

بررسی تأثیر تجویز خوراکی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر ارتشاح زیرگروه های لنفوسیت های T در اعضاء لنفاوی جوجه به عنوان مدل آزمایشگاهی

فاطمه عسگری^۱، رضا فلک^۱، محمدعلی بهار^۱، زهرا مجد^۲، میترا حیدری نصرآبادی^۵، سمیه دشتی^۶، مهدی شکرابی^{۳*}

۱- دانشجو کارشناسی ارشد گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

۲- دانشیار گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

۳- دانشیار گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

۴- استادیار گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

۵- دانشیار گروه بیولوژی، دانشگاه آزاداسلامی واحد پرند، پرند، ایران

۶- کارشناس ارشد فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

چکیده

سابقه و هدف: امروزه اثرات سودمند پروبیوتیک ها بر میزبان به خوبی مشخص شده است با این وجود، مکانیسم عملکرد آن به خوبی شناخته نشده و از این رو تحقیقات بسیاری پیرامون آن از جمله در زمینه سیستم ایمنی در حال انجام است. این مطالعه به منظور بررسی اثر باکتری های لاکتیک اسید بر رده های سلولی T در بافت های ایلئوم، لوزه سکوم و بورس فابریسیوس در جوجه، انجام شده است.

مواد و روش ها: تعداد سی قطعه جوجه در سه گروه مختلف رژیم غذایی تقسیم شدند که شامل گروه دریافت کننده شیر استریل، گروه دریافت کننده پروبیوتیک در شیر استریل و گروه کنترل بودند. هر کدام از گروه ها به دو زیرگروه تقسیم شدند و نمونه بافت در دو دوره زمانی ۱۴ و ۲۱ روزه برداشت شد. برش های بافتی از سه بافت ایلئوم، لوزه سکوم و بورس فابریسیوس تهیه و تعداد سلول های رده T شامل سلول های CD۴⁺، CD۸⁺ و Tγδ⁺ با رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: تعداد سلول های CD۴⁺ ناحیه ایلئوم در جوجه های دریافت کننده پروبیوتیک بعد از مدت زمان دو هفته، افزایش معنی داری نسبت به گروه کنترل داشت. در لوزه سکوم، گروه دریافت کننده شیر استریل به مدت سه هفته، افزایش معنی داری را در تعداد سلول های Tγδ⁺ نشان دادند.

نتیجه گیری: یافته های این مطالعه نشان می دهند که تغذیه حیوان با پروبیوتیک ممکن است توزیع سلول های T را تحت تأثیر قرار دهد. با این وجود از آنجایی که تغییرهای دیده شده در گروه پروبیوتیک در ۱۴ روز بوده است، می توان بیان کرد که این تأثیرات گذرا بوده و اثر دائمی بر ایمنی حیوان نداشته است.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، لنفوسیت T، جوجه، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

مقدمه

مقادیر مناسب مصرف شوند اثرات سودمندی بر سلامت میزبان دارند (۶، ۸). مصرف خوراکی پروبیوتیک اثرات بسیاری بر ایمنی ناحیه ای و سیستمیک دارد (۱۴). اگرچه امروزه به خوبی مشخص شده که گونه میکروبی روده اثرهای سودمند بر میزبان دارد اما مکانیسم عملکرد آن به خوبی شناخته نشده است. گونه میکروبی روده به طور مکرر با بسیاری از سلول ها مانند لنفوسیت های T و B و یا سلول های عرضه کننده آنتی ژن و لنفوسیت های داخل

پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های زنده ای هستند که وقتی در

نویسنده مسئول :

دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

ایمیل : asgari.f85@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۹/۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۰۴

