

Evaluation of herb extracts and germanium oxide as immunological adjuvants in quails (*Coturnix coturnix japonica*)

Evaluación de extractos de hierbas y el óxido de germanio como adyuvantes inmunológicos en codornices (*Coturnix coturnix japonica*)

Gazim Bižanov^{1*} Ph.D, Teresa Normantienė¹ M.Sc, Irena Jonauskienė¹ Ph.D, Gintautas Vyšniauskis² Ph.D.

¹State Research Institute Centre for Innovative Medicine, Department of Biomodels, Moletu plentas 29, LT 08409, Vilnius, Lithuania. ²Department of Biopharmaceuticals, Santariškių 5, LT 08406 Vilnius, Lithuania. *Correspondence: gazim.bizanov@imcentras.lt

Received: October 2017; Accepted: May 2018.

ABSTRACT

Objective. The aim of present investigation was to assess the immunostimulatory activity of herb extracts from *Allium sativum*, *Aloe arborescens* and germanium oxide. **Materials and methods.** Quails were immunized three times orally with bovine serum albumin (BSA) in combination with the crude plant extracts and the inorganic substance which was indicated above. BSA-specific IgA antibodies in saliva and IgY antibodies in egg yolk were tested by ELISA. **Results.** It was discovered that the birds treated with BSA in combination with either *Allium sativum* or *Aloe arborescens* extracts or germanium oxide had higher titers of BSA-specific IgA antibodies in the saliva at the 42 day of monitoring, while the quails administered with BSA and *Allium sativum* or *Aloe arborescens* extracts or germanium oxide demonstrated higher levels of BSA-specific IgY antibodies in the egg yolk at the end of observation. Furthermore, the birds immunised with BSA alone had significantly lower immune responses to BSA than quails immunised with BSA supplemented with the herb extracts and germanium oxide. **Conclusions.** These data suggest that medicinal plant extracts and germanium oxide can be applied as oral adjuvants or as immunomodulators for quails.

Keywords: Quails; herbs; oral administration; immunostimulation (*Sources: CAB*).

RESUMEN

Objetivo. Evaluar la actividad inmunoestimulante de extractos de hierbas de *Allium sativum*, *Aloe arborescens* y óxido de germanio. **Materiales y métodos.** Las codornices se inmunizaron tres veces por vía oral con albúmina de suero bovino (BSA) en combinación con los extractos vegetales crudos y la sustancia inorgánica antes indicada. Los anticuerpos IgA específicos de la BSA en la saliva y los anticuerpos IgY en la yema de huevo se analizaron mediante ELISA. **Resultados.** Se encontró que las aves tratadas con BSA en combinación con extractos de *Allium sativum* o *Aloe arborescens* o con óxido de germanio tenían títulos más altos de anticuerpos IgA específicos de BSA en la saliva a los 42 días de seguimiento, mientras que las codornices administradas con BSA y *Allium sativum* o

extractos de *Aloe arborescens* u óxido de germanio demostraron niveles más altos de anticuerpos IgY específicos de BSA en la yema de huevo al final de la observación. Además, las aves inmunizadas sólo con BSA tuvieron respuestas inmunitarias significativamente más bajas a la BSA que las codornices inmunizadas con BSA complementadas con extractos de hierbas y óxido de germanio. **Conclusiones.** Estos datos sugieren que los extractos de plantas medicinales y el óxido de germanio pueden aplicarse como adyuvantes orales o como inmunomoduladores para las codornices.

Palabras clave: Codornices; hierbas; administración oral; inmunoestimulación (*Fuente: CAB*).

INTRODUCTION

Some high plants contain biologically active substances with adjuvant-like properties, therefore they can be used in formulation of veterinary vaccines or as supplements in diet (1,2). Furthermore, adjuvants can be used to enhance the immune response to antigens (1,3).

The use of terrestrial plants is the basis of traditional medicine in most ethnic cultures. Of the 300.000 species of flowering plants growing on the planet, studied about 250 000. Of the 350 thousand species of plants in approximately 4% of the studied biological activity (1). A variety of extracts from herbs were discovered that would induce the production of antibodies in various animals (2, 4-8). Medicinal herbs play an important role in researching new substances with adjuvant-like properties and are used in veterinary vaccine formulations or as food supplements to reduce the risk of various diseases. Particularly, adjuvants can be used to improve the immune response to antigens for several different purposes, including: 1/ increasing the immunogenicity of weak antigens; 2/ enhancing the speed and duration of the immune response; 3/ modulating antibody avidity, specificity, isotype or subclass distribution; and 4/ promoting the induction of mucosal immunity. IgY antibodies, also called egg yolk immunoglobulins, are the only immunoglobulins in egg yolk and transferred in the female from serum to egg yolk to confer passive immunity to embryos and neonates. According IgY-technology, using birds instead of mammals as the immunization host brings a number of advantages: eggs are cheap and readily available, antibody levels in yolks are high, IgY isolation is fast and simple, IgY as alternative for partially replace of antibiotics (1).

In the recent past, scientific studies on plants used in ethnomedicine have led to the discovery of many valuable drugs. Organic compounds and trace elements are represented in herbs. However, the effect of some extracts from medicinal herbs on immune system has not

INTRODUCCIÓN

Algunas plantas altas contienen sustancias biológicamente activas con propiedades adyuvantes, por lo que pueden utilizarse en la formulación de vacunas veterinarias o como suplementos en la dieta (1,2). Además, se pueden utilizar adyuvantes para mejorar la respuesta inmunitaria a los antígenos (1,3).

El uso de plantas terrestres es la base de la medicina tradicional en la mayoría de las culturas étnicas. De las 300.000 especies de plantas con flores que crecen en el planeta, se estudiaron unas 250.000. De las 350 mil especies de plantas en aproximadamente el 4% de la actividad biológica estudiada (1). Se descubrió una variedad de extractos de hierbas que podrían inducir la producción de anticuerpos en varios animales (2, 4-8). Las hierbas medicinales desempeñan un papel importante en la investigación de nuevas sustancias con propiedades adyuvantes y se utilizan en formulaciones de vacunas veterinarias o como complementos alimenticios para reducir el riesgo de diversas enfermedades. Particularmente, los adyuvantes pueden usarse para mejorar la respuesta inmunitaria a los antígenos para varios propósitos diferentes, incluyendo: 1/ aumentar la inmunogenicidad de los antígenos débiles; 2/ aumentar la velocidad y la duración de la respuesta inmunitaria; 3/ modular la avidéz de anticuerpos, la especificidad, la distribución de isotipos o subclases; y 4/ promover la inducción de la inmunidad mucosa. Los anticuerpos IgY, también llamados inmunoglobulinas de yema de huevo, son las únicas inmunoglobulinas en la yema de huevo y se transfieren en la hembra del suero a la yema de huevo para conferir inmunidad pasiva a los embriones y neonatos. De acuerdo con la tecnología IgY, el uso de aves en lugar de mamíferos como huésped de inmunización trae una serie de ventajas: los huevos son económicos y están fácilmente disponibles, los niveles de anticuerpos en las yemas son altos, el aislamiento de IgY es rápido y simple, IgY como alternativa para el reemplazo parcial de antibióticos (1).

