

ИММУНОГЕННОСТЬ И ИНВАЗИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ  
РОДА *Bacillus* ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ПРИМЕНЕНИИ\*

Н.А. ДОНЧЕНКО<sup>1, 2</sup>, Ю.Н. КОЗЛОВА<sup>3</sup>, В.Ю. КОПТЕВ<sup>1, 2</sup>, Ф. ЯН<sup>4</sup>,  
Ю.С. ХОМЕНКО<sup>1</sup>, Е.В. НЕФЕДОВА<sup>1</sup>, В.Н. АФОНЮШКИН<sup>1, 2, 3</sup>✉,  
О.В. МИШУКОВА<sup>3</sup>, Л.П. ЕРМАКОВА<sup>2</sup>, К.В. АН<sup>1, 4</sup>, Я.В. НОВИК<sup>2</sup>

Иммуномодулирующие эффекты пробиотиков на основе микроорганизмов рода *Bacillus* связаны с их способностью к проникновению через слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта в кровеносную систему. Представляется перспективным создание рекомбинантных вакцин на основе микроорганизмов рода *Bacillus*, продуцирующих рекомбинантные антигены наиболее значимых и антигенно изменчивых вирусных и бактериальных агентов сельскохозяйственной птицы, свиней и крупного рогатого скота. Проблема пероральной вакцинации заключается в развитии пищевой иммунотолерантности, связанной с вовлечением в реакции адаптивного иммунитета CD4+ и CD8+/Treg лимфоцитов, подавляющих иммунный ответ в отношении вводимого антигена. В настоящей работе впервые показано, что наличие инвазивности у микроорганизмов родов *Bacillus* и *Geobacillus* служит важным, но не единственным фактором, определяющим их иммуногенность. Мы установили, что, помимо *B. subtilis*, в качестве средства доставки рекомбинантных антигенов можно рассматривать *B. atrophaeus*. Нашей целью был поиск штаммов рода *Bacillus*, обладающих оптимальной инвазивностью и иммуногенностью, как пероральных средств доставки рекомбинантных антигенов с эффектом преодоления пищевой иммунотолерантности. Культуры микроорганизмов рода *Bacillus* были предоставлены Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (ИХБФМ СО РАН) (22 культуры) и ООО «СибАФ» (г. Бердск) (7 культур). Идентификацию культур проводили методом секвенирования 16S рибосомальной РНК по Сэнгеру. Штаммы высевали на 3 % триптиказо-соевой бульон (TSB), 0,5 % дрожжевой экстракт (YE) и 1,5 % агар Васто («BD Biosciences», США), после чего инкубировали при 37 °С в течение 16 ч. Бактериальные клетки инактивировали прогреванием при 65 °С в течение 3 ч и добавлением фурацилина до концентрации 0,1 %. Культуры 29 штаммов тестировали на иммуногенность *in vivo* на мышях-гибридах F<sub>1</sub> (A/Sn × Balb/C). Животным выпаивали перорально через зонд по 200 мкл культуральной жидкости микроорганизмов родов *Bacillus* и *Geobacillus* в концентрации 0,7 ед. McF, 3-кратно с интервалом 7 сут. Через 3 нед брали кровь для серологических исследований. Показатели иммуногенности и инвазивности оценивали в реакции агглютинации с флуоресцентно мечеными О-антигенами. Реакцию агглютинации проводили с сыворотками крови мышей. Инвазивность при пероральном введении культур рода *Bacillus* оценивали посредством постановки биопробы на 10-суточных цыплятах (*Gallus gallus* L.) кросса Shaver. Ежедневно в течение 10 сут цыплятам вводили 1-суточную культуру исследуемого микроорганизма в дозе 200 мкл орально (1 млрд КОЕ/мл). На 11-е сут проводили убой и делали посевы биоматериала (мышцы, печень и сердце) на мясопептонный агар и в мясопептонный бульон. Также анализировали инвазивность микроорганизмов рода *Bacillus* на мышях линии C57Black. Животным вводили орально по 100 мкл культуры микроорганизма 1 раз в сутки в течение 2 сут подряд. На 3-и сут проводили убой и делали посевы материала печени и сердца на Eugonic агар, мясопептонный агар и в мясопептонный бульон. При проведении теста на наличие биосурфактантной активности Oil spreading assay культуральную жидкость разводили дистиллированной водой и вносили 20 мкл нефти. В качестве негативного контроля использовали дистиллированную воду, в качестве позитивного контроля — SDS (sodium dodecyl sulfate, 1 % v/v). Разрушение нефтяного пятна учитывали как положительный результат. Только 27,5 % культур микроорганизмов рода *Bacillus* инициировали образование антител к собственным корпускулярным антигенам при пероральном введении мышам F<sub>1</sub> (A/Sn × Balb/C). Среди изученных культур *B. subtilis* образование антител вызывали 71,42 %. Образование антител также стимулировали культуры других видов: *B. atrophaeus* B8, изолят B23 *B. zhangzhoulensis* (по другим источникам отнесен к *B. pumilus* или *B. safensis*), штамм *B. licheniformis* B10. Большинство микроорганизмов рода *Bacillus* не стимулировали продукцию антител к собственным антигенам. Культуры *B. mucoides*/*B. weihenstephanensis* B31, *B. simplex* B32, *B. thuringiensis* B20, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* 2-15, *Bacillus* spp. 1<sup>o</sup>-37-7 оказывали патогенное действие, сопровождавшееся гибелью мышей при пероральном введении: погибало от 25 до 50 % особей. При пероральном введении культур рода *Bacillus* птице у всех опытных кур грудные и бедренные мышцы были контаминированы на 100 %, печень и сердце — соответственно на 96 и 52 %. Инвазивность для мышей характеризовалась выявлением микроорганизмов в образцах печени и сердца через 18 ч после последнего перорального введения. Устойчивой инвазивностью

\* Исследования выполнялись в рамках работ по государственному заданию Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (НГАУ № 123121500008-1 и ИХБФМ СО РАН № 121031300043-8).

обладали культуры *Bacillus* spp. B56, *Bacillus* spp. B50, *B. atropheus* B8 и *B. safensis* B23. Однако антитела были обнаружены только к *B. atropheus* B8 и *B. safensis* B23. Биосурфактантной активностью обладали культуры B23 и B24 *B. zhangzhouensis*/*B. safensis*/*B. pumilus*, *B. atropheus* B8. Статистически значимой ассоциации между наличием биосурфактантной активности и инвазивностью на анализируемой выборке мы не обнаружили. Таким образом, потенциал пробиотических штаммов на основе микроорганизмов *Bacillus subtilis* в качестве носителей рекомбинантных вакцинных антигенов представляется нам наиболее перспективным.