MRS برات (de Man, Rogosa, Sharpe) (catalog no.) Merck (۱.۱۰۶۶۱)، اضافه و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه، کشت داده شد. سپس، $100 \mu\text{l}$ از کشت به 10 ml از محیط جدید منتقل و دوباره به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد. پس از ۱۶ ساعت توسط دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب نوری کشت باکتری خوانده شد. به منظور اطمینان از میزان باکتری مورد نظر (10^6 cfu/ml)، سریال رقت و شمارش کلنی در محیط کشت جامد صورت گرفت. با بررسی های صورت گرفته مشخص شد که بعد از ۱۶ ساعت انکوباسیون، میزان باکتری موجود در محیط کشت برابر با 10^6 cfu/ml می باشد. در زمان گاوآژ، کشت حاوی باکتری ۳ بار با PBS استریل با دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شسته شده و غلظت 10^6 cfu/ml مجدد با اسپکتروفتومتر تأیید گردید. مقادیر متفاوت از سوسپانسیون پروبیوتیک، با توجه به وزن حیوان در روزهای مختلف، به منظور ایجاد غلظت مورد نظر 10^6 cfu/ml/Kg وزن حیوان، جهت گاوآژ دهانی در ۰/۵ سی سی شیر استریل رقیق شد.

جمع آوری نمونه

در روزهای مقرر ۱۴ و ۲۱ بعد از hatching، حیوان توسط فرد مجرب به روش دکیتاسیون آماده برداشت بافت شد (۱۲). سپس با استفاده از اسکالپل حفره شکمی باز شده و لوله گوارشی خارج گردید. با توجه به محل صحیح بافت های مورد نظر، برش های لازم صورت گرفته و بورس فابریسیوس و ایلئوم و ناحیه لوزه سکوم جدا گردید.

ایمونوهیستوشیمی

سه حیوان از پنج حیوان موجود در هر گروه مورد بررسی قرار گرفتند. بافت های ایلئوم، لوزه سکوم و بورس فابریسیوس بلافاصله بعد از جداسازی فریز شدند. برش ها به اندازه $10 \mu\text{m}$ بر روی اسلاید های پوشانده شده با پلی-ال-لیزین چسبانده و تا زمان رنگ آمیزی در فریزر -20°C درجه نگهداری شدند. پس از فیکساسیون با استن، اسلاید ها به مدت ۱۰ دقیقه تحت 0.3% $\text{H}_2\text{O}_2/\text{PBS}$ قرار گرفتند. سپس شسته شده و به مدت ۱۵ دقیقه با 5% goat serum در دمای اتاق بلوکه شدند. بعد از شست شو، با آنتی بادی اولیه مورد نظر خریداری شده از شرکت Abcam (شامل mouse anti-chicken CD4 antibody (ab25346)، mouse anti-chicken CD8 alpha antibody (ab25345) و یا mouse Anti-TCR gamma TCR delta antibody (ab25347)) در رقت ۱:۲۰ به مدت ۱ ساعت در 4°C درجه انکوبه شدند و سپس انکوباسیون

اپیتلیالی در بافت لنفاوی مرتبط با مخاط، در تماس می باشند (۱۱). با وجود تفاوت های موجود، از بسیاری جهات ایمنی اکتسابی در طیور مشابه پستانداران و انسان است (۵). در جوجه، لنفوسیت های B و T موجود در GALT (Gut-associated lymphoid tissue)، در طول دو هفته اول زندگی عملکرد بالغ را پیدا می کنند (۲). در طیور و پستانداران، باکتری های لاکتیک اسید به طور نرمال ساکن روده کوچک و بزرگ هستند (۳). خیلی از مطالعه ها به بررسی پاسخ میزبان به (Lactic Acid Bacteria) LAB به عنوان یکی از شایع ترین پروبیوتیک ها پرداخته اند. نشان داده شده است که پروبیوتیک های LAB ایمنی را در جوجه شامل پاسخ ایمنی، ایمنی مخاطی روده ای و تغییرها در ژن های درگیر در پاسخ ایمنی، تحت تأثیر قرار داده اند (۷). با وجود تمایل بسیاری که امروزه در استفاده از پروبیوتیک ها به عنوان یک منبع تغذیه ای وجود دارد، اطلاعات کمی در ارتباط با پاسخ ایمنی سلولی موضعی به آن ها وجود دارد. در مطالعه حاضر، اثرهای LAB در جوجه به عنوان مدلی که می توان اطلاعات حاصل از آن را در صنعت طیور به کار برد و هم چنین به جهت بررسی کلی مکانیسم عمل پروبیوتیک، مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

