción siempre que hay un antígeno ya procesado mientras la tercera responde frente a cualquier antígeno, esté procesado o no. Esta última se lleva a cabo a través de macrófagos, heterófilos, trombocitos y células asesinas naturales (NK) (Wakenell, 1999).

La primera línea de defensa la componen la piel y las mucosas, si esta no es suficiente entra en juego la respuesta inespecífica hasta que se desencadena la inmunidad específica. Para ello se debe procesar el antígeno y tiene que ser presentado a los linfocitos B y T. Esta función se lleva a cabo por las células presentadoras de antígeno (CPA). A partir de aquí comienza la producción del anticuerpo necesario y se memoriza para que en situaciones posteriores se pueda llevar a cabo una respuesta rápida contra ese mismo antígeno.

1.2 Inmunosupresión en aves

Algunos agentes o influencias externas provocan daños en el sistema inmune, alteran la protección del huésped y el equilibrio funcional inmunoregulador. Cuando la respuesta inmune presenta una disfunción temporal o permanente que conduce a un aumento de la susceptibilidad a agentes patógenos se conoce como inmunosupresión (Dohms y Saif, 1983; Muneer et al., 1988).

En aves la inmunosupresión puede estar causada por agentes infecciosos y no infecciosos o condiciones ambientales adversas como, la humedad, el hacinamiento y el estrés (Gross y Siegel, 1982).

Esto puede representar un grave problema tanto para las especies de aves silvestres internas en centros de recuperación de fauna salvaje, en especial para aquellas especies amenazadas, como para las aves de corral criadas de manera intensiva.

En el caso de las aves de corral esto está relacionado con las condiciones de crianza intensiva (hacinamiento) y la selección genética para la producción de carne y huevo,

haciendo a estas aves más vulnerables a las infecciones con patógenos primarios y secundarios, poniendo a prueba su sistema inmune.

1.2.1 Inmunosupresión y producción avícola

La producción avícola se ha incrementado considerablemente en los últimos años gracias a las mejoras tecnológicas introducidas y al entusiasmo de los productores por mejorar la calidad de su producto para así obtener mayores ingresos. Dentro de este sector avícola se incluyen tanto los pollos de engorde, gallinas ponedoras como otros rubros de menor escala como pueden ser la cría de perdiz y codorniz (Heredia y Olger, 2013).

Independientemente del tipo de explotación, uno de los problemas que más pérdidas conlleva en una explotación avícola en la actualidad es la presencia de enfermedades intestinales, propiciadas por las mismas condiciones del medio ambiente como pueden ser la humedad y circulación del aire.

Dejando a un lado la resistencia de las diferentes especies a las enfermedades, existen patologías que pueden presentarse en cualquier momento como brotes de coccidiosis, parásitos internos y externos o virus, por eso el control sanitario dentro de las granjas es de vital importancia (Heredia y Olger, 2013).

Hasta hace poco, se utilizaban antibióticos en las explotaciones avícolas para llevar a cabo este control sanitario, pero especialmente para mejorar la producción de dichas explotaciones puesto que los antibióticos suministrados en bajas dosis junto con el alimento actúan como promotores de crecimiento. Esta práctica se vio cuestionada cuando la comunidad científica empezó a manifestar una gran preocupación por el alarmante incremento de la resistencia a antibióticos y el problema que esto supone en el tratamiento de las enfermedades infecciosas en humanos y animales domésticos. Esta preocupación se ve respaldada por numerosas publicaciones científicas que han destacado la posible relación entre el uso de antibióticos en animales y el incremento de resistencias a dichos compuestos en bacterias de importancia en patología humana y animal (Piddock, 1996; Torres y Zarazaga, 2002; Witte, 1998).

Actualmente y desde el 1/1/2006 existe la total prohibición del uso en alimentación animal de antibióticos promotores de crecimiento. Por este motivo, se han buscado nuevas alternativas al uso de los antibióticos en la alimentación animal. Entre otros, está el uso de probióticos (bacterias que compiten con los patógenos y mantienen el equilibrio de la flora intestinal), enzimas que mejoran la digestión de los alimentos o la adición de ciertos ácidos orgánicos, entre otras (Torres y Zarazaga, 2002).

1.2.2 Estrés e inmunosupresión en centros de recuperación de fauna silvestre

En el caso de los centros de recuperación los individuos sufren estrés, que puede estar asociado a la cautividad, manejo inadecuado, tratamientos prolongados con antimicrobianos y condiciones debilitadoras como los traumas, enfermedades o lesiones causantes de su internamiento (Castro, 2003). Se conoce como estrés a los diferentes cambios que experimenta el organismo en respuesta a una amenaza, esta amenaza puede ser extrema y aguda o menos aguda pero crónica durante un largo periodo de tiempo. Considerando un agente estresante todo aquel que provoca una respuesta de este tipo. Estas respuestas son complejas e incluyen cambios en diversos mecanismos; comportamentales, fisiológicos, metabólicos, inmunológicos y otras reacciones que el organismo pone en marcha para sofocar los cambios que se plantean, adaptarse a ellos y así, poder sobrevivir a estas perturbaciones.

Estos mecanismos son importantes en animales de producción, que los utilizan para ayudar a mantener actividades fisiológicas como la producción de huevos y el crecimiento (Shini et al., 2010).

Algunos parámetros inmunológicos se pueden utilizar para detectar inmunosupresión en aves estresadas, como ejemplo en respuesta a situaciones de estrés se ha observado involución en órganos inmunes (Bolsa de Fabricio, timo y bazo), empeoramiento de la respuesta inmune y aumento de la morbilidad (Siegel, 1971; Thaxton et al., 1974; Pilo et al., 1985; Freeman, 1987; Puvadolpirod y Thaxton, 2000; Post et al., 2003; Shini, 2004; Huff et al, 2005, 2006; Lin et al., 2006; Virden et al., 2007; Shini et al., 2008a, b).

1.3 Inmunomoduladores

García-Hernández et al. (2009) definen a inmunomoduladores como sustancias capaces de aumentar o disminuir la respuesta inmune. Teniendo en cuenta el origen, naturaleza química y actividad biológica específica las sustancias inmunomoduladoras forman un grupo muy heterogéneo (Takx-Kohlen, 1992).

Actualmente la clasificación más aceptada de las sustancias inmunomoduladoras es la propuesta por Vanselón, 1989:

- *Sustancias biológicas*: microorganismos y sus productos como las micobacterias de la tuberculosis incorporadas al Adyuvante Completo de Freund (AFC), o mezcla de toxinas bacterianas usualmente derivadas de estreptococos, *Serratia*, virus, saponinas, vitamina A, vitamina E, lanolina, etc.
- *Productos químicamente definidos de hongos, bacterias y algas*: dipéptido murámico (MDP), trehalosa dimicolato (TDM), proteína P40 asociada al peptidoglicano de la pared bacteriana, lípido A, lipopolisacárido (LPS) proveniente de bacterias gramnegativas, glucanos de hongos y polisacáridos de algas.
- *Productos biológicos del sistema inmune*: citoquinas (IL-2, INFg).
- *Productos sintéticos análogos a los productos biológicos*: componentes de paredes bacterianas.
- *Preparaciones químicas*: compuestos del aluminio. $Al(OH)_3$; $Al_2(SO_4)_3$; $Ca_3(PO_4)_2$; $K_2 PO_4$; sulfato de dextrano y liposomas; solución de sales de NaCl tratada magnéticamente (CM-95).