Ключевые слова: *Bacillus*, споровые пробиотики, иммунофлуоресцентная реакция агглютинации, вакцинация, иммуногенность, инвазивность, кормовые вакцины, рекомбинантные вакцины, векторный штамм.

Пероральные вакцины в последние годы широко изучаются ввиду экономических перспектив их массового применения и технологичности. При этом остаются нерешенными вопросы разработки адъювантов для таких вакцин, проблемы индукции иммунотолерантности при пероральном введении антигена и использования этого феномена с целью снижения избыточной иммунореактивности организма в отношении вирусов и бактерий (1).

Мы предполагаем, что формирование антител к антигенам микроорганизмов рода *Bacillus* при их пероральном применении должно зависеть от сочетания иммуномодулирующих эффектов с инвазивностью. Штаммы микроорганизмов рода *Bacillus*, вызывающие образование наибольшего количества антител к своим антигенам, следует рассматривать в качестве наиболее перспективных средств доставки вакцинных рекомбинантных антигенов при пероральной вакцинации (2, 3).

Одна из проблем пероральной вакцинации — развитие пищевой иммунотолерантности, связанной с вовлечением в реакции адаптивного иммунитета CD4+ и CD8+/Treg лимфоцитов, подавляющих иммунный ответ в отношении вводимого антигена. Другая проблема — доставка антигена через барьер слизистых оболочек (4, 5).

Теоретически в случае микроорганизмов рода *Bacillus* обе указанные проблемы решаемы. Однако до сих пор акцент в изучении бактерий этого рода делался на поиске антагонистически активных или обладающих пониженной инвазивностью штаммов. Вероятно, разные штаммы и виды бактерий неодинаково перспективны в качестве средств доставки вакцинного антигена и стимуляции поствакцинального иммунитета (6). Моделирование процессов доставки и презентации антигенов иммунной системе с помощью микроорганизмов рода *Bacillus* в настоящее время не позволяет ответить на все актуальные вопросы, но эмпирический успех даст необходимый материал для разработки нового класса вакцинных препаратов (3, 7).

Пробиотики — это живые микроорганизмы, которые при введении в адекватных количествах оказывают положительное влияние на здоровье хозяина (2, 8, 9). Одним из перспективных для разработки пробиотиков считается грамположительная палочка *Bacillus subtilis*. Показано положительное влияние пробиотиков на показатели роста и иммунную систему (3, 5, 10). *B. subtilis* представляет собой эндоспорообразующую бактерию, которая может дифференцироваться в форму спящих спор в суровых условиях среды, включая недостаток питательных веществ и экстремальные температурные изменения (11).

В настоящей работе впервые показано, что наличие инвазивности у микроорганизмов родов *Bacillus* и *Geobacillus* служит важным, но не единственным фактором, определяющим их иммуногенность. Мы установили, что помимо *B. subtilis* в качестве средства доставки рекомбинантных антигенов можно рассматривать виды *B. atropheus*.

Нашей целью был поиск штаммов рода *Bacillus*, обладающих оптимальной инвазивностью и иммуногенностью, в качестве пероральных средств

доставки рекомбинантных антигенов с эффектом преодоления пищевой иммунологической толерантности.

*Методика.* Культуры микроорганизмов рода *Bacillus* были предоставлены Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (ИХБФМ СО РАН) (22 культуры) и ООО «СибАФ» (г. Бердск) (7 культур).

Идентификацию культур проводили методом секвенирования 16S рибосомальной РНК по Сэнгеру. ДНК бактерий выделяли стандартным силико-сорбционным методом. ПЦР для амплификации фрагмента гена 16S рибосомальной РНК проводили со следующими праймерами:

- S1 (5'-GCTGGCAGTGCCTTAAGCATGC-3'),
- S2 (5'-GTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCC-3'),
- S7 (5'-GTGGCGAACGGGTGAGTAACGCG-3'),
- S6 (5'-GATACGGTGAATACGTTCTCGGG-3').

Условия ПЦР: 3 мин при 94 °С (начальная денатурация); 0,5 мин при 94 °С (денатурация), 0,5 мин при 50 °С (отжиг), 1 мин при 72 °С (элонгация) (35 циклов). Использовали real time амплификатор CFX («Bio-Rad Laboratory», США).

Реакции Сэнгера выполняли с набором для циклического секвенирования BigDye Terminator V. 3.1 («Applied Biosystems», США) в стандартных условиях, указанных в руководстве для пользователя. Продукты реакции Сэнгера очищали (спин-колонки CentriSep, «Princeton Separations, Inc.», США) и визуализировали с помощью генетического анализатора 3500 («Applied Biosystems», США). Анализ последовательностей проводили с использованием BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Дополнительно изучали факторы, потенциально способные повысить эффективности инвазии, — гемолитическую, каталазную и гиалуронидазную активность согласно ОФС.1.7.2.0012.15 (11), а также продукцию биосурфактантов (12).

Штаммы микроорганизмов родов *Bacillus* и *Geobacillus* высевали в 3 % триптиказо-соевый бульон (TSB), 0,5 % дрожжевой экстракт (YE) и на 1,5 % агар Bacto («BD Biosciences», США) и инкубировали при 37 °С в течение 16 ч.

Бактериальные клетки инактивировали прогреванием при 65 °С в течение 3 ч и добавляли фурацилин до концентрации 0,1 %. Для получения флуоресцентно меченных антигенов к взвеси инактивированных бактериальных клеток добавляли 0,1 % раствор флуоресцентного красителя акридинового оранжевого в соотношении 1:10. Через 18 ч инкубации при 5 °С не связавшийся краситель отмывали физиологическим раствором. Для определения оптимальной концентрации антигены разводили с шагом 1:2 в буферном растворе (0,15 М NaCl, 0,1 М Tris-HCl, pH 7,2) и вносили в лунки 96-луночного микропланшета с V-образным дном. Через 16 ч инкубации при 37 °С оценивали свечение антигенов с помощью трансиллюминатора GelDoc («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США).

Культуры разных штаммов ( $n = 29$ ) тестировали на иммуногенность *in vivo* на мышах F<sub>1</sub> (A/Sn × Balb/C). Животных содержали в стандартных условиях согласно международным нормам (Council Directive 86/609/EEC). Мыши имели неограниченный доступ к воде и корму, использовался стандартный полнорационный гранулированный комбикорм для мышей. Животным выпаивали перорально через зонд по 200 мкл культуральной жидкости микроорганизмов родов *Bacillus* и *Geobacillus* (по 10 мышей на штамм) в концентрации 0,7 ед McF (McFarland Unit), 3-кратно с интервалом 7 сут. Через 3 нед брали кровь для серологических исследований.