تعداد ۳۰ قطعه جوجه یک روزه گوشتی نژاد Ross که سلامت آن ها تأیید شده و هیچ گونه واکسن و دارو مصرف نکرده بودند از شرکت مرغ ساکت خریداری شدند. قبل از استقرار حیوان، تمام قفسه ها، ظروف غذا و آب تمیز شدند. غذای تجاری معمول به صورت پودر به همراه آب به صورت آزادانه در دسترسی حیوان قرار گرفت. جوجه ها در ۲ دسته ۱۵ تایی (دسته ۱۴ روزه و دسته ۲۱ روزه) قرار گرفتند و هر دسته به ۳ گروه ۵ تایی با رژیم غذایی متفاوت طبقه بندی شد: رژیم غذایی عادی، رژیم غذایی همراه با شیر استریل، رژیم غذایی عادی به همراه مخلوط شیر استریل و پروبیوتیک لاکتوباسیل اسیدوفیلوس LA5 به میزان 10^6 cfu/ml/Kg وزن بدن حیوان. حیوانات در مرکز نگه داری حیوانات در اتاق جدا با شرایط مناسب رشد جوجه از نظر دما و رطوبت، قرار گرفتند. پژوهش بر اساس استانداردهای کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام و در تمامی مراحل کار نکات اخلاقی در مطالعه بر روی حیوانات، رعایت گردیده است.

کشت پروبیوتیک

در این مطالعه، $100 \mu\text{L}$ از سوسپانسیون حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA5 به 10 mL از محیط اختصاصی باکتری،

به مدت ۳۰ دقیقه با آنتی بادی ثانویه Goat anti-Mouse (HRP) (IgG1) (ab98693) (secondary antibody) با رقت ۱:۲۵۰ صورت گرفت. اسلایدها مجدد شسته شده و جهت آشکارسازی، سوبسترای دی آمینو بنزیدین (DAB) اضافه گردید. در اسلاید کنترل منفی به جای آنتی بادی اولیه از نرمال سالین استفاده شد. رنگ هماتوکسیلین به منظور رنگ زمینه استفاده گردید و در نهایت پس از مراحل دهیدراتاسیون، لامل روی اسلایدها چسبانده شد.

آنالیز تصویر

اسلاید های حاصل از رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی با بزرگنمایی ۲۰ مورد بررسی قرار گرفتند (۱۵). از هر لام بافتی ایلنوم، لوزه سکوم و بورس فابریسیوس ۵ فیلد میکروسکوپی عکس برداری شد. شمارش سلولی توسط نرم افزار Olysia صورت گرفت و تعداد سلول های مثبت از نظر مارکر مربوطه در سطحی برابر با $320 \times 240 \mu m$ شمارش شدند. داده های به دست آمده از این پژوهش توسط نرم افزار SPSS با استفاده از آزمون ANOVA مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به صورت $mean \pm SD$ اعلام شدند.

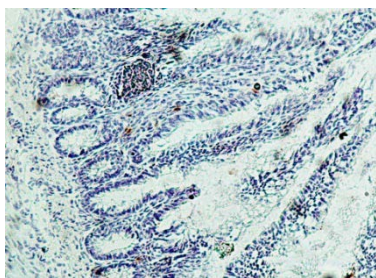
نتایج

بر طبق نتایج حاصله از رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی در ایلنوم، در ارتباط با مقادیر سلول های $CD4+$ ، گروه پروبیوتیک ۱۴ روزه (۸۷/۳) در مقایسه با کنترل (۳۹/۵) و هم چنین در مقایسه با گروه لبنی (۴۶/۳) افزایش معنی داری را نشان دادند (به ترتیب $p=0/002$ و $p=0/005$). در مقایسه بین دو گروه سنی، تعداد سلول های $CD4+$ در گروه کنترل، در ۲۱ روز بیشتر بود ($p=0/04$)، اما در گروه پروبیوتیک، مقادیر در ۱۴ روز بیشتر بودند ($P=0/007$). تفاوت آماری معنی داری در بررسی ایلنوم در ارتباط با سلول های $CD8+$ و $T\gamma\delta$ دیده نشد.