Cuando se activan, algunas de las sustancias inmunomoduladoras provocan la estimulación de la respuesta inmune debido a un aumento de la cantidad de antígeno que se expresa en la membrana celular y a la mayor eficiencia de la presentación de este a los linfocitos. Además, la proliferación de linfocitos aumenta por medio de factores solubles liberados por los macrófagos (Wagnerová y Ferencík, 1993).

1.3.1 Factor de transferencia

En nuestro estudio utilizamos dos inmunomoduladores de origen animal basados en el descubrimiento del “factor de transferencia”.

Los factores de transferencia son derivados de los linfocitos T que transmiten la capacidad de expresar hipersensibilidad de tipo retardada y la inmunidad a través de células de donantes inmunes a receptores no inmunes (Lawrence, 1974). Hay evidencias de que esta actividad es específica de antígeno (Burger et al., 1977; Borkowsky et al., 1981). Es conocido que son dializables y resistentes a la degradación por tripsina, ribonucleasa y desoxirribonucleasa (Lawrence, 1969). Aunque a día de hoy no se conocen con certeza ni las estructuras primarias ni el mecanismo de acción de los factores de transferencia, se sabe que los purificados de los factores de transferencia son de origen proteico e inmunológicamente específicos (Rozzo y Kirkpatrick, 1992).

Los factores de transferencia tienen la ventaja de ser inmunomoduladores versátiles que inducen y modifican o normalizan la respuesta inmune (Vorobiev et al., 2005).

1.3.1.1 Factor de transferencia como estimulador inmune en humanos (4life)

4Life Transfer Factor™ (producido por 4Life Research, USA) es un inmunomodulador compuesto por péptidos naturales obtenidos a partir de calostro de vaca. Actúa estimulando diferentes componentes del sistema inmune como las células naturales asesinas (NK), la síntesis inmunocitokinética y regulando las diferentes funciones inmunitarias (Vorobiev et al., 2005). De esta forma estos péptidos proporcionan

protección inmunitaria contra microorganismos nocivos, células cancerosas y otros antígenos dañinos.

Según A. A. Vorobiev (1992), es un producto hipoalergénico que no contiene caseína, lactoglobulina y otras proteínas de gran tamaño, pero sí fracciones de citokinas leucocíticas.

En un estudio realizado con este compuesto De Vinci et al. (1996) concluyen que ayuda a controlar y aliviar la cistitis recurrente femenina no bacteriana (NBRC). En otro estudio se vio que tiene un efecto significativo en el control del virus del herpes humano (HHV-6) y otras enfermedades relacionadas (Ablashi et al. 1996).

1.3.2 Echinacea

El otro inmunomodulador utilizado en el estudio es de origen vegetal. La Echinacea (*Echinacea purpurea*) es una hierba medicinal que actúa como estimulante inmunológico y es utilizada en Europa y Norte América para la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas (Akhtar et al., 2003; Nasir y Grashorn, 2006).

Se le atribuyen varias propiedades farmacológicas como mejorar el consumo de alimento, activar las enzimas digestivas y estimular la función inmune (Lee et al., 2003). También se le atribuye una mejora en la eficiencia de producción y en la calidad de la comida de origen animal (Windisch, 2008; Toghyani et al., 2011).

Entre las sustancias activas presentes en la Echinacea y sus derivados se encuentran alcanoidas, glicoproteínas, compuestos fenólicos, ácido cinámico, aceite esencial y flavonoides (Barrett, 2003). Se ha demostrado que estas sustancias son eficaces en el tratamiento de diferentes patologías mejorando la inmunidad (Bauer, 1999).

Aunque todavía se dispone de pocos datos en aplicación de echinacea en las especies de ganado, sobre todo en las aves de corral; se ha reportado que la aplicación intermitente de Echinacea como acompañante de la comida mejoraron la inmunidad

en cerdas, capas y pollos de engorde (Roth-Maier et al, 2005; Koreleski y Świątkiewicz, 2007; Böhmer et al., 2009; Nasir y Grashorn, 2010).

Otros estudios demuestran que la Echinacea potencia la respuesta inmune tanto si es aplicada de manera continua como intermitente, adecuando las dosis al modo de aplicación (Allen, 2003; Frieier et al., 2003; Landy et al., 2011).

Se ha demostrado también, que la Echinacea mejora la concentración de inmunoglobulina sérica, especialmente la concentración de IgG (Schranner et al., 1989).

Por otra parte, las dosis altas de plantas medicinales pueden tener efectos negativos en algunas bacterias beneficiosas para el organismo como lactobacillus, puesto que impiden que estas lleven a cabo su función beneficiosa en el organismo (Toghyani et al., 2010a).

De todos modos, se puede afirmar que la aplicación de Echinacea en explotaciones industriales de animales para consumo humano resulta en un mejor rendimiento de estas (Maass et al., 2005; Landy et al., 2011).

En el experimento objetivo de este TFM testamos preparados de las dos sustancias anteriormente mencionados en una especie de ave cinegética que es criada con frecuencia en granjas de forma intensiva, la codorniz europea.

1.4. Hipótesis de estudio

Los inmunomoduladores Echinacea y las dos formulaciones de factor de transferencia, administrados por vía oral en codorniz europea tienen efectos beneficiosos como la mejora en la conversión de alimento, traduciéndose esto en una mejor condición física. Reduce la excreción de parásitos intestinales, aumenta la productividad de los individuos hembras, observándose un aumento en el número de huevos puestos por día y mejora la reacción humoral y celular.

1.5. Objetivo

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de los inmunomoduladores 4Life basados en el descubrimiento del factor de transferencia mediante la medición de diferentes parámetros inmunológicos y la condición física en la codorniz europea (*Coturnix coturnix*) en comparación con los derivados de la planta *Echinacea purpurea*.

2. Material y métodos

2.1 Animales del estudio

El estudio se llevó a cabo con 44 pollos de codorniz europea (*Coturnix coturnix*) de 12 semanas de edad (22 machos y 22 hembras) procedentes de una granja de producción comercial de Valencia. Una semana antes del comienzo del estudio fueron trasladadas a jaulas elevadas del suelo para adaptación, en las cuales se mantuvieron durante el periodo de estudio. Durante todo el estudio se proporcionó agua y alimento *ad libitum*.

Las 44 codornices se dividieron en cuatro grupos de 12, 11, 11 y 10 codornices cada uno, los grupos pares formados por la mitad hembras y la mitad machos y los grupos impares formados por 5 y 6 machos cada uno y el resto hembras. Los animales fueron identificados individualmente por medio de anillas numeradas y anillas de color para la identificación del grupo experimental.