Показатели иммуногенности и инвазивности культур *Bacillus* оценивали с использованием реакции агглютинации с флуоресцентно мечеными О-антигенами (13). Реакцию агглютинации проводили с сыворотками крови мышей, которые раститровывали с шагом 1:2 и вносили в лунки 96-луночного микропланшета с V-образным дном. Через 16 ч инкубации при температуре 18 °С оценивали свечение антигенов (трансиллюминатор GelDoc). Определяли титр антител ( $\log_2$ ).

Инвазивность при пероральном введении культур рода *Bacillus* оценивали в биопробе на 10-суточных цыплятах (*Gallus gallus* L.) кросса Shaver, разделенных по принципу аналогов на 5 групп по 10 особей. Цыплят содержали в стандартных условиях с соблюдением всех норм работы с животными (Council Directive 86/609/ЕЕС) с неограниченным доступом к воде и корму. Цыплята получали стандартный стартовый полнорационный гранулированный комбикорм ООО «Агро-Веста» (Россия). Ежедневно в течение 10 сут цыплятам вводили 1-суточную культуру микроорганизма (*B. subtilis* ТНП-3, *B. subtilis* ВКПМ В-10641, *B. cereus* DPRK-17, *B. coagulans* В12, *B. subtilis* В6), в каждой группе использовали один штамм в дозе 200 мкл орально (1 млрд КОЕ/мл). На 11-е сут проводили убой и делали посевы из биоматериала мышц, печени и сердца на мясопептонный агар и в мясопептонный бульон.

Также анализировали инвазивность микроорганизмов рода *Bacillus* на мышах линии С57Blаск. Животные содержались в стандартных условиях, согласно международным нормам (Council Directive 86/609/ЕЕС). Мыши имели неограниченный доступ к воде и стандартному полнорационному гранулированному комбикорму. В опыте использовали штаммы *B. subtilis* В6, *B. atrophaeus* В8, *B. licheniformis* В10, *B. subtilis* В18, *B. subtilis* В16, *B. subtilis* В19, *Bacillus* spp. В56, *Bacillus* spp. В50, *B. atrophaeus* В8 и *B. safensis* В23. На каждую культуру приходилось по 3 мыши. Животным вводили перорально по 100 мкл культуры исследуемого микроорганизма 1 раз в сутки в течение 2 сут подряд. На 3-и сут проводили убой и делали посевы из биоматериала печени и сердца на Eugonic агар, мясопептонный агар и мясопептонный бульон.

В тесте на наличие биосурфактантной активности Oil spreading assay у всех исследованных штаммов культуральную жидкость разводили дистиллированной водой и вносили 20 мкл нефти. В качестве негативного контроля использовали дистиллированную воду, в качестве позитивного контроля — SDS (sodium dodecyl sulfate, 1 % v/v). Разрушение нефтяного пятна учитывали как положительный тест. Тесты проводили в четырех повторениях (12).

Количественные и полуколичественные данные обрабатывали с использованием программы Microsoft Excel. Рассчитывали средние арифметические значения ( $M$ ) и среднеквадратические отклонения ( $\pm SD$ ). Для анализа ассоциаций между различными характеристиками исследуемых культур строили четырехпольные таблицы и вычисляли соотношения шансов (Odds ratio, OR) и доверительные интервалы (95 % CI).

**Результаты.** Только 27,5 % культур микроорганизмов рода *Bacillus* ( $n = 29$ ) инициировали продукцию антител к собственным корпускулярным антигенам при пероральном введении мышам F<sub>1</sub> (A/Sn  $\times$  Balb/C) (табл. 1). Среди изученных культур *B. subtilis* образование антител вызывали 71,42 %. Образование антител также стимулировали культуры других видов: *B. atrophaeus* В8, изолят В23, отнесенный к *B. zhangzhoulensis*/*B. pumilus*/*B. safensis*, штамм *B. licheniformis* В10. Большинство микроорганизмов рода *Bacillus* не стимулировали продукцию антител к собственным антигенам.

Культуры *B. mucoides*/*B. weihenstephanensis* B31, *B. simplex* B32, *B. thuringiensis* B20, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* 2-15, *Bacillus* spp. 1'-37-7 оказывали патогенное действие, сопровождавшееся гибелью мышей при пероральном введении: погибало от 25 до 50 % особей. Во всех случаях выжившие мыши не вырабатывали антитела к указанным бактериям (см. табл. 1).

### 1. Патогенность и иммуногенность микроорганизмов рода *Bacillus* при пероральном введении мышам F<sub>1</sub> (A/Sn × Balb/C)

Микроорганизм	Патогенность	Результаты иммунофлуоресцентной реакции агглютинации, титр антител (log <sub>2</sub> , M±SD)
<i>B. subtilis</i> B6	Не обнаружена	7,5±1,00
<i>B. atrophaeus</i> B8* +	Не обнаружена	3,0±0,00
<i>B. licheniformis</i> B10	Не обнаружена	3,0±0,00
<i>B. coagulans</i> B12	Не обнаружена	Отрицательно
<i>B. subtilis</i> B18	Не обнаружена	3,75±1,26
<i>Geobacillus toebii</i> B36	Не обнаружена	Отрицательно
<i>B. subtilis</i> HC B42	Не обнаружена	Отрицательно
<i>B. licheniformis</i> B44	Не обнаружена	Отрицательно
<i>Bacillus</i> spp. B45	Не обнаружена	Отрицательно
<i>Bacillus</i> spp. B47	Не обнаружена	Отрицательно
<i>B. subtilis</i> B16	Не обнаружена	5,0±1,15
<i>B. subtilis</i> B19	Не обнаружена	5,0±0,00
<i>B. lentus</i> B21	Не обнаружена	Отрицательно
<i>B. zhangzhouensis</i> / <i>B. pumilus</i> / <i>B. safensis</i> B23+	Не обнаружена	4,25±0,50
<i>B. zhangzhouensis</i> / <i>B. pumilus</i> / <i>B. safensis</i> B24+	Не обнаружена	Отрицательно
<i>B. stratosphericus</i> / <i>B. altitudinis</i> / <i>B. xiamenensis</i> B26	Не обнаружена	Отрицательно
<i>B. mucoides</i> / <i>B. weihenstephanensis</i> B31	Гибель 50 % мышей	Отрицательно
<i>B. simplex</i> B32	Гибель 50 % мышей	Отрицательно
<i>B. thuringiensis</i> B20	Гибель 25 % мышей	Отрицательно
<i>B. subtilis</i> / <i>B. amyloliquefaciens</i> B57	Гибель 25 % мышей	Отрицательно
<i>B. vallismartis</i> / <i>B. subtilis</i> / <i>B. halotolerans</i> B58	Не обнаружена	Отрицательно
<i>B. safensis</i> / <i>B. pumilus</i> B59	Не обнаружена	Отрицательно
<i>Bacillus</i> spp. B50*	Гибель 25 % мышей	Отрицательно
<i>Bacillus</i> spp. B52	Не обнаружена	Отрицательно
<i>Bacillus</i> spp. B53	Не обнаружена	Отрицательно
<i>Bacillus</i> spp. B56*	Не обнаружена	Отрицательно
<i>Bacillus</i> spp. B54	Не обнаружена	3,0±0,00
<i>Bacillus</i> spp. B55	Не обнаружена	Отрицательно
<i>Bacillus</i> spp. B57	Не обнаружена	Отрицательно