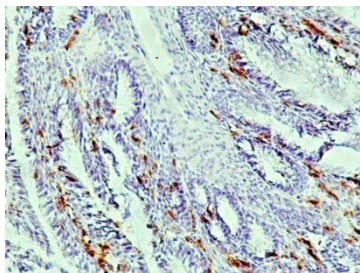
در لوزه سکوم، افزایش معنی دار مقادیر سلول های $T\gamma\delta+$ در گروه مصرف کننده شیر استریل ۲۱ روزه در مقایسه با هر دو گروه پروبیوتیک و کنترل ($p=0/02$) دیده شد. در مقایسه بین دو گروه سنی، مقادیر تمامی سلول های $CD4+$ ، $CD8+$ و $T\gamma\delta+$ به طور معنی داری در ۱۴ روز بیشتر بود.

از آنجایی که مقادیر سلول های T در بورس فابریسیوس بسیار ناچیز است، اگرچه تغییرات به صورت میکروسکوپی مشاهده شدند، به منظور اجتناب از نتایج کاذب، آنالیز آماری در مورد این بافت صورت نگرفت.

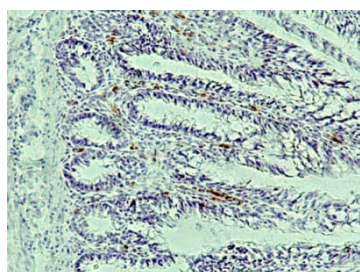
a. 1



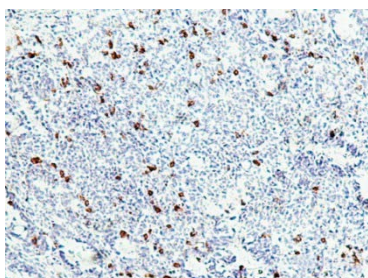
b. 1



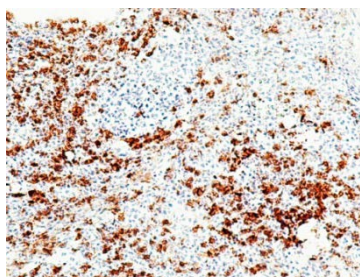
c. 1



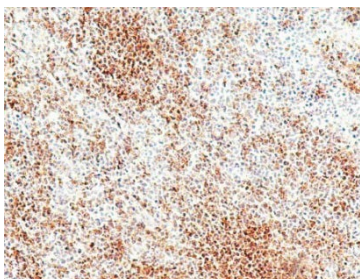
d. 1



e. 1



f. 1



آزمون ANOVA و در ادامه Post Hoc، مورد بررسی قرار گرفت. به منظور مقایسه گروه های مختلف سنی با یکدیگر آزمون two-tailed t-test انجام گرفت.

تغییرات میانگین در مقایسه با گروه کنترل از نظر آماری معنی دار است ($P < 0.05$)

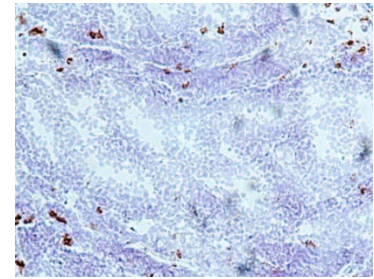
تغییرات آماری معنی دار میان دو گروه مصرف کننده شیر و مصرف کنند ده پروبیوتیک ($P < 0.05$)