2.2 Inmunomoduladores experimentales y tratamientos

Tres de los cuatro grupos incluidos en el experimento fueron tratados con tres inmunomoduladores diferentes incluidas en capsulas solubles opacas, mientras el cuarto fue utilizado como grupo control y recibió las mismas capsulas sin contenido.

Los inmunomoduladores empleados fueron los siguientes:

- 4Life Transfer Factor plus Tri-Factor (4Life Trademarks, LLC, Sandy, Salt Lake City, EE.UU)
- 4Life Transfer Factor Tri-Factor (4Life Trademarks, LLC, Sandy, Salt Lake City, EE.UU)
- Echinacea (Arkopharma, Madrid, España)

Se asignó al azar un tratamiento a cada grupo en un planteamiento doble ciego (sin que el equipo encargado de los muestreos y tratamientos supiera que grupo recibía que tratamiento). El tratamiento se administró por vía oral diariamente durante 60 días, una dosis de 300mg/individuo/día y 250mg/individuo/día en el caso de los preparados de factor de transferencia y echinacea respectivamente, mientras el grupo control recibía cápsulas vacías.

2.3 Antígenos

LPS y PHA

Como reto para evaluar la respuesta inmune de los individuos tratados se emplearon dos antígenos:

Lipopolysaccharida (LPS) de E.coli O5:55 (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Esta LPS ha sido aislada a partir de la pared bacteriana de *Escherichia coli* y su inoculación simula una infección bacteriana, estimulando así tanto la respuesta innata como adaptativa del sistema inmune (Klasing, 2004).

Phytohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA, Sigma-Aldrich, Madrid, España). PHA es un mitógeno que origina la proliferación de células T *in vitro* que resulta en el reclutamiento y activación de otros leucocitos, dando lugar a un edema localizado y pasajero que alcanza su máximo grado en las 48 horas posteriores a su inoculación (Martin et al., 2006).

2.4 Toma de muestras

Todas las codornices incluidas en el estudio fueron pesadas los días 0, 14, 29, 43 y 57 del experimento (Tabla1). El día 0 también se tomó la medida del tarso de cada individuo para el posterior cálculo de la condición física a partir de una regresión lineal como se detalla en Peig et al. (2009).

En los mismos días se extrajeron muestras de sangre (Tabla1). La sangre se obtuvo de la vena cubital mediante jeringa de insulina y aguja estéril. La sangre fue trasladada inmediatamente a tubos estériles de heparina litio y conservada a 4°C hasta su procesado en el laboratorio durante un máximo de tres horas.

Se evaluó la excreción de propágulos de parásitos para el conjunto de cada grupo. Para ello se recogieron muestras de excrementos los días 0, 14, 29, 38 y 43 del experimento mediante bandejas colocadas durante 24 horas bajo las jaulas (Tabla1). Los excrementos recogidos en 24 horas se colocaban en bolsas de plástico con cierre hermético y se conservaron a 4°C hasta su análisis en un máximo de 24 horas.

Los huevos puestos por las hembras de cada grupo fueron recogidos y contados diariamente entre los días 15 y 41 del experimento.

2.5 Retos

Con el fin de evaluar el estado inmune de los individuos, el día 43 del experimento realizamos un reto del sistema inmune celular mediante la inyección intracutánea de 0.1ml (equivalente a 100 µg) de PHA (Sigma-Aldrich, Madrid, España), según un protocolo validado previamente (Smits et al., 1999) (Tabla1). Para ello, previamente a la inyección de PHA se desplumó una zona de 1 cm del patagio del ala derecha de cada individuo y se midió el grosor del patagio en dicha zona con un cutímetro por triplicado. A continuación, se inyectó la PHA y se repitió la misma medida por triplicado a las 48 horas (Smits et al., 1999).

El día 57 del experimento la mitad de los individuos de cada grupo, entre los que se encontraban tanto machos como hembras, fueron retados con un antígeno que imita

una infección bacteriana sistémica aguda (Tabla1). Para ello se inyectó 0.1 ml de PBS con 0.5mg/ml de la lipopolysacárida (LPS) de *E. coli* O5:55 (Sigma-Aldrich, Madrid, España) intramuscular. Previo al reto se obtuvieron 0.2ml de sangre periférica de la vena brachial de cada individuo. Los 3, 5, 7, 10 y 15 después del reto se muestrearon de forma alterna en cada ocasión la mitad de los individuos incluidos en el experimento, limitando de esta forma el efecto negativo del manejo y las repetidas extracciones de sangre (Tabla1).

2.6 Análisis de laboratorio

Para el análisis cuantitativo de propágulos de parásitos (oocitos de Coccidios) encontrados en las muestras fecales se usó la técnica por flotación en sulfato de cinc de acuerdo con lo descrito en Mehlhorn et al. (1992). Estos análisis se llevaron a cabo en las 24 horas siguientes a la recogida de muestras.

En las muestras de sangre recogidas a lo largo del experimento se determinaron el hematocrito y los sólidos (proteínas e iones por ser plasma) totales. En cada extracción de sangre se realizó una extensión en porta para posteriores análisis (Campbell, 1988). Una vez en el laboratorio los frotis se tiñeron mediante la técnica *Hemaquick* (Biochemical Sciences, Swedesboro, NJ).

El resto de la muestra de sangre se centrifugó (10min a 3000rpm), para la separación del plasma y células sanguíneas. El plasma se fraccionó en varias alícuotas, y el pellet (fracción celular) y el plasma se guardaron congelados a -80° C para posteriores análisis no objetivos del presente trabajo (estrés oxidativo, Carotenoides, bioquímica sanguínea, etc.).

Las muestras de plasma recogidas en los días posteriores a la inyección de LPS se emplearon para la determinación de niveles de anticuerpos frente al antígeno LPS. Para ello se midió la respuesta al anticuerpo en un ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) indirecto empleando como anticuerpo secundario un anticuerpo multiespecie (Bethyl laboratories, Montgomery, TX, EEUU) ligado a peroxidasa (Horse radish peroxidase HRP) y empleando un protocolo ligeramente modificado según

Tomey et al. (2010). Brevemente, utilizamos placas de alta absorbancia de fondo plano de 96 pocillos. Estas placas fueron tapizadas con 0.5mg/ml LPS y diluidas en tampón carbonato (pH 9.6) e incubadas durante una noche a 4°C. El día siguiente el complemento contenido en los plasmas se inactivó a 56° C durante 30 min. A continuación, se lavaron las placas tres veces con tampón PBS-Tween 20 y las reacciones inespecíficas de IgG fueron bloqueadas durante dos horas con PBS con 1% de albúmina de suero bovino a temperatura ambiente. Se volvieron a lavar las placas tres veces y se añadieron los plasmas, cada muestra por triplicado. A continuación se incubaron de nuevo durante toda la noche a 4°C. El día siguiente las placas fueron lavadas tres veces y se incubaron durante dos horas con una dilución 1/1000 de anticuerpo secundario (antibird Bethyl laboratorios, EEUU). La reacción fue revelado con ABTS (2,2'-azino-bis (3 ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid, Sigma-Adrich, Madrid España) durante 20 min y la absorbancia leída a 405nm (Tomey et al., 2010).