Примечание. \* — наличие инвазивной активности, + — наличие биосурфактантной активности.

Инвазивность для мышей характеризовалась выявлением микроорганизмов в образцах печени и сердца через 18 ч после последнего перорального введения. Устойчивой инвазивностью обладали культуры *Bacillus* spp. B56, *Bacillus* spp. B50, *B. atrophaeus* B8 и *B. safensis* B23. Однако антитела были обнаружены только к *B. atrophaeus* B8 и *B. safensis* B23 (см. табл. 1).

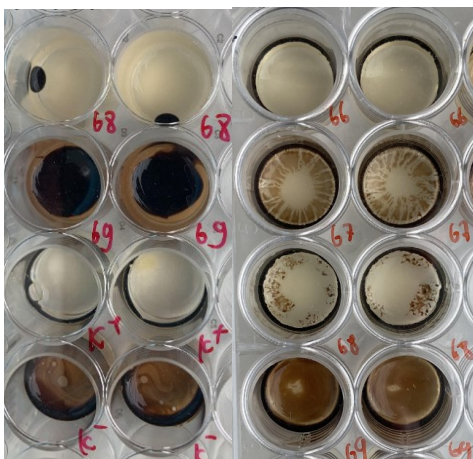
При пероральном введении культур рода *Bacillus* птице у всех опытных кур грудные и бедренные мышцы были контаминированы на 100 %, печень и сердце — соответственно на 96 и 52 % (табл. 2).

### 2. Контаминация микроорганизмами рода *Bacillus* внутренних органов и тканей 10-суточных цыплят (*Gallus gallus* L.) кросса Shaver при пероральном введении культур рода *Bacillus* (n = 10)

Штамм	Контаминация тканей и органов, %			
	сердце	печень	бедренная мышца	грудная мышца
<i>B. subtilis</i> ТНП-3	80	80	100	100
<i>B. subtilis</i> ВКПМ В-10641	0	100	100	100
<i>B. cereus</i> DPRK-17	80	100	100	100
<i>B. coagulans</i> B12	60	100	100	100
<i>B. subtilis</i> B6	40	100	100	100
Среднее	52	96	100	100

Все исследуемые нами штаммы продуцировали гиалуронидазу. Также большинство штаммов, за исключением *B. subtilis* ТНП-3 и *B. subtilis* В-7920, выделяли фермент каталазу и обладали бета-гемолитической активностью.

Биосурфактантной активностью (рис.) обладали изоляты B23 и B24 *B. zhangzhoulensis*/*B. safensis*/*B. pumilus* и *Bacillus atrophaeus* B8.



Пример исследования микроорганизмов рода *Bacillus* на биосурфактантную активность в тесте на эмульсификацию нефти: 66 — *Bacillus atrophaeus* B8 (положительно), 67 — *B. zhangzhoulensis*/*B. pumilus*/*B. safensis* B23 (отрицательно), 68 — *B. zhangzhoulensis*/*B. pumilus*/*B. safensis* B24 (положительно), № 69 — *Bacillus* spp. B56 (отрицательно); K<sup>-</sup> — отсутствие биосурфактантной активности, K<sup>+</sup> — изменение поверхностного натяжения среды в присутствии детергента.

Статистически значимой ассоциации между наличием биосурфактантной активности и инвазивностью в анализируемой выборке мы не обнаружили. Отношение шансов (OR) составило 4,5 (95 % CI 0,49-41,24), но было статистически незначимым. В то же время и наличие антител после многократного перорального введения не всегда ассоциировалось с положительными результатами тестов на инвазивность, равно как и наоборот (см. табл. 1).

Было протестировано 29 культур бактерий, из которых 8 стимулировали образование антител у мышей. В иммунофлуоресцентной реакции агглютинации (ИРА) мы определили титр антител к бактериям. Появление антител в сыворотке крови мышей, иммунизированных клетками микроорганизмов родов *Bacillus* и *Geobacillus*, зависело от видовой принадлежности бацилл. В группах мышей, получавших культуры *B. atrophaeus* B8 и *B. licheniformis* B10, выработка антител была ниже, чем в группах, получавших культуры *B. subtilis* (см. табл. 1). Эти результаты показали, что у мышей культуры *B. subtilis* действуют как адъюванты, усиливая антигенспецифическую иммунную реакцию, и это не противоречит известным нам данным литературы (10, 14).

Представляет интерес то, что даже наличие инвазивности у микроорганизмов рода *Bacillus*, не отнесенных к видам *B. subtilis* и *B. atrophaeus*, могло не сопровождаться образованием антител (см. табл. 1). То есть появление бацилл в паренхиматозных органах не обязательно стимулировало гуморальный иммунитет.

*B. subtilis* — хорошо известный вид микроорганизмов, который широко используется в составе пробиотиков для нужд птицеводства, животноводства и свиноводства (3, 7, 8, 15). Также методами генной инженерии на его основе создано множество продуцентов разнообразных рекомбинантных белков (3). Особенности иммунологических реакций организма на пероральное введение *B. subtilis* делает этот вид наиболее перспективным в качестве средства доставки антигенов пероральных вакцин (3, 5, 14).