تغییرات آماری معنی دار بین دو گروه سنی مختلف

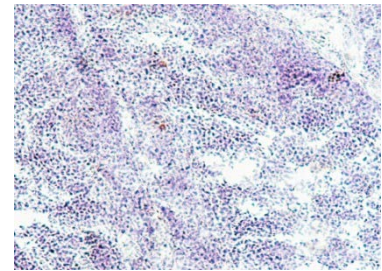
بحث

در طول دهه گذشته، مطالعات بسیاری در زمینه اثرات مفید پروبیوتیک ها به خصوص اثر های آن ها بر روی سیستم ایمنی به ویژه ایمنی ذاتی و همورال صورت گرفته است. سلول های T و سایتوکاین های آن ها نقش مهمی بر روی دیگر سلول های سیستم ایمنی از جمله ماکروفاژها و سلول های B، از طریق ایجاد یک شبکه سیگنالی، می گذارند(۱). به این منظور در این مطالعه، توجه بر اثرهای پروبیوتیک روی تغییرهای سلول های $CD4+$ ، $CD8+$ و $T\gamma\delta+$ متمرکز شد. در این مطالعه تعداد زیر رده های سلول های T در بافت های ایمنی گاسترو اینتستینال، با استفاده از رنگ آمیزی ایمنو هیستوشیمی، مورد بررسی قرار گرفت. از آنجائی که اکثر پروبیوتیک های تجاری به صورت افزودنی خوراکی در لبنیات استفاده می شوند، در این پژوهش پروبیوتیک به صورت مخلوط در شیر استریل خوراندن شد و اثرهای آن بعد از مدت زمان دو هفته یعنی زمانی که سیستم ایمنی ناحیه ای حیوان کامل می شود، مورد بررسی قرار گرفت. در لوزه سکوم سلول های $CD4+$ بعد از ۱۴ و ۲۱ روز مطالعه تغییری را نشان ندادند در حالی که، در ایلئوم پس از مدت زمان ۱۴ روز افزایش معنی دار سلول های $CD4+$ در گروه پروبیوتیک در مقایسه با دو گروه کنترل و مصرف کننده شیر دیده شد. Noujaim و همکارانش در سال ۲۰۰۷ گزارش کردند که در جوجه های دریافت کننده مخلوط لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتو باسیلوس روتری، مقادیر سلول های $CD4+$ در ژوژنوم، دئودنوم و سکوم، افزایش نشان داد(۹). به نظر می رسد که ایلئوم بافت حساس تری به پروبیوتیک بوده و پاسخ در آن سریع تر دیده می شود به طوری که چند روز پس از مصرف پروبیوتیک سلول های $CD4+$ در این ناحیه فعال شده و در ۱۴ روز به حداکثر میزان خود می رسد که پس از آن به ارگان های دیگر مهاجرت می کند. در سال ۲۰۱۰ Cheng و همکارانش گزارش کردند که موش های دریافت کننده لاکتو باسیلوس پاراکازئی به

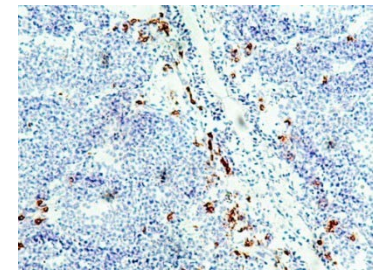
h. 1



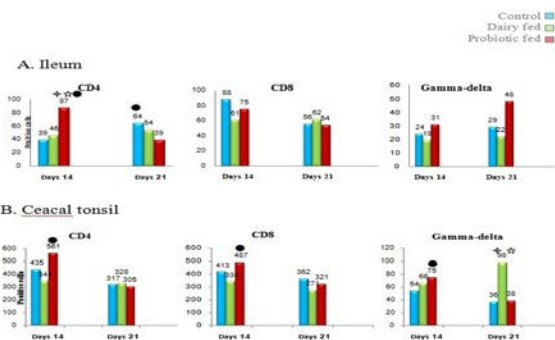
g. 1



i. 1



شکل-۱- لنفوسیت های $CD4+$ ، $CD8+$ و $T\gamma\delta+$ در سه بافت مختلف در جوجه. نقاط تیره رنگ نشان دهنده سلول های مثبت از نظر مارکر مربوطه می باشند. لنفوسیت های $CD4+$ ، $CD8+$ و $T\gamma\delta+$ در ناحیه ایلئوم (شکل های a، b و c به ترتیب)، در لوزه سکوم (شکل های d، e و f به ترتیب) و در بورس فابریسیوس (شکل های g، h و ا به ترتیب) نشان داده شده اند. رنگ زمینه همتوکسیلی-آنوزین، بزرگمایی ۲۰