En el pasado reciente, los estudios científicos sobre las plantas utilizadas en etnomedicina han llevado al descubrimiento de muchos

been studied in a systematic way. The medicinal potential of plants lies in the phytochemical constituents which are responsible for many physiological as well as medicinal activities. Alkaloids are the most diverse type of plant metabolites which possess cytotoxic, analgesic, immunostimulant, antispasmodic and anti bacterial properties. The phenolic compounds like flavonoids, tocopherols and phenolic acids display pharmacological effects such as antiapoptotic, antiaging, anti-inflammatory, cardioprotective, immunomodulatory and anti-angiogenic. However, the effect of some extracts from medicinal herbs on immune system has not been studied in a systematic way (1). Mucosal immunity, in which secretory IgA antibodies play the main important role, is established via the mucosa-associated lymphoid tissues such as those in the respiratory and gastrointestinal tracts. The normal response of the respiratory and gastrointestinal (GI) tracts to any antigens is tolerance rather than immunity and only certain antigens induce a mucosal, peripheral immune response. The normal healthy GI tract is apparently capable to recognize distinguish between safe normal flora and food antigens and dangerous pathogens. The use of adjuvants-like substances can effectively alter the distinguishing properties of the GI tract (1).

In order to enhance immune response some inorganic substances were applied. In practice different trace elements were used (1), platinum nanoparticles (7, 9) or aluminium hydroxide (7, 10, 11) or iron, selenium and zinc (12) were found to exhibit the stimulating activity to immune system. The extract from *Allium sativum* and germanium oxide (GeO₂) have not been previously examined as potential immunoadjuvants in quails after oral administration. The aim of the present study was to assess the efficacy of quails treated perorally with bovine serum albumin (BSA) in combination with several components: germanium oxide, herb extracts from *Allium sativum* and *Aloe arborescens* as mucosal adjuvants. The efficiency of the immunity was evaluated by measuring BSA antibodies of IgY in egg yolk and IgA in saliva.

MATERIALS AND METHODS

Animals, feed, and rights statement.

Commercial thirty five female Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) of seven weeks old were purchased from the local hatchery. Quails each weighing 0.200–0.206 kg were used in the study.

Birds were divided into five groups A (*Allium sativum*), B (*Aloe arborescens*), C (germanium oxides), C (IFA) and E (BSA) containing seven

medicamentos valiosos. Los compuestos orgánicos y oligoelementos están representados en las hierbas. Sin embargo, el efecto de algunos extractos de hierbas medicinales sobre el sistema inmunológico no ha sido estudiado de manera sistemática. El potencial medicinal de las plantas reside en los componentes fitoquímicos que son responsables de muchas actividades fisiológicas y medicinales. Los alcaloides son el tipo más diverso de metabolitos vegetales que poseen propiedades citotóxicas, analgésicas, inmunoestimulantes, antiespasmódicas y antibacterianas. Los compuestos fenólicos como los flavonoides, tocoferoles y ácidos fenólicos presentan efectos farmacológicos como antiapoptóticos, antienvejecimiento, antiinflamatorios, cardioprotectores, inmunomoduladores y antiangiogénicos. Sin embargo, el efecto de algunos extractos de hierbas medicinales sobre el sistema inmunológico no ha sido estudiado de manera sistemática (1). La inmunidad mucosa, en la que los anticuerpos IgA secretados desempeñan el papel principal, se establece a través de los tejidos linfoides asociados a la mucosa, como los del tracto respiratorio y gastrointestinal. La respuesta normal de los tractos respiratorio y gastrointestinal (GI) a cualquier antígeno es la tolerancia más que la inmunidad y sólo ciertos antígenos inducen una respuesta inmune periférica y mucosa. El uso de sustancias similares a los adyuvantes puede alterar eficazmente las propiedades distintivas del tracto gastrointestinal (1).

Para mejorar la respuesta inmune se aplicaron algunas sustancias inorgánicas. En la práctica se utilizaron diferentes oligoelementos (1), las nanopartículas de platino (7,9) o el hidróxido de aluminio (7,10,11) o el hierro, el selenio y el zinc (12) para mostrar la actividad estimulante del sistema inmunitario. El extracto de *Allium sativum* y óxido de germanio (GeO₂) no han sido examinados previamente como inmunoadyuvantes potenciales en codornices tras su administración oral. El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia en las codornices tratadas peroralmente con albúmina de suero bovino (BSA) en combinación con varios componentes: óxido de germanio, extractos de hierbas de *Allium sativum* y *Aloe arborescens* como adyuvantes de la mucosa. La eficacia de la inmunidad se evaluó midiendo los anticuerpos BSA de IgY en la yema de huevo e IgA en la saliva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales, alimento y declaración de derechos.

En el criadero local se compraron treinta y cinco codornices japonesas (*Coturnix coturnix japonica*) de siete semanas de edad. En el estudio se utilizaron codornices de 0.200-0.206 kg cada una.

birds each. The birds were housed as seven birds per cage of 80 × 60 × 30 cm in a standard animal room on a 16/8 h light/dark cycle (light long 25 lux). As bedding, chips of deciduous trees were used, after sterilization at 120°C, at a pressure of 1.5 kg/cm², for 20 min. The bedding was changed twice a week. The temperature in the room was 22 ± 1 °C, with a relative humidity within the range of 55%-60%. The quails were fed with granulated forage ("Kauno grūdai" AB Kaunas, Lithuania), which consisted of digestible energy (880 kJ/100g), crude protein (21.0%), crude fat (3.5%), and crude fiber (15%). The feed was balanced for vitamins and micronutrients, and amino acids. Water was provided *ad libitum*.

The experiment was approved by authorization and official permissions for growing and commercial use of laboratory animals and products and the permission for the current experimental work (No.: G2-38) were issued by the State Food and Veterinary Service upon the recommendation of the Ethics Commission of Lithuania on the Use of Laboratory.

Antigen. A commercial preparations of BSA (Sigma, USA) was used as a model antigen.