2.7 Análisis estadístico

Con los datos de peso y la medida del tarso tomada el día 0 se calculó la condición física de los individuos mediante regresión lineal del peso sobre la longitud del tarso de los individuos como se detalla en Peig et al. (2009).

Para determinar el efecto de los tratamientos se compararon los datos de condición física, incremento del grosor del patagio tras la inyección de PHA, aumento de anticuerpos circulantes tras la inyección de LPS, hematocrito y proteínas totales de los grupos experimentales utilizando un ANOVA (análisis de varianza) de un factor. Las diferencias entre condición, hematocrito etc. fueron analizados mediante la prueba de rango múltiple de Duncan.

Para la realización de estos análisis se utilizó el paquete estadístico SPSS 18. La significancia fue fijada en $p \leq 0.05$.

Tabla 1: Estructura del experimento para evaluar la eficacia de inmunomoduladores orales en codorniz europea.

Día experimental	0	14	29	38	43	57	60	62	64	67	74-85
Día post inoculación LPS	-57	-43	-28	-19	-14	0	3	5	7	10	17
Muestra	Peso Sangre biometría Heces	Peso Sangre Heces	Peso Sangre Heces	Heces	Peso Sangre Heces Inyección PHA	Peso Sangre Inyección LPS (1/2 indv.)	Peso Sangre (1/2 indv.)	Peso Sangre (1/2 indv.)	Peso Sangre (1/2 indv.)	Peso Sangre (1/2 indv.)	Peso Sangre (1/2 indv.)
Edad de las codornices	3 semanas	5 semanas	7 semanas	8 semanas	9 semanas	11 semanas	11 semanas	11 semanas	11 semanas	12 semanas	13-15 semanas

3. Resultados

En todos los grupos experimentales se observa un incremento de la condición física entre el día 0 y los días 15, 30, 45 y 60 del experimento, sin embargo este incremento no resulta significativo ($P>0.05$) y por tanto no se observaron diferencias significativas en la condición física entre los cuatro grupos (Figura 1). Tampoco se detectaron diferencias significativas en las proteínas totales y hematocrito entre los grupos.

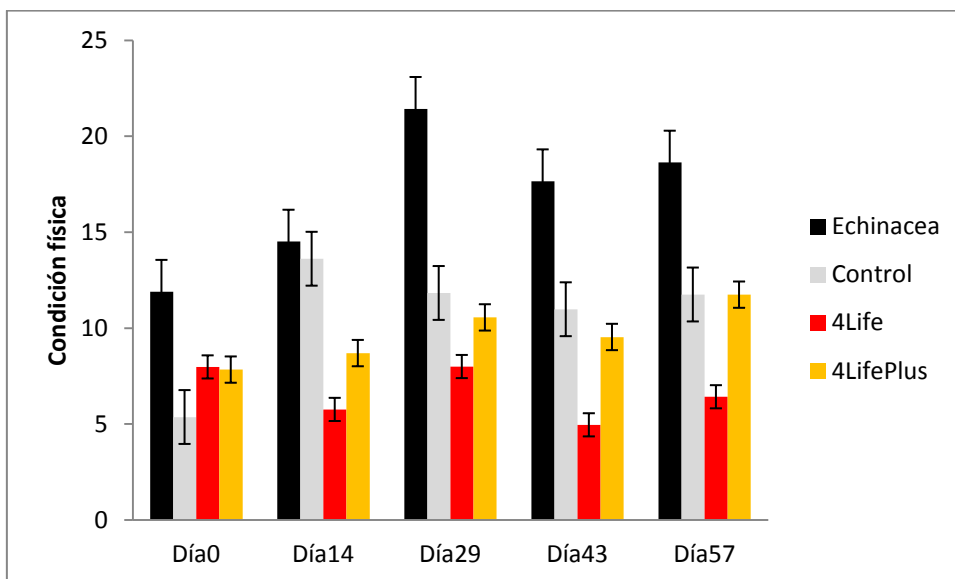


Figura 1. Condición física reflejada como regresión del peso sobre la longitud del tarso en codornices tratados con inmunomoduladores orales. Las barras de error reflejan la desviación estándar sobre la media de los índices de los individuos de los grupos experimentales.

La reacción a la inyección de PHA produjo, como era de esperar, un aumento significativo en el grosor del patagio. El grado de engrosamiento fue mayor en el grupo control que en los tres grupos tratados con inmunomoduladores (Figura 2), aunque esa tendencia solo era significativa en el grupo que había sido tratado con 4Life Transfer Factor plus Tri-Factor ($P<0.05$).

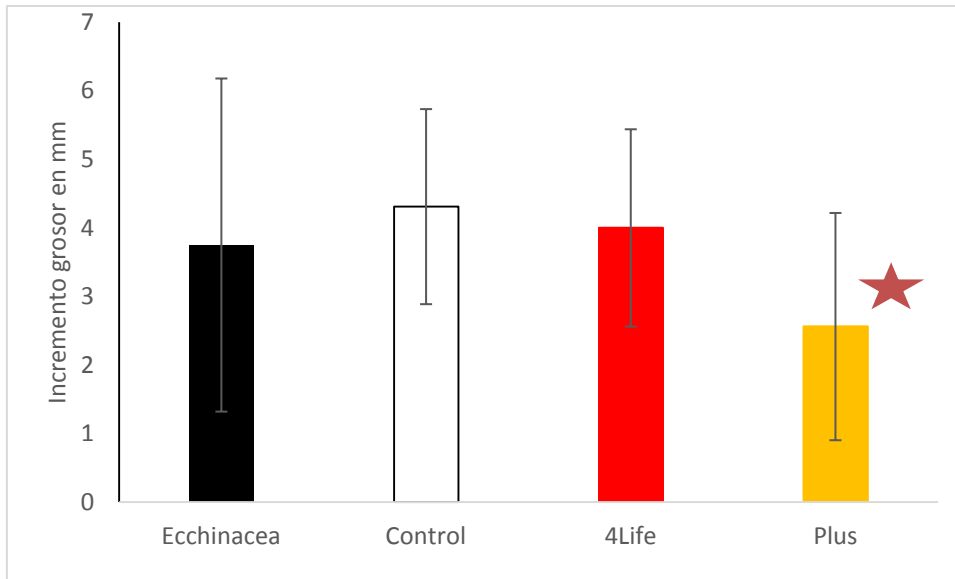


Figura 2. Engrosamiento en mm del patagio a las 48h en respuesta a la inyección intracutánea de la lectina PHA.

La inyección de LPS causó un aumento en la circulación de anticuerpos frente al antígeno en sangre periférica en todos los grupos. Aunque el incremento de densidad óptica y con ello de título de anticuerpos a D5 es mayor en el grupo tratado con Ecchinacea estas diferencias no son significativas (Figura 3).