نمودار-۱-مقادیر زیرگروه های لنفوسیتی در ناحیه ایلئوم (A)، و لوزه سکوم (B) در گروه های مورد مطالعه در دو دوره سنی ۱۴ و ۲۱ روز. پنج فیلد میکروسکوپی با عدسی ۲۰ از هر برش بافتی به طور تصادفی انتخاب شد و در ناحیه ای به مساحت $240 \mu m \times 320 \mu m$ سلول های مثبت از نظر مارکر مربوطه، شمارش شدند. نتایج حاصل از هر گروه در دوره سنی مشابه، توسط

جهت تقویت ایمنی بهره مند شد و هم چنین آن ها را به عنوان جایگزینی برای آنتی بیوتیک ها در نظر گرفت. از طرفی از این پروبیوتیک می توان به منظور افزایش بازده، در صنعت طیور استفاده کرد.

محدودیت های پژوهش

با توجه به ماهیت تست ایمونو هیستوشیمی، به منظور به دست آوردن اطلاعات مدون و کمی می توان از آزمون هایی مانند Real-time PCR به منظور بررسی تغییرها بهره گرفت که در این صورت ارزش داده های حاصل از پژوهش بیشتر خواهد بود.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی طرح تحقیقاتی به شماره ۱۵۰۷۵ معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است که به این وسیله از حمایت کنندگان قدردانی می گردد.

مدت ۳ تا ۴ هفته، افزایش معنی دار سلول های $TCD4+$ را در پلاک پیر نشان دادند(۱۶). از آنجایی که در جوجه اکثریت سلول های $CD4+$ سلول های T کمی بوده و کمتر از ۳٪ سلول های T موجود در گاسترو اینتستینال جوجه دارای فنوتیپ تنظیمی $CD4+CD25+$ می باشند، به احتمال قوی، سلول های مشاهده شده در ایلئوم تنظیمی نبوده اند. سلول های $CD8+$ در گروه های مورد مطالعه تغییر معنی داری را نشان ندادند. Olivares و همکارانش در ۲۰۱۰، گزارش کردند که در داوطلبان دریافت کننده لاکتوباسیلوس کورینی فورمیس و لاکتو باسیلوس گاسری، مقادیر سلول های $TCD8+$ افزایش یافت(۱۰). در سال ۲۰۰۹ Scharek مشاهده کرد که خوراندن انتروکوکوس فاسیوم به خوک به مدت ۳۵ روز سبب کاهش مقادیر سلول های $CD8+$ در کولون شد(۱۳). در حالی که Galdeano و همکارانش در پژوهش خود بر روی BALB/c تغییر را پس از مصرف لاکتو باسیلوس کارژی مشاهده نکردند(۱۴). بر طبق نتایج حاصل در این مطالعه، به نظر می رسد که اگر تغییری در ارتشاح سلول های $CD8+$ مخاطی صورت گرفته باشد، احتمالاً گذرا بوده و خیلی زود قبل از ۱۴ روز اتفاق می افتد که این فرض با مطالعه ای که توسط Noujaim و همکارانش در ۲۰۰۹ هم خوانی دارد که تغییرات در سلول های $CD8+$ را دو روز پس از تجویز مخلوط لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس روتری، در جوجه مشاهده کردند(۹). در مطالعه انجام شده، مقادیر سلول های $T\gamma\delta+$ در لوزه سکوم جوجه های دریافت کننده شیر استریل افزایش معنی داری را نشان داد. شیر استریل حاوی محصول های باکتریایی و گلیکوپروتئین ها می باشد که می توانند از طریق مسیر $CD1$ به سلول های $T\gamma\delta+$ عرضه شوند که تغییرات دیده شده در لوزه سکوم می تواند به این علت باشد.