Preparation of herb extract. The spring garlic *Allium sativum* were collected in 2015 in garden. Leaves of seventh-year-old *Aloe arborescens* were collected in 2015 in the greenroom of the State Research Institute Centre for Innovative Medicine (Vilnius, Lithuania). And then the 60 g of the garlic cloves of (*Allium sativum*) and the 250 g of the *Aloe arborescens* leaves were extracted with 70% ethanol solution during 7 days at room temperature and then remaining aqueous residue were concentrated and dried at 30°C. The yields of the dry extracts *Allium sativum* and *Aloe arborescens* were 4.4% and 1.6% respectively.

Germanium oxide. A commercial preparation of germanium oxide (IV), 99.99% (GeO₂) was obtained from Alfa Aesar GmbH and Co KG (Germany) and was used. Incomplete Freund's adjuvant. The commercial product of incomplete Freund's adjuvant (IFA) (Bio-Rad, USA) was used.

Experimental design. Quails were randomly divided into five groups with seven quails in each of them. The immunization mixture contained 20 mg of BSA (dose 100 mg/kg) diluted in emulsion of 0.125 mL of phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2 and 0.125 mL of olive oil (Extra Virgin, Carapelli Firenze, Italy). The immunostimulatory components were added additionally.

Las aves se dividieron en cinco grupos A (*Allium sativum*), B (*Aloe arborescens*), C (óxidos de germanio), C (IFA) y E (BSA) con siete aves cada uno. Las aves fueron alojadas de a siete aves por jaula de 80×60×30 cm en un galpón de animales estándar en un ciclo de luz/oscuridad de 16/8 h (luz larga 25 lux). Como lecho se utilizaron astillas de árboles caducifolios, después de la esterilización a 120°C, a una presión de 1.5 kg/cm², durante 20 min. La cama se cambiaba dos veces por semana. La temperatura de la sala era de 22 ± 1°C, con una humedad relativa comprendida entre el 55% y el 60%. Las codornices fueron alimentadas con forraje granulado ("Kauno grūdai" AB Kaunas, Lituania), que consistía en energía digestible (880 kJ/100g), proteína cruda (21.0%), grasa cruda (3.5%) y fibra cruda (15%). El alimento estaba balanceado en vitaminas, micronutrientes y aminoácidos. El agua se proporcionaba *ad libitum*.

El experimento fue aprobado mediante autorización y permisos oficiales para el cultivo y el uso comercial de animales y productos de laboratorio y el permiso para el trabajo experimental en curso (No.: G2-38) fue expedido por el Servicio Estatal de Alimentación y Veterinaria por recomendación de la Comisión de Ética de Lituania sobre el Uso del Laboratorio.

Antígeno. Se utilizó como antígeno modelo una preparación comercial de BSA (Sigma, EE.UU.).

Preparación de extracto de hierbas. Los ajos de primavera *Allium sativum* se recogieron en 2015 en el jardín. Las hojas de *Aloe arborescens*, de siete años de edad, se recolectaron en 2015 en la sala verde del Centro de Medicina Innovadora del Instituto Estatal de Investigación (Vilnius, Lituania). A continuación, se extrajeron los 60 g de dientes de ajo (*Allium sativum*) y los 250 g de hojas de *Aloe arborescens* con una solución de etanol al 70% durante 7 días a temperatura ambiente y, a continuación, se concentraron los residuos acuosos restantes y se secaron a 30°C. Los rendimientos de los extractos secos *Allium sativum* y *Aloe arborescens* fueron del 4.4% y 1.6% respectivamente.

Óxido de germanio. Una preparación comercial de óxido de germanio (IV), 99,99% (GeO₂) se obtuvo de Alfa Aesar GmbH y Co KG (Alemania) y se utilizó. El adyuvante incompleto de Freund. Se utilizó el producto comercial del adyuvante incompleto de Freund (IFA) (Bio-Rad, EE.UU.).

Diseño experimental. Las codornices se dividieron aleatoriamente en cinco grupos con siete codornices en cada uno de ellos. La mezcla de inmunización contenía 20 mg de BSA (dosis de 100 mg/kg) diluidos en emulsión de 0.125 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7.2 y 0.125 mL de aceite de oliva (Virgen Extra, Carapelli Firenze, Italia). Los componentes inmunoestimulantes fueron añadidos adicionalmente.

Group A (*Allium sativum*). 100.0 mg of dry extract *Allium sativum* was diluted in 0.25 mL PBS and was mixed with 0.25 mL BSA containing immunization mixture that corresponds to a dose 500 mg/kg.

Group B (*Aloe arborescens*). 100.0 mg of dry extract *Aloe arborescens* was diluted in 0.25 mL PBS and was mixed with 0.25 mL BSA containing immunization mixture that corresponds to a dose 500 mg/kg.

Group C (GeO₂). 7.0 µg of GeO₂ was diluted in 0.25 mL PBS and was mixed with 0.25 mL BSA containing immunization mixture that corresponds to a dose 35.0 µg/kg.

Group D (IFA positive control). The suspension containing 20 mg of BSA in 0.25 ml PBS was emulsified with an equal volume of IFA.

Group E (BSA alone). The mixture contained 20 mg of BSA in 0.5 ml of PBS.

Quails in groups A, B, C and E were administered immunization mixtures orally on days 1, 7 and 14. Quails in groups D were administered intramuscularly into four site of the pectoral muscle of each quail. Inoculation was performed three times (at days 1, 14, and 28). The quails were not anaesthetized during immunizations. Plastic (Luer) was used for oral administration, where hub was supplemented with a feeding needle (length 75 mm, width 15 mm) containing a silicon tip at the end as described previously (6).

Sampling. Eggs and saliva were collected for antibody measurement weekly, beginning 7d after the first injection, and stored at 4°C and -20°C, respectively. The purification of IgY from egg yolk was performed as described earlier (13). Saliva secretion was collected by absorbent filter papers (Whatman No.1, Sigma). Pre-weighed two wicks were placed under the tongue of the hen for approximately 20 s. The wicks were weighed to measure the amount of saliva. The saliva was extracted by adding 400 µL of PBS containing 0.1% Tween 20, pH 7.2, to the Eppendorff tube with the paper wicks and incubating the mixture with slow shaking at 20°C for 2 h. After this, the extract was used for analysis.

Determination of antibodies. BSA-specific IgA antibodies in saliva and BSA-specific IgY antibodies in egg yolk from all five groups were examined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using Nunc Immuno Plates, (MaxiSorb, F96, Nunc, Denmark) with minor modifications as earlier described (14). Plates were coated with 100 µL/well of BSA (1 mg/

Grupo A (*Allium sativum*). 100,0 mg de extracto seco *Allium sativum* se diluyó en 0.25 ml de PBS y se mezcló con 0.25 ml de BSA con una mezcla de inmunización que corresponde a una dosis de 500 mg/kg.