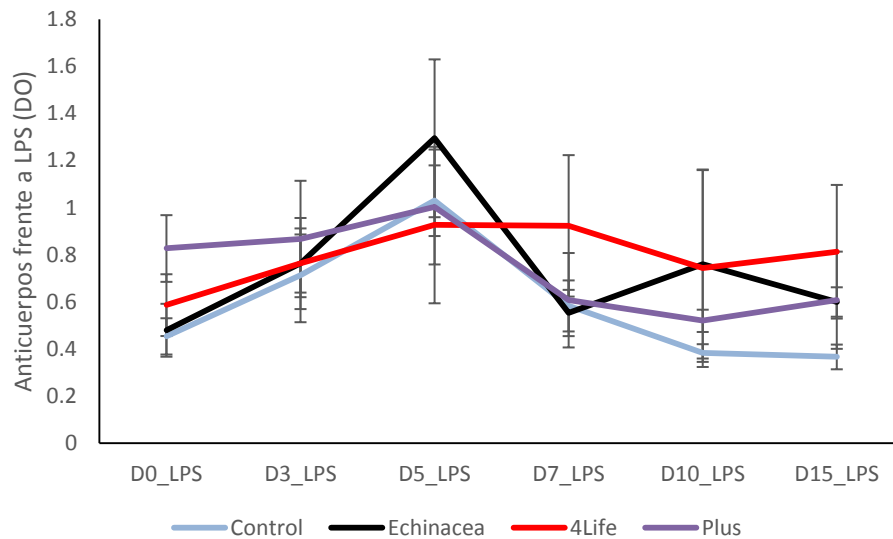


Figura 3. Anticuerpos producidos contra LPS de *E. coli* O5:55 en grupos de codorniz tratados con inmunomoduladores orales. Aunque el grupo tratado con Echinacea parece tener una reacción más fuerte no hay diferencias estadísticamente significativas. Las barras de error representan el error típico.

La excreción de propágulos de parásitos y la producción de huevos no difirieron significativamente entre grupos de tratamiento, aunque es posible que el grupo tratado con Echinacea muestre una tendencia a una prolongación del periodo de puesta (Figuras 4 y 5).

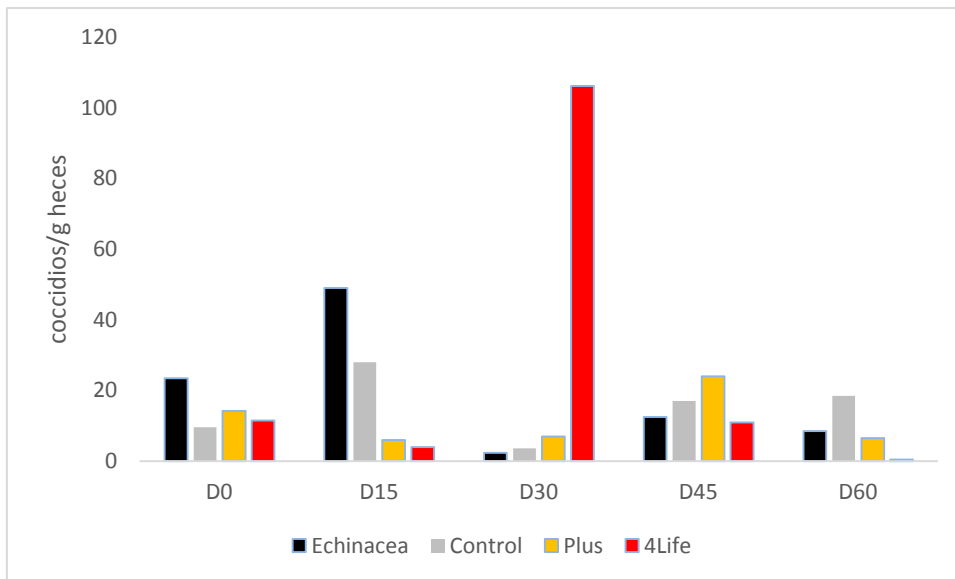


Figura 4. Excreción de coccidios/g de heces de los grupos a lo largo del experimento.

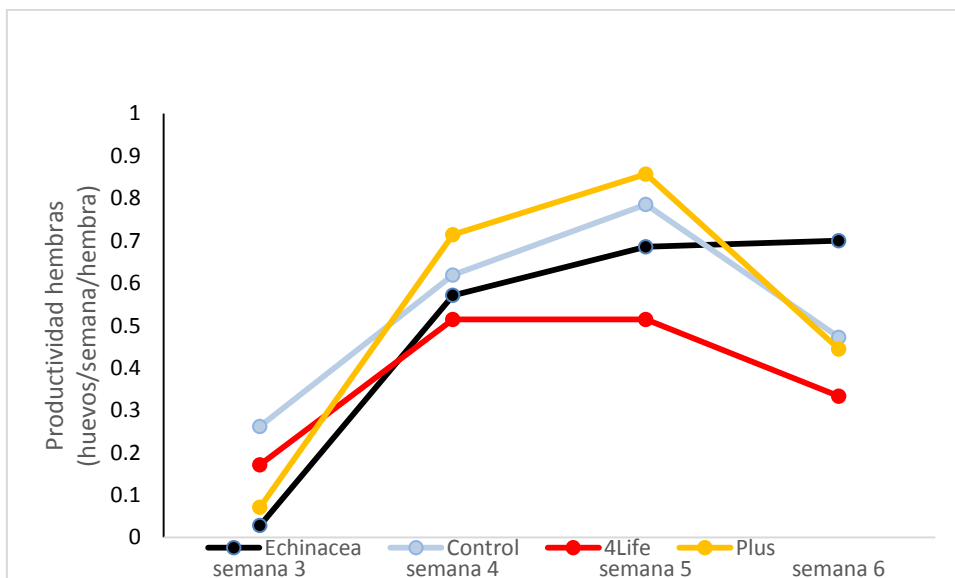


Figura 5. Media semanal de producción de huevos por hembras de cada grupo entre las semanas 3 y 6 del experimento.

4. Discusión

El estudio experimental realizado tiene como objetivo evaluar la eficacia del uso de inmunomoduladores orales en aves. En concreto, aquellos inmunomoduladores que basan su eficacia en la incorporación del factor de transferencia, sustancia de origen animal (De Vinci et al., 1996). En este caso se empleó una formulación oral del inmunomodulador confeccionado para humanos (4Life Trademarks, LLC, Sandy, Salt Lake City, EE.UU 4Life, con y sin adyuvante). Además, utilizamos otro inmunomodulador de origen vegetal y con efectos conocidos, la Echinacea (Landy et al., 2011), a modo de referencia.

Los datos de condición física reflejan un incremento en todos los grupos, debido posiblemente al crecimiento fisiológico de los individuos. Además, puede estar también relacionado con las condiciones de mantenimiento en la que se encontraban los animales de estudio en la granja de origen y con el transporte hasta las instalaciones donde se llevó a cabo el experimento. Pudiendo estos factores haber debilitado a los animales y una vez aclimatados al nuevo lugar y con alimento y bebida *ad libitum* haber adquirido una condición física aceptable y mantenida durante el resto del experimento. Por el contrario no se observan diferencias significativas entre la condición física media de cada grupo a lo largo del tratamiento. Los resultados obtenidos para las medidas de microhematocrito y proteínas totales no difieren significativamente entre los diferentes grupos. Esto puede ser debido a que tampoco se encontraron diferencias significativas en la condición física entre los grupos.