در مقایسه نتایج حاصل بین دو گروه سنی ۱۴ و ۲۱ روزه، با توجه به افزایش مقادیر هر سه نوع لنفوسیت مورد مطالعه در ۱۴ روز در مقایسه با ۲۱ روز به نظر می رسد که در لوزه سکوم تغییرات سریع اتفاق افتاده و گذرا می باشد.

نتیجه گیری

به نظر می رسد که پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس علاوه بر تأثیرهایی که در روند ایمنی ذاتی و افزایش آنتی بادی های مخاطی دارد اثرهای تقویت کننده در ایمنی سلولی نیز داشته باشد لذا با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش که تابیدی بر نتایج دیگر پژوهش ها در جنبه اثرهای سودمند پروبیوتیک ها بر سیستم ایمنی می باشد، می توان با تعمیم دادن مدل حیوانی به انسان، از پروبیوتیک ها در رژیم غذایی به منظور عاملی در

منابع

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology: Saunders Philadelphia; 2005.
2. Brisbin JT, Gong J, Parvizi P, Sharif S. Effects of lactobacilli on cytokine expression by chicken spleen and cecal tonsil cells. CVI. 2010;17(9):1337-43.
3. Brisbin JT, Gong J, Sharif S. Interactions between commensal bacteria and the gut-associated immune system of the chicken. Anim Health Res Rev. 2008;9(1):101.
4. Galdeano CM, Perdigon G. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. CVI. 2006;13(2):219-26.
5. Hacini-Rachinel F, Gheit H, Le Luduec J-B, Dif F, Nancey S, Kaiserlian D. Oral probiotic control skin inflammation by acting on both effector and regulatory T cells. PLoS One 2009;4(3): e4903
6. Hamilton-Miller J. Probiotics and prebiotics in the elderly. Postgrad. Med. 2004;80(946):447-51.
7. Kabir S. The role of probiotics in the poultry industry. Int J Mol Sci. 2009;10(8):3531-46.
8. Laitinen K, Isolauri E. Management of food allergy: vitamins, fatty acids or probiotics? Eur J Gastroenterol Hepatol. 2005;17(12):1305-11.
9. Noujaim J, Andreatti Filho R, Lima Ed, Okamoto A. Detection of CD4+ and CD8+ lymphocytes in the intestine of broiler chicks treated with *Lactobacillus* spp. and challenged with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. BRAZ J POULTRY SCI. 2009;11(3):187-93.
10. Olivares M, Díaz-Ropero MP, Gómez N, Lara-Villoslada F, Sierra S, Maldonado JA, et al. The consumption of two new probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT 5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711, boosts the immune system of healthy humans. Int Microbiol. 2010;9(1):47.52.
11. Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. Potential uses of probiotics in clinical practice. Clin. Microbiol. Rev.. 2003;16(4):658-72.
12. Sato K, Takahashi K, Tohno M, Miura Y, Kamada T, Ikegami S, et al. Immunomodulation in gut-associated lymphoid tissue of neonatal chicks by immunobiotic diets. Poult Sci. 2009;88(12):2532-8.
13. Scharek-Tedin L, Filter M, Taras D, Wrede P, Schmidt MF. Influence of an Enterococ-

cus faecium probiotic on the development of Peyer's patches B cells in piglets. Arch Anim Nutr. 2009;63(5):343-55.

14. Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. AM J CLIN NUTR. 2001;73(2):361s-4s.
15. Shahin A. Investigation of the humoral and cellular immune responses of chickens to Salmonella typhimurium live vaccine: LMU; 2005.
16. Tsai Y-T, Cheng P-C, Liao J-W, Pan T-M. Effect of the administration of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 on Peyer's patch-mediated mucosal immunity. Int J Immunopharmacol. 2010;10(7):791-8.