Grupo B (*Aloe arborescens*). 100.0 mg de extracto seco de *Aloe arborescens* se diluyó en 0.25 mL PBS y se mezcló con 0.25 mL BSA conteniendo una mezcla de inmunización que corresponde a una dosis de 500 mg/kg.

Grupo C (GeO₂). 7.0 µg de GeO₂ se diluyó en 0.25 mL PBS y se mezcló con 0.25 mL BSA conteniendo una mezcla de inmunización que corresponde a una dosis de 35.0 µg/kg.

Grupo D (control positivo de la IFA). La suspensión que contenía 20 mg de BSA en 0,25 ml de PBS se emulsionó con un volumen igual de IFA.

Grupo E (sólo BSA). La mezcla contenía 20 mg de BSA en 0,5 ml de PBS.

Las codornices de los grupos A, B, C y E se administraron por vía oral en los días 1, 7 y 14. Las codornices del grupo D se administraron por vía intramuscular en cuatro sitios del músculo pectoral de cada codorniz. La inoculación se realizó tres veces (a los días 1, 14 y 28). Las codornices no fueron anestesiadas durante las inmunizaciones. Para la administración oral se utilizó plástico (Luer), en el que el cubo se complementó con una aguja de alimentación (longitud 75 mm, anchura 15 mm) que contenía una punta de silicona en el extremo, como se describió anteriormente (6).

Muestreo. Los huevos y la saliva fueron recolectados para la medición de anticuerpos semanalmente, comenzando 7d después de la primera inyección, y almacenados a 4°C y -20°C, respectivamente. La purificación de IgY de la yema de huevo se realizó como se describió anteriormente (13). La secreción de saliva fue recogida por papeles de filtro absorbentes (Whatman No.1, Sigma). Se colocaron dos mechas pre-pesadas bajo la lengua de la gallina por aproximadamente 20 s. Se pesaron las mechas para medir la cantidad de saliva. La saliva se extrajo añadiendo 400 µL de PBS con 0.1% de Tween 20, pH 7.2, al tubo Eppendorff con las mechas de papel e incubando la mezcla con agitación lenta a 20°C durante 2 h. A continuación, se utilizó el extracto para el análisis.

Determinación de anticuerpos. Los anticuerpos IgA específicos de la BSA en la saliva y los anticuerpos IgY específicos de la BSA en la yema de huevo de los cinco grupos se examinaron mediante el ensayo inmunoenzimático (ELISA) utilizando placas Nunc Immuno Plates, (MaxiSorb, F96, Nunc, Dinamarca) con modificaciones

mL) diluted in 50 mM sodium carbonate (pH 9.6) and incubated at 4°C overnight. The next day plates were washed with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS-T), pH 7.2 five times. Non-specific protein-binding sites were blocked with PBS containing 7% of skimmed milk (Oxoid, UK), and after 1 h incubation at room temperature, the plates were washed with PBS-T. Extracts of saliva and egg yolk samples were applied to the ELISA plates (100 µL/well), serially two-fold in the blocking solution, and incubated at 4°C overnight. The plates were then washed with PBS-T and then the quail antibodies (IgA and IgY) were detected. To each well of plates 50 µL goat anti-chicken IgA conjugated with horseradish peroxidase (HRP), (Nordic Immunological Lab., The Netherlands) and 50 µL rabbit anti-chicken IgG conjugated with HRP (Nordic Immunological Lab., The Netherlands), were added respectively and incubated at 4°C overnight. After washing, bound antibodies detected with *o*-phenyldiamine (Sigma, USA) in 0.05 M phosphate-citrate buffer, pH 5.0 containing 0.012% H₂O₂. Colour developed for 30 min at room temperature. The reaction was stopped with addition of 50 µL per well 1.25 M H₂SO₄. The antibody titres were determined as the reciprocal of the highest dilution of saliva or yolk (the optical density was measured at 492 nm) (Titertek Multiscan Plus MK II, Labsystems Finland), which generated a 2-fold higher color signal than that of the negative samples. The titres were converted to a base-2 logarithmic scale. The geometric means (GM) were calculated from $GM = \sum \text{antilog}_2/n$, where the numerator is the sum of the antilogarithms of all titre values (in log₂) and the denominator is number of samples (15).

IgY calculation. The IgY total content (mg/ml) was measured photometrically at $\lambda=280$ nm and was calculated according to the Lambert-Beer law with an extinction coefficient of 1.34 for IgY by means of "BioPhotometer" (Eppendorf, Germany).

Statistical analysis. Statistical evaluation of the results was done by one-way analysis of variance ANOVA using PRISM Software (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). The mean of the IgA, IgY antibody titres and total IgY content (were compared using paired, two-tailed t-test. All values were expressed as mean \pm standard deviation and were considered to be statistically significant at $p < 0.05$.

menores como se describió anteriormente (14). Las placas se recubrieron con 100 µL/pocillo de BSA (1 mg/mL) diluido en carbonato de sodio de 50 mM (pH 9.6) e incubado a 4°C durante la noche. Al día siguiente se lavaron las placas con PBS que contenían 0,05% de Tween 20 (PBS-T), pH 7.2 cinco veces. Los sitios de unión proteica no específicos fueron bloqueados con PBS que contenía 7% de leche desnatada (Oxoid, Reino Unido), y después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, las placas fueron lavadas con PBS-T. Se aplicaron extractos de muestras de saliva y yema de huevo a las placas de ELISA (100 µL/pocillo), se doblaron en serie en la solución de bloqueo y se incubaron a 4°C durante la noche. A continuación se lavaron las placas con PBS-T y se detectaron los anticuerpos de codorniz (IgA e IgY). A cada pozo de placas se añadieron 50 µL IgA de cabra anti-pollo conjugada con peroxidasa de rábano rusticano (HRP), (Laboratorio Inmunológico Nórdico, Países Bajos) y 50 µL IgG de conejo anti-pollo conjugada con HRP (Laboratorio Inmunológico Nórdico, Países Bajos), respectivamente, y se incubaron a 4°C durante la noche. Después del lavado, se detectaron anticuerpos ligados con *o*-fenilendiamina (Sigma, EE.UU.) en tampón de fosfato-citrato de 0.05 M, pH 5.0 con 0.012% de H₂O₂. Color desarrollado durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con la adición de 50 µL por pozo de 1.25 M H₂SO₄. Los títulos de anticuerpos se determinaron como el recíproco de la mayor dilución de saliva o yema (la densidad óptica se midió a 492 nm) (Titertek Multiscan Plus MK II, Labsystems Finlandia), lo que generó una señal de color dos veces mayor que la de las muestras negativas. Los títulos fueron convertidos a una escala logarítmica base-2. Las medias geométricas (GM) se calcularon a partir de $GM = \sum \text{antilog}_2/n$, donde el numerador es la suma de los antilogaritmos de todos los valores de título (en log₂) y el denominador es el número de muestras (15).