Биосурфактанты — химически активные биополимеры, способные изменять поверхностное натяжение гидрофобных биомолекул, включая жиры, масла природного происхождения, нефть и т.д. (7, 12). Мы рассматривали эту характеристику в качестве одного из возможных механизмов, повышающих инвазивность бацилл и/или стимулирующих иммунный ответ за счет формирования липидных эмульсий. Однако в наших исследованиях инвазивные бациллы не всегда обладали биосурфактантной активностью, также необязательной была стимуляция выработки антител к собственным

антигенам (см. табл. 1).

Важным компонентом большинства, если не всех вакцин на основе инактивированных вирусов в птицеводстве считаются адъюванты (1, 16). Выяснение механизма действия адъювантов внесло значительный вклад в создание современных вакцинных препаратов (4, 10, 17, 18). В этой связи интересны примеры разработки вакцин на основе *B. subtilis* (7, 16) и тот факт, что биополимеры *B. subtilis* обладают выраженными адъювантными свойствами (19). Роль адъювантов также рассматривается в случае живых аттенуированных и рекомбинантных вакцин для животноводства и птицеводства (20) (хотя применение аттенуированных штаммов может нести риски реверсии). Важно понимать, какие именно реакции иммунной системы должны активировать адъюванты, учитывая закономерности формирования протективного иммунитета, особенно при использовании рекомбинантных вакцин с низкоиммуногенными антигенами (21, 22).

У кур изучение влияния различных веществ с потенциально адъювантными свойствами на иммунную систему (особенно желудочно-кишечного тракта) началось сравнительно недавно (23-25). В основном эти исследования касаются некоторых олигонуклеотидов и двуцепочечной РНК (23), маннанолигосахаридов (24) и иммуностимулирующих эффектов перорального применения живых бактерий *B. subtilis* (25), но не в качестве векторных штаммов с иммуномодулирующими свойствами.

Интересно, что даже инактивированные споры *B. subtilis* способны стимулировать мукозальный иммунитет при вакцинации (16). Споры *B. subtilis*, действуя как потенциальные адъюванты вакцины (16, 18), синергетически обеспечивали антиген-специфические иммунные ответы против вируса птичьего гриппа H5N1 у кур белый леггорн. Это указывает на наличие у *B. subtilis* молекул, обладающих самостоятельным иммуномодулирующим действием, в том числе без активной инвазии бактериальных клеток через слизистые барьеры.

Вовлечение Treg клеток (regulatory T cells, suppressor T cells — центральные регуляторы иммунного ответа) в формирование поствакцинального иммунитета (21) несет риски быстрого снижения напряженности иммунитета, особенно при пероральной вакцинации, что может быть следствием неудачного подбора адъюванта, стимулирующего эти клетки (21, 26). Известно, что масляные адъюванты не подходят для индукции Т-клеточных ответов, которые необходимы для образования Т- или В-клеток памяти (17), поэтому необходимы новые адъюванты и рецептуры адъювантов вакцины, в том числе, возможно, на основе *B. subtilis*.

Споры *B. subtilis* могут индуцировать экспрессию провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и IL-6 в клетках врожденного иммунитета — моноцитах и макрофагах. Эти цитокины играют решающую роль не только в контроле и устранении вторгающихся патогенов, но также в провоцировании активации адаптивных иммунных клеток, таких как Т-клетки, особенно дифференцировки Th1 и Th17 (10, 26, 27). Было высказано предположение, что высокая экспрессия провоспалительных цитокинов при лечении спорами *B. subtilis* связана с повышенной устойчивостью к вирусной инфекции (28, 29). Например, коммерческая вакцина с масляным адъювантом не может вызывать сильный Т-клеточный ответ по сравнению с тем, который индуцируется H5N1 с *B. subtilis* в качестве адъюванта (16). Этот результат согласуется с исследованием, демонстрирующим способность спор *B. subtilis* повышать уровень Т-клеточного ответа (5, 8).

*B. subtilis* преимущественно рассматривается в научной литературе в качестве штамма-продуцента антигена (для производства рекомбинантных

вакцин инъекционного применения) (19) либо в качестве пробиотического штамма (25). Споры *B. subtilis* определяют иммунные ответы Th1 и Th17, но не ответы Th2 при повторной стимуляции препаратом H5N1 (16, 18). Это позволяет предположить, что антиген-специфические Т-клеточные ответы могут быть оптимальными для противовирусного или антибактериального эффектов (30-32). Считается, что иммунные ответы Th1 необходимы при вирусной инфекции. Известно, что IL-17 вызывает аутоиммунные заболевания или антибактериальные иммунные ответы (27), но также сообщается, что он играет роль в противовирусных иммунных ответах (30, 33). Согласно исследованиям на мышах (33), адьюванты со спорами могут вызывать специфические для легких иммунные ответы при введении в виде интраназальных вакцин (28). Поэтому, по нашему мнению, перспективны дальнейшие исследования *B. subtilis* в качестве основы вакцин, действующих через различные слизистые барьеры в организме.

Обсуждая перспективы *B. subtilis* как вектора, следует учитывать опыт использования энтерококков и лактококков в качестве средств доставки рекомбинантных антигенов в вакцинах перорального применения. Назальная иммунизация мышей штаммом *Lactobacillus casei*, экспрессирующим N-терминальный участок PspA, приводила к образованию анти-PspA IgG в сыворотке, которые защищали животных от последующей пневмококковой инфекции (31). Разработана вакцина против Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (ЕНЕС), вызывающей уремический синдром. Он становится причиной острой почечной недостаточности у детей и пожилых людей. В своей вакцине авторы использовали безопасный пробиотический штамм *Lactococcus lactis*, который может служить векторным организмом для пероральной вакцинации (4, 34). В работе М. Ahmed с соавт. (4) создан рекомбинантный штамм *Lactococcus lactis* с экспрессируемым геном *EspB* антигена ЕНЕС.

К недостаткам этого подхода следует отнести высокий риск развития пищевой иммунотолерантности, поскольку многие представители лактобактерий и энтерококков обладают способностью подавлять иммунитет к собственным антигенам, стимулируя выработку IL-10. Чаще всего лактобактерии, наиболее родственные энтерококкам, снижают иммунореактивность организма или препятствуют реализации некоторых реакций иммунной системы провоспалительного характера, что, видимо, необходимо для предотвращения элиминации лактобактерий из кишечника. Различные компоненты лактобактерий оказывают разные эффекты. Так, экзополисахариды *Lactobacillus rhamnosus* стимулируют выработку провоспалительных медиаторов в макрофагах *in vitro*, и они же подавляют продукцию антиколлагеновых антител у мышей и развитие гуморального иммунного ответа на альбумин (35).