Estos resultados difieren de los datos obtenidos para el uso de Echinacea en diferentes especies con fines inmunomoduladoras en las cuales sí mejoraron la conversión del alimento, y el rendimiento productivo (Gharieb y Youssef, 2014). Landy et al. (2011) también observan una ganancia diaria de peso significativa en grupos de pollos alimentados con suplemento de Echinacea.

La producción de huevos en general era baja y no se observó ningún efecto del tratamiento sobre la productividad de las hembras, asociado posiblemente a la ausencia de diferencias reseñables en su condición física.

La excreción de propágulos de coccidios fue en general baja, debido posiblemente al mantenimiento de las aves de estudio en jaulas alejadas del suelo. La excreción fue similar entre el grupo control y los tratados con inmunomoduladores. Estos resultados difieren de los obtenidos por Arczewska y Świątkiewicz (2011), donde concluyen que una mezcla de extractos de plantas entre las que se incluye la Echinacea como suplemento del alimento si reduce significativamente el número de coccidios excretados por gramo de heces en pollos. Sin embargo estas diferencias podrían estar relacionados con el hecho de que las aves del estudio de Arczeva y Swiatkiewicz estaban infectadas con coccidios en altas concentraciones similares a una coccidiosis clínica mientras que las cantidades de coccidios excretados por las codornices en nuestro estudio de por si representan una infección muy moderada. En cuanto a los preparados que contienen factor de transferencia no hay datos previos sobre su influencia en infestaciones parasitarias. Nuestros resultados muestran un aumento limitado en el tiempo en uno de los grupos tratados con productos con factores de transferencia que sin embargo no estuvo reflejado en el siguiente tratamiento, sugiriendo la resolución de una infestación clínica temporal. Desconocemos sin embargo el papel del inmunomodulador en este episodio.

Mientras que no se observó un efecto significativo de los inmunomoduladores en los parámetros fisiológicos revisados en el presente trabajo, la respuesta a los retos a la reacción inmune si permitió observar algunas diferencias entre las aves de los tratados con inmunomoduladores y las del grupo control. La inyección de PHA provocó un aumento del grosor del patagio en los animales de todos los grupos, sin embargo este fue menor en los grupos tratados con inmunomoduladores que en el grupo control. Aunque todos los grupos tratados con inmunomoduladores presentaron una reacción menor que el grupo control frente al mitógeno, solo hubo una reacción significativamente menor en el grupo tratado con el compuesto de factor de transferencia más concentrado, sugiriendo que, como se ha visto en estudios anteriores con Echinacea y otros componentes inmunomoduladores el efecto de los mismos depende de la dosis (Allen, 2003; Frieier et al., 2003; Landy et al., 2011).

En cuanto a la reacción humoral originada como respuesta a la inyección de LPS, se aprecia un aumento de anticuerpos en todos los grupos durante los 5 días siguientes a

la inyección. Y aunque los análisis estadísticos no indican diferencias significativas entre los diferentes grupos se aprecia que el aumento de anticuerpos fue mayor en los grupos tratados con inmunomoduladores que en el grupo control. La falta de significancia de estos resultados puede deberse a una falta de individuos en esta parte del estudio ya que el número de individuos tratados y muestreados en los intervalos señalados se redujo a la mitad. De hecho en estudios que obtienen resultados significativos mediante este tipo de tratamientos se emplea un mayor número de animales (Parmentier et al., 1998) lo cual en el marco del presente estudio no fue posible por razones logísticas.

Se han realizado diferentes estudios para valorar la eficacia de la echinacea como inmunomodulador en animales. Landy et al., (2011), llevan a cabo un experimento en el que miden la cantidad de anticuerpos mediante pruebas serológicas en grupos a los que les han administrado Echinacea en diferentes dosis e intervalos de tiempo y los comparan con un grupo control y otro al que le administran un antibiótico promotor de crecimiento. En la mayoría de los casos la cantidad de anticuerpos es mayor en los grupos tratados con Echinacea. Y concluyen que la Echinacea tiene la capacidad de aumentar la respuesta inmune humoral lo cual concuerda con la tendencia observada en nuestro estudio. Gharieb y Youssef, (2014), concluyen igualmente que la Echinacea es un inmunoestimulante eficaz. En nuestro caso no se encontraron diferencias significativas respecto a los otros grupos pero si se vio un aumento en la cantidad de anticuerpos después de la inyección de LPS mayor que en el grupo control, lo cual sugiere una actividad inmunoestimulante por parte de la Echinacea.

Los resultados de nuestro estudio en cuanto a la utilidad de los inmunomoduladores testados no son conclusivos aunque apuntan a un efecto beneficioso de los mismos. La falta de efecto fisiológico y de significancia en los resultados de inmunidad humoral y celular pueden deberse en parte al diseño experimental del estudio, como el reducido número de animales incluidos en el experimento como consecuencia de las limitaciones económicas y logísticas de nuestro proyecto. Un mayor número de animales habría implicado un gasto mucho mayor en cuanto a la alimentación y por supuesto, en cuanto a los productos con los que fueron tratados dichos animales, en especial los productos basados en factores de transferencia.

Los resultados observados en el reto a la inmunidad celular sugieren un efecto de la dosis del inmunomodulador. No existen datos sobre la relación dosis-efecto en el uso de los factores de transferencia, mientras que si los hay en el caso de Echinacea, indicando importantes efectos de la dosis y la frecuencia de aplicación sobre sus efectos (Landy et al., 2011) esto implica que en un estudio más amplio con grupos con diferentes pautas de administración de los inmunomoduladores potencialmente se podrían haber obtenido otros resultados.

Por otra parte, los resultados obtenidos como respuesta a la simulación de la infección por LPS se han podido ver afectados por infecciones secundarias presentes en los animales, dado que se trata de un antígeno de una bacteria que con frecuencia infecta a aves en situación de granja y que nuestro estudio no se realizó en instalaciones experimentales libres de patógenos.

Debido a limitaciones en el tiempo algunos análisis de las muestras obtenidas de las aves siguen pendientes, como son bioquímica sanguínea, marcadores de estrés oxidativo, el recuento estimado de leucocitos en los frotis sanguíneos así como el estudio histopatológico de los tejidos recogidos al final del experimento.

5. Conclusiones

- 1- En el diseño experimental empleado en el presente estudio el uso de los inmunomoduladores Echinacea y productos basados en factores de transferencia no tiene efectos detectables sobre la conversión de alimento o la productividad de las hembras de codorniz europea.
- 2- El tratamiento oral prolongado con inmunomoduladores basados en factores de transferencia parece modular a la baja la respuesta inmune celular de la codorniz europea siendo este efecto dependiente de la dosis de factor de transferencia.