Cálculo de IgY. El contenido total de IgY (mg/ml) se midió fotométricamente a $\lambda=280$ nm y se calculó según la ley de Lambert-Beer con un coeficiente de extinción de 1.34 para IgY mediante "BioPhotometer" (Eppendorf, Alemania).

Análisis estadístico. La evaluación estadística de los resultados se realizó mediante un análisis unidireccional de la varianza ANOVA utilizando el software PRISM (Graph Pad Software, San Diego, CA, EUA). La media de los títulos de anticuerpos IgA, IgY y el contenido total de IgY (se compararon mediante una prueba t doble emparejada. Todos los valores se expresaron como media \pm desviación estándar y se consideraron estadísticamente significativos a $p < 0.05$.

RESULTS

Figure 1 shows that antibodies in saliva were detected in groups A, B and C during the observation period. Aside from that in group C the IgA titres in saliva were significantly higher than those in other groups at all days of the observation. In contrast, in groups D and E (negative control) the IgA titres were below \log_2 2.4 during the observation period. Generally, anti-BSA IgY antibodies in egg yolk were found in groups A, B, C and D throughout the observation period (Figure 2). In part, the IgY titres of group D (positive control) were significantly higher than those in other groups during the observation period. Notably, IgY titres were significantly lower within one to six weeks after the last immunisation only in group E (BSA alone).

As seen from Figure 3, the total IgY content in egg yolk among groups A, B, C and D varied from 21 to 40 mg/ml of egg yolk. Beyond that the total IgY concentration in groups C and D reached 41 and 42 mg/mL of egg yolk, respectively. In group E the total IgY content was significantly lower than those in other groups at all time-point of the observation after the last immunization.

RESULTADOS

La figura 1 muestra que se detectaron anticuerpos en la saliva en los grupos A, B y C durante el período de observación. Aparte de eso, en el grupo C los títulos de IgA en la saliva fueron significativamente más altos que los de otros grupos en todos los días de la observación. En cambio, en los grupos D y E (control negativo) los títulos de IgA estuvieron por debajo de \log_2 2.4 durante el período de observación. En general, se encontraron anticuerpos IgY anti-BSA en la yema de huevo en los grupos A, B, C y D durante el período de observación (Figura 2). En parte, los títulos de IgY del grupo D (control positivo) fueron significativamente más altos que los de otros grupos durante el período de observación. En particular, los títulos de IgY fueron significativamente inferiores entre una y seis semanas después de la última inmunización sólo en el grupo E (BSA solo).

Como se observa en la figura 3, el contenido total de IgY en la yema de huevo entre los grupos A, B, C y D varió de 21 a 40 mg/ml de yema de huevo. Además, la concentración total de IgY en los grupos C y D alcanzó 41 y 42 mg/mL de yema de huevo, respectivamente. En el grupo E, el contenido total de IgY fue significativamente menor que el de otros grupos en todo el momento de la observación después de la última inmunización.

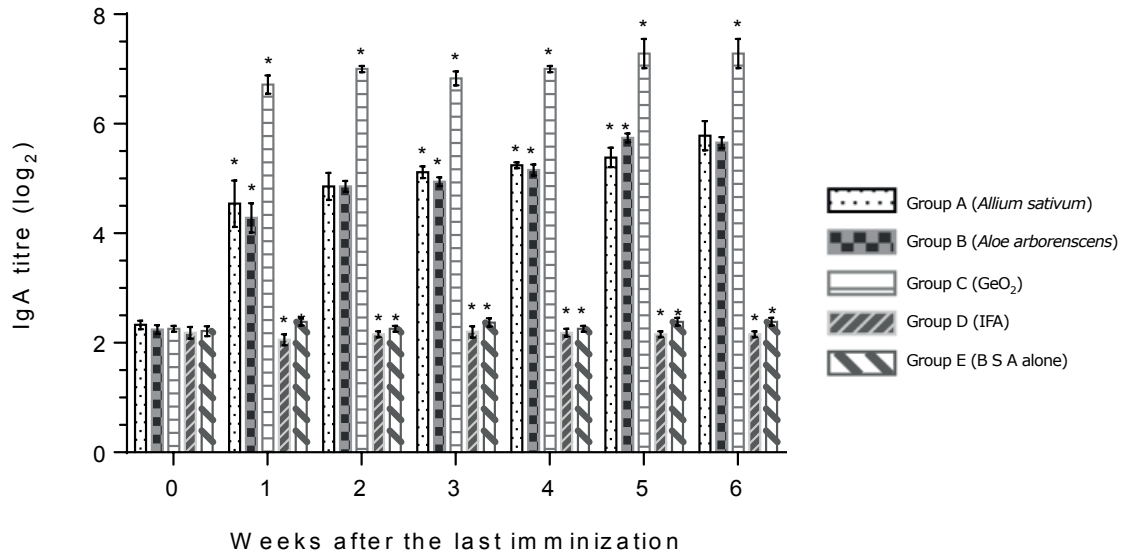


Figure 1. Saliva IgA antibody response (\log_2) in quails after the oral immunization with bovine serum albumin in combination with herb extract from *Allium sativum* or *Aloe arborescens* and GeO₂. Asterisks indicate groups the values of which differ significantly from those of other groups on the same week.