Показано, что интраперитонеальное и внутривенное введение *L. casei* также подавляет ряд иммунологических реакций провоспалительного характера, в частности реакции гистиоцитов и базофил-зависимые реакции воспаления *in vitro* и *in vivo*. Важный компонент стенки лактобактерий — Surface layer proteins (Slps), белок, обеспечивающий взаимодействие с коллагеном, фибронектином, ламинином и адгезию *L. amylovorus* на поверхности слизистой желудочно-кишечного тракта у свиней (34). Можно ожидать, что образование антител к этому поверхностному белку-адгезину способно резко снизить интенсивность колонизации слизистой оболочки кишечника некоторыми энтероадгезивными лактобактериями. Любопытно, что разные типы Slps индуцируют разные типы иммунологических реакций. Так, SlpA индуцирует выработку дендритными клетками IL-10 (противовоспалитель-



ного цитокина) и снижение синтеза провоспалительного цитокина IL12p70, связываясь с рецептором дендритных клеток DC-SIGN. Лактобактерии, лишённые SlpA, но обладающие SlpB, стимулируют выработку провоспалительных цитокинов, таких как IL-12, TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$  (36).

Таким образом, многие штаммы *Bacillus subtilis* характеризуются наличием инвазивности. По нашему мнению, именно это свойство вида — основной фактор, определяющий большинство иммуностимулирующих эффектов пробиотиков, содержащих микроорганизмы *B. subtilis*. Эта же особенность полезна для транспортировки вакцинных антигенов через слизистые оболочки, но наши исследования показали, что иммуногенность и способность преодолевать пищевую толерантность именно у *B. subtilis* обусловлена не только инвазивностью. Среди изученных культур *B. subtilis* образование антител вызывали 71,42 %. Образование антител также стимулировали культуры других видов: *B. atrophaeus* B8, изолят B23, отнесенный к *B. zhangzhouensis*/*B. pumilus*/*B. safensis*, штамм *B. licheniformis* B10. Потенциал пробиотических штаммов на основе микроорганизмов рода *Bacillus* в качестве носителей рекомбинантных вакцинных антигенов представляется нам более перспективным по сравнению с микроорганизмами родов *Lactobacillus* и *Lactococcus*.

<sup>1</sup>ФГБУН Сибирский федеральный научный центр  
агробиотехнологий РАН,  
630501 Россия, Новосибирская обл., Новосибирский р-н,  
р.п. Краснообск,  
e-mail: tbc2009@yandex.ru, kastrolog@mail.ru, ariskina91@mail.ru,  
fill555@mail.ru, lisocim@mail.ru ✉, anks22@mail.ru;

Поступила в редакцию  
26 июля 2023 года

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО Новосибирский государственный  
аграрный университет,

630039 Россия, г. Новосибирск ул. Добролюбова, 160,  
e-mail: sagnuk@mail.ru, yana\_demeshonok@mail.ru;

<sup>3</sup>ФГБУН Институт химической биологии

и фундаментальной медицины СО РАН,  
630090 Россия, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 8,  
e-mail: ulona79@mail.ru, mishukova\_olga@inbox.ru;

<sup>4</sup>ФГБОУ ВО Новосибирский государственный  
университет,

630090 Россия, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 1,  
e-mail: doa19950912@gmail.com

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2024, V. 59, № 4, pp. 814-825

## IMMUNOGENICITY AND INVASIVENESS OF THE GENUS *Bacillus* MICROORGANISMS WITH ORAL ADMINISTRATION

N.A. Donchenko<sup>1, 2</sup>, Yu.N. Kozlova<sup>3</sup>, V.Yu. Koptev<sup>1, 2</sup>, F. Yan<sup>4</sup>, Yu.S. Khomenko<sup>1</sup>,  
E.V. Nefedova<sup>1</sup>, V.N. Afonyushkin<sup>1, 2, 3</sup> ✉, O.V. Mishukova<sup>3</sup>, L.P. Ermakova<sup>2</sup>, K.V. An<sup>1, 4</sup>,  
Ya.V. Novik<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Siberian Federal Scientific Center of Agro-BioTechnologies RAS, r.p. Krasnoobsk, Novosibirskii District, Novosibirsk Province, 630501 Russia, e-mail tbc2009@yandex.ru, kastrolog@mail.ru, ariskina91@mail.ru, fill555@mail.ru, lisocim@mail.ru (✉ corresponding author), anks22@mail.ru;

<sup>2</sup>Novosibirsk State Agrarian University, 160, ul. Dobrolubova, Novosibirsk, 630039 Russia, e-mail sagnuk@mail.ru, yana\_demeshonok@mail.ru;

<sup>3</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, 8, pr. Akademika Lavrentieva, Novosibirsk, 630090 Russia, e-mail ulona79@mail.ru, mishukova\_olga@inbox.ru;

<sup>4</sup>Novosibirsk State University, 1, ul. Pirogova, Novosibirsk, 630090 Russia, e-mail doa19950912@gmail.com

ORCID:

Donchenko N.A. [orcid.org/0000-0002-0885-0515](https://orcid.org/0000-0002-0885-0515)

Kozlova Yu.N. [orcid.org/0000-0003-0811-8110](https://orcid.org/0000-0003-0811-8110)

Koptev V.Yu. [orcid.org/0000-0003-0537-6659](https://orcid.org/0000-0003-0537-6659)

Yan F. [orcid.org/0000-0002-8322-3124](https://orcid.org/0000-0002-8322-3124)

Khomenko Yu.S. [orcid.org/0009-0001-2740-6612](https://orcid.org/0009-0001-2740-6612)

Nefedova E.V. [orcid.org/0000-0003-0248-6879](https://orcid.org/0000-0003-0248-6879)

Afonyushkin V.N. [orcid.org/0000-0001-5177-4733](https://orcid.org/0000-0001-5177-4733)

Mishukova O.V. [orcid.org/0000-0003-4628-9949](https://orcid.org/0000-0003-4628-9949)

Ermakova L.P. [orcid.org/0000-0003-2828-3957](https://orcid.org/0000-0003-2828-3957)

An K.V. [orcid.org/0009-0003-0354-1697](https://orcid.org/0009-0003-0354-1697)

Novik Ya.V. [orcid.org/0000-0002-7366-0988](https://orcid.org/0000-0002-7366-0988)

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Carried out within the framework of the state assignments of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (NSAU No. 123121500008-1 and ICBFM SB RAS No. 121031300043-8)