- 3- El tratamiento oral prolongado con inmunomoduladores basado en *Echinacea* parece modular a la baja la respuesta inmune celular mientras incrementa la respuesta humoral de la codorniz europea.
- 4- Para poder determinar la efectividad y utilidad de los inmunomoduladores evaluados serán necesarios experimentos más amplios con más animales y empleando un rango de dosis y pautas de administración de los inmunomoduladores.

6. Bibliografía

- Ablashi DV, Levine PH, De Vinci C, Whitman JE Jr, Pizza G, Viza D: **Use of anti HHV-6 transfer factor for the treatment of two patients with chronic fatigue syndrome (CFS). Two case reports.** *Biotherapy* 1996, 9(1-3): 81-86.
- Akhtar MS, Nasir Z, Abid AR: **Effect of feeding powdered *Nigella sativa* L. seeds on poultry egg production and their suitability for human consumption.** *Veterinarski Arhiv* 2003, 73: 181-190.
- Allen PC: **Dietary supplementation with *Echinacea* and development of immunity to challenge infection with coccidian.** *Parasitol. Res.* 2003, 91: 74-78.
- Arczewska-Włosek A, Świątkiewicz S: **The effect of a dietary herbal extract blend on the performance of broilers challenged with *Eimeria* oocysts.** *Journal of Animal and Feed Sciences* 2012, 21: 133-142.

Barrett B: **Medicinal properties of *Echinacea*: A critical review**. Phytomed 2003, 10:
66-86.

Bauer R: **Chemistry, analysis and immunological investigations of *Echinacea*
phytopharmaceuticals**. En: Wagner H (eds) Immunomodulatory agents from
plants, Birkhauser Verlag publisher, Berlin; 1999: 41-48.

Böhmer MB, Salisch H, Paulicks BR, Roth FX: ***Echinacea purpurea* as a potential
immunostimulatory feed additive in laying hens and fattening pigs by
intermittent application**. Livest. Sci. 2009, 122: 81-85.

Borkowsky W, Lawrence HS: **Deletion of antigen-specific activity from leukocyte
dialysates containing transfer factor by antigen-coated polystyrene**. J. Immunol
1981, 126: 486-489.

Burger DR, Vandembark AA, Finke P, Vetto RM: **De novo appearance of KLH transfer
factor following immunization**. Cell Immunol 1977, 29: 410-413.

Campbell TW: **Avian hematology and Cytology**. Ames, Iowa State University Press,
1988.

Cooper MD, Peterson RDA, South MA, Good RA: **The functions of the thymus system
and bursa system in the chicken**. J. Exp. Med. 1996, 75-106.

De Vinci C, Pizza G, Cuzzocrea D, Menniti D, Aiello E, Maver P, Corrado G, Romagnoli P, Dragoni E, LoConte G, Riolo U, Masi M, Severini G, Fornarola V, Viza D: **Use of transfer factor for the treatment of recurrent non-bacterial female cystitis (NBRC): A preliminary report.** *Biotherapy* 1996, 9(1-3): 133-138.

Dohms JE, Saif YM: **Criteria for evaluation of immunosuppression.** *Avian Dis* 1983, 28:305–310.

Fletcher OJ, Barnes HJ: **Lymphoid organs and their anatomical distribution.** En: Pastoret, P. P., Bazin, H., Govererts, A. and Griebel, P. J. (eds) *Handbook of Vertebrate Immunology*, Academic Press (in press); 1997.

Freeman BM: 1987. **The stress syndrome.** *World's Poultry Sci. J* 1987, 43:15-19.

Frieier D, Wright K, Klein K, Voll D, Dabiri K, Cosulich K, George R: **Enhancement of the humoral immune response by *Echinacea purpurea* in female Swiss mice.** *Immunopharmacol. Immunotoxicol* 2003, 25: 551-560.

García-Hernández M, Guerrero-Ramírez G, de los Ángeles M: **Inmunomoduladores como terapia adyuvante en la enfermedad infecciosa.** ELSEVIER-. *Medicina Universitaria* 2009, 11(45): 247-259.

Gharieb MM, Youssef FM: **Effect of *Echinacea purpurea* and garlic on growth**

performance, immune response, biochemical and hematological parameters in broiler chicks. Assiut Vet. Med.J. 2014, 60(140); pp 11.

Glick B: **Avian Immunophysiology.** En: G.Causey Whittow (Ed.): Avian physiology, 5th edition. Academic Press Inc., Londres. Reino Unido 2000., 657 670.

Gross WB, Siegel PB: **Socialization as a factor in resistance to infection, feed efficiency, and response to antigen in chickens.** American Journal of Veterinary Research 1982, 43(11): 2010-2012.

Heredia O, Olger R: **Utilización de Diferentes Niveles de Promotor de Crecimiento**

Natural Hibotek en la Cría, Desarrollo y Levante de codornices y su Efecto hasta Alcanzar el Pico de Producción. 2013.

Huff GR, Huff WE, Balog JM, Rath NC, Anthony NB, Nestor KE: **Stress response**

differences and disease susceptibility reflected by heterophil to lymphocyte ratio in turkeys selected for increased body weight. Poult. Sci. 2005, 84:709-717.

Huff G, Huff W, Rath N, Balog J, Anthony NB, Nestor K: **Stress-induced colibacillosis**

and turkey osteomyelitis complex in turkeys selected for increased body weight. Poult. Sci 2006, 85:266-272.

Klasing KC: **The costs of immunity**. Curr. Zool. 2004, 50: 961-969.

Ketlinskii SA, Simbirtsev AS, Vorobiev A A: **Endogenous Immunomodulators**. Russian, St. 1992.

Koreleski J, Świątkiewicz S: **Effect of coneflower, thyme and sage extracts in the diet on changes in chicken white meat quality during storage**. Pol.J. Food Nutr. Sci. 2007, 57(4B): 303-307.

Landy N, Ghalamkari GH, Toghyani M, Moattar F: **The effects of *Echinacea purpurea* L. (purple coneflower) as an antibiotic growth promoter substitution on performance, carcass characteristics and humoral immune response in broiler chickens**. Journal of Medicinal Plants Research 2011, 5(11): 2332-2338.

Lawrence HS: **Transfer factor**. Adv. Immunol 1969, 11: 195.

Lawrence HS: **Transfer factor in cellular immunity**. The Harvey Lectures, Series 1974, 68: 239–350.

Lee KW, Everts H, Kappert HJ, Frehner M, Losa R, Beynen AC: **Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens**. Brit. Poultry Sci 2003, 44: 450-457.

Lin H, Sui SJ, Jiao HC, Buyse J, Decuyper E: **Impaired development of broiler chickens**

by stress mimicked by corticosterone exposure. Comp. Biochem. Physiol 2006, 143:400-405.

Maass N, Bauer J, Paulicks BR, Bohmer BM, Rothmaier DR: **Efficiency of *Echinacea***

***purpurea* on performance and immune status in pigs.** J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 2005, 89: 244-252.