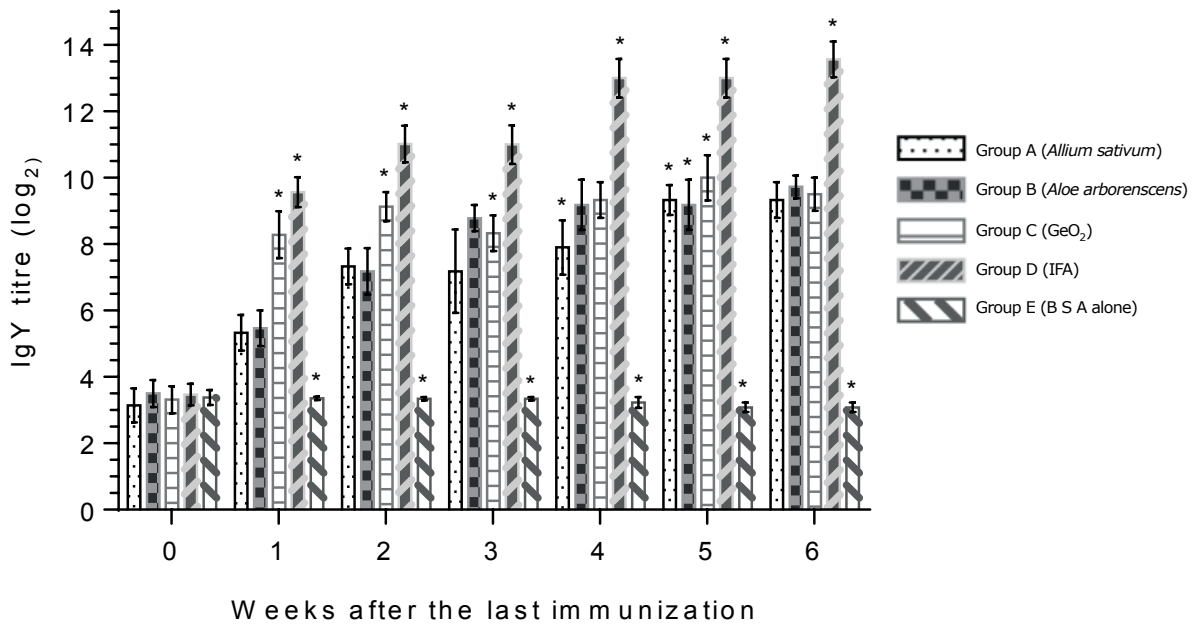


Figure 2. Egg yolk IgY antibody response (log₂) in quails after the oral immunization with bovine serum albumin in combination with herb extract from *Allium sativum* or *Aloe arborescens* and GeO₂. Asterisks indicate groups the values of which differ significantly from those of other groups on the same week.

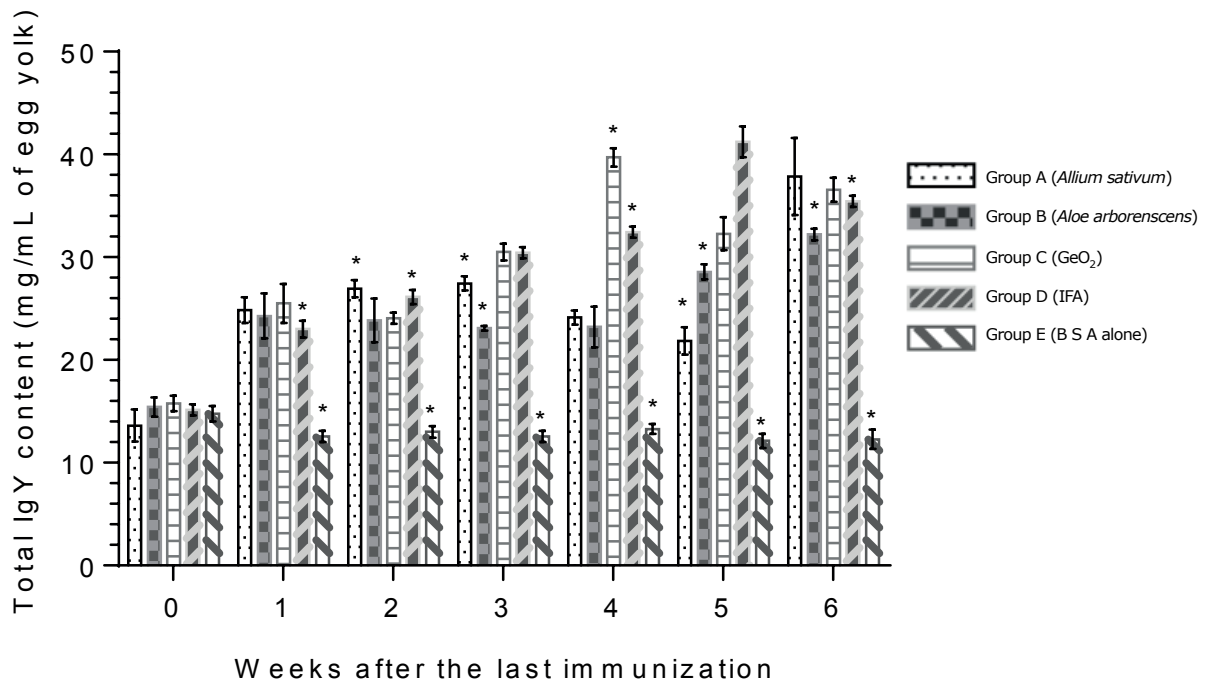


Figure 3. The total IgY content (mg/mL of egg yolk) in quails after the oral immunization with bovine serum albumin in combination with herb extract from *Allium sativum*, or *Aloe arborescens* and GeO₂. Asterisks indicate groups the values of which differ significantly from those of other groups on the same week.

DISCUSSION

The usual response of the gastrointestinal tract to antigens is rather tolerance than immunity as described formerly (16,17). A combination of soluble antigen, boosting element and the administration protocol have been precisely selected. In the present investigation the quails were used. Our model of study is tightly composed and corresponds to the other studies where BSA was used as the antigen for provoking immune response in hens (5,6,8,18). Firstly, an antigenic capacity of BSA is enough to cause gentle immune response (19), but usually it is combined with the immunostimulator as a booster element. Secondly, the immunization mixture can be enriched additionally by emulsifying with an oil to provoke a prolonged enhancing effect (20).

It occurs due to the position of the soluble antigen in the internal aqueous phase that provides a slow release into the biological fluids. Apart from that an antigen inoculation *via* oral entry causes a reactivation of secretory as well as humoral components of the immune system. We assessed the immunostimulatory capacity of extracts from *Allium sativum*, *Aloe arborescens*, as well as germanium oxides under described conditions. In this study, we have demonstrated that oral administration with BSA in combination with the extracts from *Allium sativum*, *Aloe arborescens*, and as well as germanium oxides could also prime the immune system for both secretory and systemic antibody responses. It is shown that the elicited immune response can persist for longer period, even until 1.5 months, following the first administration. These data the supplement previous reports noted that biologically active constituents of plants as *Uncaria tomentosa*, *Vinca major*, *Vitex agnus-castus*, *Hedysarum neglectum*, *Ginkgo biloba* and *Ocimum sanctum* (4-7,21) as well as some trace elements (aluminium, platinum) are essential for the development and maintenance of humoral and secretory immunity (6,7).

A large number of sixteen rare earth elements and thirty-one trace elements were found in Shilajit and which caused a strong immune response in chickens (1,7). So it is likely that the high contents of the element are so-called hub-plants can have a high degree of inducing the immune system. In other work was described that feeding with *Aloe vera* extract stimulated increase of CD4+ lymphocyte in blood and in serum IgM and IgG antibodies over 21 day (22). Using platinum salt-treated animals cellular and humoral responses in guinea pigs (23) and in mice (24) were shown detected. In fact, in *Allium sativum*, *Aloe arborescens* was found germanium

DISCUSIÓN

La respuesta habitual del tracto gastrointestinal a los antígenos es más bien tolerancia que inmunidad, como se describió anteriormente (16,17). Se ha seleccionado con precisión una combinación de antígeno soluble, elemento potenciador y protocolo de administración. En la presente investigación se utilizaron codornices. Nuestro modelo de estudio está estrechamente compuesto y corresponde a los otros estudios en los que se utilizó BSA como antígeno para provocar la respuesta inmunitaria en las gallinas (5,6,8,18). En primer lugar, una capacidad antigénica de BSA es suficiente para causar una respuesta inmune suave (19), pero generalmente se combina con el inmunoestimulador como elemento estimulante. En segundo lugar, la mezcla de inmunización puede enriquecerse adicionalmente emulsionando con un aceite para provocar un efecto potenciador prolongado (20).