Final revision received July 26, 2023

doi: 10.15389/agrobiology.2024.4.814eng

Accepted October 09, 2023

## Abstract

Immunomodulatory effects of genus *Bacillus*-based probiotics result from the ability of *Bacillus* to penetrate through the mucous membranes of the gastrointestinal tract into the bloodstream. Creation of recombinant *Bacillus*-based vaccines with antigens of the most significant and antigenically variable viral and bacterial agents of farm animals (poultry, pigs and cattle) is prospective. The problem of oral vaccination is the nutritional immunotolerance which is due to the involvement of CD4+ and CD8+/Treg lymphocytes in adaptive events that suppress the immune response to the administered antigen. The article for the first time indicates that the invasiveness of the genera *Bacillus* and *Geobacillus* strains is important but not the only factor of their immunogenicity. It was found that both *B. subtilis* and *B. atrophaeus* could be vectors to deliver recombinant antigens. Our objective was to search for *Bacillus* strains with optimal invasiveness and immunogenicity when used per or and without effects of food immunotolerance. *Bacillus* strains were provided by the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS (ICBFM SB RAS) (22 cultures) and LLC SibAF (Berdsk) (7 cultures). Bacteria were identified by Sanger sequencing of 16S ribosomal RNA. The strains were incubated in 3 % tryptic-soybean broth (TSB), 0.5 % yeast extract (YE) and on 1.5% Bacto agar (BD Biosciences, USA) at 37 °C for 16 h. Bacterial cells were inactivation by heating at 65 °C for 3 h and furacilin adding to a concentration of 0.1 %. Cultures of 29 strains were tested for in vivo immunogenicity in F<sub>1</sub> hybrid mice (A/Sn × Balb/C). Animals were orally fed 200 µl of culture fluid of microorganisms of *Bacillus* and *Geobacillus* genera at a concentration of 0.7 McF, three times every 7 days. After 3 weeks, blood was sampled for serologic studies. Immunogenicity and invasiveness were evaluated in agglutination test of blood sera with fluorescently labeled O-antigens. Invasiveness upon oral administration was evaluated by a bioassay on 10-day-old Shaver cross chickens (*Gallus gallus* L.). Every day for 10 days chickens were administered orally a 1-day culture of the tested microorganism at a dose of 200 µl (1 billion CFU/ml). The chickens were slaughtered on day 11, and the bacterial insemination of muscle, liver and heart tissues was assed using meat-peptone agar and meat-peptone broth. Invasiveness of *Bacillus* strains were tested on C57Black mice. The animals were orally administered 100 µl of bacterial culture once a day for two consecutive days. On day 3, the animals were slaughtered and liver and heart tissue samples were tested using Eugonic agar, meat-peptone agar and meat-peptone broth. For Oil spreading assay of biosurfactant activity, the culture fluid was diluted with distilled water and added with 20 µl of oil. Distilled water was a negative control and SDS (1 % v/v) was a positive control. Destruction of the oil slick was considered a positive test. Only 27.5 % of *Bacillus* cultures generated production of antibody to their own corpuscular antigens during oral administration to F<sub>1</sub> (A/Sn × Balb/C) mice. Among the *B. subtilis* cultures studied, 71.42 % induced antibody synthesis. Other species which stimulated antibody production were *B. atrophaeus* B8, isolate B23 attributed to *B. zhangezoulensis*/*B. pumilus*/*B. safensis*, and *B. licheniformis* B10. Most tested microorganisms did not cause production of antibodies to their own antigens. *B. mucooides*/*B. weihenstephanensis* B31, *B. simplex* B32, *B. thuringiensis* B20, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* 2-15, *Bacillus* spp. 1'-37-7 had a pathogenic effect with 25 to 50 % death of mice. In all chicks administered orally with the *Bacillus* cultures, 100 % of breast and thigh muscles, 96 and 52 % of liver and heart, respectively, were contaminated. Invasiveness for mice was assessed by detection of microorganisms in liver and heart samples 18 h after the last oral administration. *Bacillus* spp. B56, *Bacillus* spp. B50, *B. atrophaeus* B8, and *B. safensis* B23 consistently showed invasiveness. However, antibodies were detected only to *B. atrophaeus* B8 and *B. safensis* B23. B23 and B24 isolates of *B. zhangezoulensis*/*B. safensis*/*B. pumilus*, and *B. atrophaeus* B8 had biosurfactant activity. No statistically significant association between biosurfactant propertied and invasiveness is found in the analyzed sample. Thus, the potential of probiotic *B. subtilis* strains as carriers of recombinant vaccine antigens seems to us the most promising.

Keywords: *Bacillus*, spore-forming probiotics, immunofluorescent agglutination test, vaccination, immunogenicity, invasiveness, feed vaccines, recombinant vaccines, vector strain.

## REFERENCES

1. Blokhina E.A., Ravina I.V. *Voprosy virusologii*, 2018, 63(3): 130-135 (doi: 10.18821/0507-4088-2018-63-3-130-135) (in Russ.).
2. Koptev V.Yu., Ladeyshchikova E.E., Kozeneva V.S. *Pittevodstvo*, 2018, 8: 47-48 (in Russ.).
3. Afonyushkin V.N., Donchenko N.A., Koptev V.Yu., Fudi Ya., Barsukova E.N., Kozlova O.S. *Veterinariya*, 2022, 11: 28-34 (doi: 10.30896/0042-4846.2022.25.11.28-34) (in Russ.).