Martin LBI, Han P, Lewittes J, Kuhlman JR, Klasing KC, Wikelski M:

Phytohemagglutinin-induced skin swelling in birds: histological support for a classic immunoecological technique. Funct. Ecol. 2006, 20: 290-299.

Mehlhorn H, Düwell D, Raether W: **Atlas de Parasitología Veterinaria.** GRASS,

Madrid, Spain. 1992.

Muneer MA, Farah IO, Newman JA, Goyal SM: **Immunosuppression in animals:**

review. Departments of Veterinary Pathobiology and Veterinary Diagnostic Investigation, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, St. Paul, MN 55108, USA/Br. vet . 1. 1988, 144: 288.

Nasir Z, Grashorn MA: **Use of Black cumin (*Nigella sativa*) as alternative to antibiotics**

in poultry diets. 9th Tagung Schweine-und Geflügelernährung, Halle (Saale), Germany 2006, pp. 210-213.

Nasir Z, Grashorn MA: **Effects of *Echinacea purpurea* and *Nigella sativa***

supplementation on broiler performance, carcass and meat quality. Journal of Animal and Feed Sciences 2010, 19: 94-104.

Parmentier HK, Walraven M, Nieuwland MGB: **Antibody Responses and Body Weights of Chicken Lines Selected for High and Low Humoral Responsiveness to Sheep Red Blood Cells. 1. Effect of Escherichia coli Lipopolysaccharide.** Poultry Science 1998, 77:248-255.

Peig J, Green AJ: New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. Oikos 2009, 118(12): 1883-1891.

PIDDOCK L J: **Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy?** Journal of Antimicrobial Chemotherapy 1996, 38(1): 1-3.

Pilo B, Etches RJ, George JC: **Effects of corticosterone infusion on the lipogenic activity and ultrastructure of the liver of laying hens.** Cytobios 1985, 44:273-285.

- Post J, Rebel JM, ter Huurne AA: **Physiological effect of elevated plasma corticosterone concentrations in broiler chickens. An alternative means by which to assess the physiological effects of stress.** Poult. Sci. 2003, 82:1313-1318.
- Puvadolpirod S, Thaxton JP: **Model of physiological stress in chickens. 1. Response parameters.** Poult. Sci. 2000 79:363-369.
- Roth-Maier DA, Böhmer BM, Maass N, Damme K, Paulicks BR: **Efficiency of Echinacea purpurea on performance of broilers and layers.** Arch. Geflügelk 2005, 69: 123-127
- Rozzo SJ, Kirkpatrick CH: **Purification of transfer factors.** Molec. Immunol. 1992, 29: 167-182.
- Schranner I, Wurdinger M, Klumpp N, Losche U, Okpanyi SN: **Influence of medicinal complex drug (Influx) and *Echinacea angustifolia* extract on avian humoral immune reactions.** J. Vet. Med. B 1989, 36: 353-364.
- Shini S, Kaiser P, Shini A, Bryden WL: **Biological response of chickens exposed to corticosterone and a bacterial endotoxin.** Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol. 2008a, 149:324-333.

Shini S, Kaiser P, Shini A, Bryden WL: **Differential alterations in ultrastructural morphology of chicken heterophils and lymphocytes induced by corticosterone and lipopolysaccharide.** Vet. Immunol. Immunopathol. 2008b, 122: 83-93.

Shini S, Huff GR, Shini A, Kaiser P: **Understanding stress-induced immunosuppression: exploration of cytokine and chemokine gene profiles in chicken peripheral leukocytes.** Poult. Sci. 2010, 89(4): 841-851.

Shini S, Stewart GD, Bryden WL: **Biological cost of stress and its measurement in laying hens.** Page 166 in Proceedings of the 16th Australian Poultry Science Symposium. R. A. E. Pym, ed. University of Sydney, Australia; 2004.

Siegel HS: **Cold-induced necrosis in toes of chicks receiving daily dosages of adrenocorticotropin.** Gen. Comp. Endocrinol. 1971, 16: 281-287.

Smits JE, Bortolotti GR, Tella JL: **Simplifying the phytohaemagglutinin skin-testing technique in studies of avian immunocompetence.** Functional Ecology 1999, 13: 567-572.

Takx-Kohlen BC: **Immunomodulators. Future prospects.** Pharm Weekbl Sci. 1992, 14: 24-52.

Thaxton JP, Tung HT, Hamilton PB: **Immunosuppression in chickens by aflatoxin.**

Poult. Sci. 1974, 53: 721-725.

Toghyani M, Tohidi M, Gheisari AA, Tabeidian SA: **Performance, immunity, serum**

biochemical and hematological parameters in broiler chicks fed dietary thyme as alternative for an antibiotic growth promoter. Afr. J. Biotechnol. 2010a, 9: 6819-6825.

Toghyani M, Toghyani M, Gheisari AA, Ghalamkari Gh, Eghbalsaied Sh: **Evaluation of**

cinnamon and garlic as antibiotic growth promoter substitutions on performance, immune responses, serum biochemical and haematological parameters in broiler chicks. doi:10.1016/j.livsci.2010.12.018, in press; 2011.

Toomey MB, Butler MW, McGraw KJ: (2010). **Immune-system activation depletes**

retinal carotenoids in house finches (*Carpodacus mexicanus*). The Journal of Experimental Biology 2010, 213: 1709-1716.

Torres C, Zarazaga M: **Antibiotics as growth promoters in animals: Are we going**

down the right road?. Gaceta Sanitaria 2002, 16(2): 109-112.

Vanselón BA. **La aplicación de adyuvantes a la medicina Veterinaria.** Veterinary Bull

1989, 37(11): 881-893.

Viriden WS, Thaxton JP, Corzo A, Dozier III WA, Kidd MT: **Evaluation of models using corticosterone and adrenocorticotropin to induce conditions mimicking physiological stress in commercial broilers.** Poult. Sci. 2007, 86:2485-2491.

Vorobiev AA, Telmaikh V, Khalturina MD, Khalturina EO, Kisielevsky MV, Karbuisheva NV, Granitov VM, Khabarov AS, Kipriyanov DV, Raiu NI, Sultanov LV, Dadali VA, Rak AV, Stopnyik ES, Oganova E, McCausland MD, McCausland CW, Letifov GM: **Transfer Factors Use in Immunorehabilitation After Infectious-Inflammatory and Somatic Diseases: Methodological letter.** Center of MicroNutrientology, Moscow, Russian Federation 2005, pp. 27.

Wagnerová J, Ferencík M: **Secretory and regulatory products of macrophages in the immune and inflammatory reactions.** Biol Bratislav 1993; 48(6):709-17.

Wakenell PS: **The Function of the Avian Immune System.** Proc. Avian Specialty Advanced Program, AAV Conf, 1999; 9. Systems: The Avian Immune System.

Windisch W, Schedle K, Plitzner C, Kroismayr A: **Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry.** Journal of Animal Science 2008, 86(14) suppl E1 40-48.

Witte W: **Medical consequences of antibiotic use in agriculture.** Science 1998, Feb 13; 279 (53):996–997.