Ocurre debido a la posición del antígeno soluble en la fase acuosa interna que proporciona una liberación lenta en los fluidos biológicos. Además, la inoculación de antígenos *por vía* oral provoca una reactivación de los componentes secretores y humorales del sistema inmunológico. Se evaluó la capacidad inmunoestimulante de extractos de *Allium sativum*, *Aloe arborescens* y óxidos de germanio en las condiciones descritas. En este estudio, hemos demostrado que la administración oral con BSA en combinación con los extractos de *Allium sativum*, *Aloe arborescens* y óxidos de germanio también podría preparar al sistema inmunológico para respuestas de anticuerpos secretores y sistémicos. Se muestra que la respuesta inmune provocada puede persistir durante un período más largo, incluso hasta 1.5 meses, después de la primera administración. Estos datos complementan los informes anteriores y señalan que los componentes biológicamente activos de plantas como *Uncaria tomentosa*, *Vinca major*, *Vitex agnus-castus*, *Hedysarum neglectum*, *Ginkgo biloba* y *Ocimum sanctum* (4-7,21), así como algunos oligoelementos (aluminio, platino), son esenciales para el desarrollo y mantenimiento de la inmunidad humoral y secretoria (6,7).

Un gran número de dieciséis elementos raros de la tierra y treinta y un oligoelementos fueron encontrados en Shilajit y que causaron una fuerte respuesta inmune en los pollos (1,7). Por lo tanto, es probable que el alto contenido del elemento son las llamadas plantas de centro puede tener un alto grado de inducir el sistema inmunológico. En otros trabajos se describió que la alimentación con extracto de *Aloe Vera* estimulaba el aumento de linfocitos CD4+ en sangre y en anticuerpos IgM e IgG séricos durante 21 días (22). Se detectaron respuestas celulares y humorales de animales tratados con sales de platino en cobayas (23) y ratones (24). De hecho, en *Allium sativum*, *Aloe arborescens*

in concentration of 754 ppm and 80 ppm, correspondingly (25,26). In order to increase the concentration of germanium in extracts from *Allium sativum*, *Aloe arborescens* (25) higher doses for administration in quails were used.

Trace elements were used for comparative analysis with plant extracts. Also they are important for functioning of various components the immune system. Metals which often concentrated into the medicinal plants perform the functions as cofactors. Such as metals Co, Zn, Fe, Cu, Mn, Cr are participating in the metabolism at various molecular levels. Also divalent metals can complexed with organic compounds of low molecular weight and with proteins (1). It was that between the cadmium or manganese content and IgG concentration inverse correlation. On the contrary a direct correlation between magnesium, calcium and cobalt content and circulating immune complexes had been detected. In addition, was observed that production of cytokines can be activated with manganese. Zinc content in serum elicited IgA, IgG and IgM immunoglobulins (1). Data of the investigations shown that using herb extracts can stimulated immune system after mucosal administration as well as supplements the various plant in feed animals which can magnify for certain physiological functions, such as immunomodulation. May be hypothesized that the degree of influence on the microenvironmental *in vivo* depends from ionization energy. which is the sum of two parameters the total trace elements content and ionization energy of trace elements. In particular, our findings show that aluminium, platinum and germanium oxides may be used for immunomodulation *in vivo*. Furthermore, our data shown that interaction between elements which contain in used plants can influence on the immune response in rabbits and birds. On the other hand, organic components containing in plant such as polysaccharide, alkaloids, and triterpenoid saponins would elicited immunity. There is still a need to clarify the phytochemical composition and the mechanisms of action for many herbs, spices and their extracts and furthermore, to assess the appropriate dose that should be safely used in specific circumstances and animal species (1).

Additionally we evaluated the total IgY content in egg yolk. The IgY content follows clear age-dependent kinetics which was confirmed as noted earlier (6). High content of IgY persists in egg yolk longer than one year and later it slightly decreases (27). Furthermore, the fluctuation the immunoglobulin may be reflect the biological activity of quails B lymphocytes, in view of a rhythmic production of different amounts of

se encontró germanio en concentraciones de 754 ppm y 80 ppm, respectivamente (25,26). Para aumentar la concentración de germanio en los extractos de *Allium sativum*, se utilizaron dosis más altas de *Aloe arborescens* (25) para la administración en codornices.

Se utilizaron oligoelementos para el análisis comparativo con extractos de plantas. También son importantes para el funcionamiento de varios componentes del sistema inmunológico. Los metales que a menudo se concentran en las plantas medicinales desempeñan funciones de cofactores. Tales como los metales Co, Zn, Fe, Cu, Mn, Cr están participando en el metabolismo a varios niveles moleculares. También los metales divalentes pueden acoplarse con compuestos orgánicos de bajo peso molecular y con proteínas (1). Se trata de la correlación inversa entre el contenido de cadmio o manganeso y la concentración de IgG. Por el contrario, se había detectado una correlación directa entre el contenido de magnesio, calcio y cobalto y los inmunocomplejos circulantes. Además, se observó que la producción de citoquinas puede activarse con manganeso. Contenido de zinc en las inmunoglobulinas IgA, IgG e IgM obtenidas en suero (1). Los datos de las investigaciones muestran que el uso de extractos de hierbas puede estimular el sistema inmunológico después de la administración de la mucosa, así como los suplementos de las diversas plantas en los animales de alimentación que pueden magnificar para ciertas funciones fisiológicas, tales como la inmunomodulación. Se puede plantear la hipótesis de que el grado de influencia sobre el microambiente *in vivo* depende de la energía de ionización, que es la suma de dos parámetros: el contenido total de oligoelementos y la energía de ionización de los oligoelementos. En particular, nuestros hallazgos muestran que los óxidos de aluminio, platino y germanio se pueden utilizar para la inmunomodulación *in vivo*. Además, nuestros datos muestran que la interacción entre los elementos que contienen las plantas usadas puede influir en la respuesta inmunitaria de conejos y aves. Por otro lado, los componentes orgánicos que contienen en la planta tales como polisacáridos, alcaloides y saponinas triterpenoides provocarían inmunidad. Sigue siendo necesario aclarar la composición fitoquímica y los mecanismos de acción de muchas hierbas, especias y sus extractos y, además, evaluar la dosis adecuada que debe utilizarse de forma segura en circunstancias específicas y para las especies animales (1).

Adicionalmente se evaluó el contenido total de IgY en la yema de huevo. El contenido de IgY sigue una clara cinética dependiente de la edad, lo que se confirmó como se ha indicado anteriormente (6). El alto contenido de IgY persiste en la yema de huevo durante más de un año y posteriormente disminuye ligeramente (27). Además, la fluctuación de la inmunoglobulina

IgY. Our findings present that all extracts and GeO₂ can be advised for immunostimulatory application, as adjuvants in quail models (1). This work is a first report on the influence of germanium oxides on secretory and humoral immune responses in quails.

puede reflejar la actividad biológica de los linfocitos B de las codornices, en vista de una producción rítmica de diferentes cantidades de IgY. Nuestros hallazgos presentan que todos los extractos y GeO₂ pueden ser aconsejados para su aplicación inmunoestimulante, como adyuvantes en modelos con codornices (1). Este trabajo es un primer informe sobre la influencia de los óxidos de germanio en las respuestas inmunitarias secretoras y humorales de las codornices.

REFERENCES

1. Bižanov G. Immunomodulation immunity in vivo and in vitro by medicinal herbs. Germany: Lap Lambert Academic Publishing; 2017.
2. Ragupathi G, Yeng KC, Leung PC, Lee M, Lau CB, Vickers A, Hood C, Deng G, Cheung NK, Cassileth B, Livingston P. Evaluation of widely consumed botanicals as immunological adjuvants. *Vaccine*. 2008; 26(37):4860-4865.
3. Singh M, O'Hagan T. Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharmaceutical Res*. 2002; 19(6):715-728.
4. Bižanov G, Tamosiumas V. Immune responses induced in mice after intragastral administration with Sendai virus in combination with extract of *Uncaria tomentosa*. *Scand J Lab Anim Sci*. 2005; 32(4):201-207.
5. Bižanov G, Melenkova N, Normantienė T, Jonauskienė I. Adjuvant effect of saponin on the immune responses to bovine serum albumin in hens. *Centr Eur J Immunol*. 2010; 35(4):187-190.
6. Bižanov G, Barinova N, Jonauskienė I. Adjuvant effect of Shilajit and plant extracts on the immune responses to bovine serum albumin in hens. *Centr Eur J Immunol*. 2012; 37(2):91-95.
7. Bižanov G, Ramanavičienė A, Normantienė T, Jonauskienė I. Immune responses induced in rabbits after oral administration of bovine serum albumin in combination with different adjuvants (herb extracts, aluminium hydroxide and platinum nanoparticles). *World Rabbit Sci*. 2016; 24(4):295-301.
8. Jonauskienė I, Bižanov G. Immune responses induced in hens after oral administration of bovine serum albumin in combination with an extract of *Uncaria tomentosa*. *B Vet I Pulawy*. 2008; 52(4):667-670.
9. Challcombe SJ, Rahman D, Jeffery H, Davis SS, O'Hagan DT. Enhanced secretory IgA and systemic IgY antibodies after oral immunization with biodegradable microparticles containing antigen. *Immunology*. 1992; 76(1):164-168.
10. Cox JC, Coulter A R. Adjuvants-a classification and review of their modes of action. *Vaccine*. 1997; 15(3):248-256.
11. Naim JO, van Oss CJ, Wu W, Giese RF, Nickerson PA. Mechanisms of adjuvancy: I-metal oxides as adjuvants. *Vaccine*. 1997; 15(11):1183-1193.
12. Terpiłowska S, Siwicki AK. The role of selected microelements: selenium, zinc, chromium and iron in immune system. *Centr Eur J Immunol*. 2011; 36(4):303-307.
13. Svendsen L, Crowley A, Ostergaard LH, Stodulski G, Hau J. Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. *Lab Anim Sci*. 1995; 45(1):89-93.
14. Najdi S, Nikbakht Brujeni, G, Sheikhi N, Chakhkar S. Development of anti-*Helicobacter pylori* immunoglobulins Y (IgYs) in quail. *Iran J Vet Res*. 2016; 17(2):106-110.
15. Hoy ES. Quality control in the clinical immunology laboratory. *Immuno Concepts Newslett*. 1992; 3:1-4.

16. Chen Y, Inobe J, Marks R, Gonnella P, Kuchroo VK, Weiner HL. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature*. 1995; 376(6536):177-180.
17. Strobel S, Mowat AM. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol Today*. 1998; 19(4):173-181.
18. Mayo SL, Persdotter-Hedlund G, Tufvesson M, Hau J. Systemic immune response of young chickens orally immunized with bovine serum albumin. *In Vivo*. 2003; 17(3):261-268.
19. Klipper E, Sklan D, Friedman A. Immune responses of chickens to dietary protein antigens. I. Induction of systemic and intestinal immune responses following oral administration of soluble proteins in absence of adjuvant. *Vet J Immunol*. 2000; 35(3-4):209-223.
20. Masuda K, Horie K, Suzuki R, Yoshikawa T, Hirano K. Oral-antigen delivery via a water-in-oil emulsion system modulates the balance of the Th1/Th2 type response in oral tolerance. *Pharmaceut Res*. 2003; 20(1):130-134.
21. Shafi TA, Bansal BK, Gupta DK, Nayyar S. Evaluation of immunotherapeutic potential of *Ocimum sanctum* in bovine subclinical mastitis. *Turk J Vet Anim Sci*. 2016; 40(3):352-358.
22. Vahedi G, Taghavi M, Maleki A.K, Habibian R. The effect of *Aloe vera* extract on humoral and cellular immune response in rabbit. *Afr J Biotech*. 2011; 10(26):5225-5228.
23. Ban M, Langonné I, Goutet M, Huguet N, Pépin E. Simultaneous analysis of the local and systemic immune responses in mice to study the occupational asthma mechanisms induced by chromium and platinum. *Toxicology*. 2010; 277(1-3): 29-37.
24. Liu JY. A study on the immunology and etiology of platinum induced asthma. *Chin J Tuberculosis Resp Dis* 1991; 14(5):264-317.
25. Asai K. *Miracle cure: Organic germanium*. Japan: Publication Inc Kodancka Intenat Via Hasper ans Row; 1980.
26. Li Y. The health efficacy of *Aloe* and its gevelopment and utilization. *Asia Social Sci*. 2009; 5(9):151-154.
27. Pauly D, Dorner M, Zhang X, Hlinak A, Dorner B, Schade R. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period. *Poultry Sci*. 2009; 88(2):281-290.