4. Ahmed M., Loos D., Vanrompay E., Cox E. Oral immunization with *Lactococcus lactis*-expressing EspB induces protective immune responses against *Escherichia coli* O157:H7 in a murine model of colonization. *Vaccine*, 2014, 32(31): 3909-3916 (doi: 10.1016/j.vaccine.2014.05.054).
5. Amuguni H., Zipori S. *Bacillus subtilis*: a temperature resistant and needle free delivery system of immunogens. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2012, 8(7): 979-986 (doi: 10.4161/hv.20694).
6. Afonyushkin V.N., Kechin A.A., Tromenshleger I.N., Filipenko M.L., Smetanina M.A. Determination of cell concentrations in stationary growing *Lactobacillus salivarius* cultures in relation to formation of biofilms and cell aggregates. *Microbiology*, 2017, 86(6): 793-798 (doi: 10.7868/S0026365617060039).
7. Das K., Mukherjee A.K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, 2007, 98(7): 1339-1345 (doi: 10.1016/j.biortech.2006.05.032).
8. Plaza-Diaz J., Ruiz-Ojeda F.J., Gil-Campos M., Gil A. Mechanisms of action of probiotics. *Advances in Nutrition*, 2019, 10(suppl\_1): S49-S66 (doi: 10.1093/advances/nmy063).
9. Ahiwe E.U., Abdallah M.E., Chang'a E.P., Omede A.A., Al-Qahtani M, Gausi H. Graham H., Iji P.A. Influence of dietary supplementation of autolyzed whole yeast and yeast cell wall products on broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2020, 33(4): 579-587 (doi: 10.5713/ajas.19.0220).
10. Barnes A.G.C., Cerovic V., Hobson P.S., Klavinskis L.S. *Bacillus subtilis* spores: a novel micro-particle adjuvant which can instruct a balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen. *Eur. J. Immunol.*, 2007, 37(6): 1538-1547 (doi: 10.1002/eji.200636875).
11. OFS.1.7.2.0012.15 *Proizvodstvennyye probioticheskie shtammy i shtammy dlya kontrolya probiotikov* [OFS.1.7.2.0012.15 Production probiotic strains and strains for probiotic control]. Available: <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-7-2-0012-15-proizvodstvennyye-probioticheskie-shtammy-i-shtammy-dlya-kontrolya-probiotikov/#:~:text=1.7.2.0012.15>. No date (in Russ.).
12. Hassanshahian M. Isolation and characterization of biosurfactant producing bacteria from Persian Gulf (Bushehr provenance). *Marine Pollution Bulletin*, 2014, 86(1-2): 361-366 (doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.06.043).
13. Khomenko Yu.S., Nefedova E.V., Kozlova O.S., Afonyushkin A.V., Afonyushkin V.N. *Innovatsii i prodovol'stvennaya bezopasnost'*, 2022, 3(37): 102-106 (in Russ.).
14. De Souza R.D., Batista M.T., Luis W.B., Cavalcante R.C.M., Amorim J.H., Bizerra R.S.P., Martins E.G., de Souza Ferreira L.S. *Bacillus subtilis* spores as vaccine adjuvants: further understanding of the mechanisms of action. *PLoS ONE*, 2014, 9(1): e87454 (doi: 10.1371/journal.pone.0087454).
15. Ermakova L.P., Mench I.K., Scheptulja Ju.S., Barsukova E.N., Nozdryn G.A. Effect of various doses of probiotic Vetom 1 comprised of a *Bacillus subtilis* strain on relative weights of some internalorgans in Pharaon quails. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, 2021, 10(4): 102-104.
16. Song M., Hong H.A., Huang J.M., Colenatt S., Khan D.D., Nguyen TV, Pak S.M., Shim B.S., Song H.H., Cheong Y.S., Chan J.E., Choi J.A., Choi Y.K., Stadler K., Cutting S.M. Killed *Bacillus subtilis* spores as a mucosal adjuvant for an H5N1 vaccine. *Vaccine*, 2012, 30(22): 3266-3277 (doi: 10.1016/j.vaccine.2012.03.016).
17. Cox J.C., Coulter A.R. Adjuvants — classification and overview of their modes of action. *Vaccine*, 1997, 15(3): 248-256 (doi: 10.1016/s0264-410x(96)00183-1).
18. Lee B.-J., Kwon H.-i., Kim E.-H., Park S.-J., Lee S.-H., Choi Y.-K., Kim S.-H. Assessment of mOMV adjuvant efficacy in the pathogenic H1N1 influenza virus vaccine. *Clin. Exp. Vaccine Res.*, 2014, 3(2): 194-201 (doi: 10.7774/cevr.2014.3.2.194).
19. Paccetz J.D., Nguyen H.D., Luiz W.B., Ferreira R.C., Sbrogio-Almeida M.E., Schuman W., Ferreira L.C. Evaluation of different promoter sequences and antigen sorting signals on the immunogenicity of *Bacillus subtilis* vaccine vehicles. *Vaccine*, 2007, 25(24): 4671-4680 (doi: 10.1016/j.vaccine.2007.04.021).
20. Tarahomjoo S. Recent approaches in vaccine development against *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2014, 24(4): 215-227 (doi: 10.1159/000365052).
21. Reed S.G., Bertolet S., Kohler R.N., Friede M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in Immunology*, 2009, 30(1): 23-32 (doi: 10.1016/j.it.2008.09.006).
22. Reid S.G., Orr M.T., Fox C.B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nature Medicine*, 2013, 19(12): 1597-1608 (doi: 10.1038/nm.3409).
23. He H., MacKinnon K.M., Genovese K.J., Kogut M.H. CpG oligodeoxynucleotide and double-stranded RNA interact with each other, increasing the production of nitric oxide and the expression of mRNA of inducible nitric oxide synthase, pro-inflammatory cytokines and chemokines in chicken monocytes. *Innate Immunity*, 2011, 17(2): 137-144 (doi: 10.1177/1753425909356937).
24. Lee B.B., Yang T.S., Goo D., Choi H.S., Pitarg F.M., Jung H., Keel D.Y. Effect of dietary  $\beta$ -mannanase supplementation on the additivity of true metabolizable energy values for broiler diets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2018, 31(4): 564-568 (doi: 10.5713/ajas.17.0785).
25. Ma Y., Wang W., Zhang X., Wang J., Zhang W., Gao J., Wu S., Qi G. Supplemental *Bacillus*

- subtilis* DSM 32315 manipulates intestinal structure and microbial composition in broiler chickens. *Scientific Representative*, 2018, 8: 15358 (doi: 10.1038/s41598-018-33762-8).
26. Vogel F.R. Immunological adjuvants for modern vaccines. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1995, 754(1): 153-160 (doi: 10.1111/j.1749-6632.1995.tb44448.x).
  27. Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T.B., Oukka M., Weiner H.L., Kuchro V.K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 2006, 441: 235-238 (doi: 10.1038/nature04753).
  28. Pulendran B., Ahmed R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell*, 2006, 124(4): 849-863 (doi: 10.1016/j.cell.2006.02.019).
  29. 29Schiffer C., Lalanne A.I., Cassard L., Mancardi D.A., Malbec O., Bruhns P., Dif F., Daeron M. A strain of *Lactobacillus casei* inhibits the effector phase of immune inflammation. *J. Immunol.*, 2011, 187(5): 2646-2655 (doi: 10.4049/jimmunol.1002415).
  30. Lee W.-W., Kang S.W., Choi J., Li S.-H., Shah K., Einon E.E., Flavell R.A., Kang I. Regulating human Th17 cells via differential expression of IL-1 receptor (doi: 10.1182/blood-2009-08-236521).
  31. Stephen-Victor E., Sharma V.K., Das M., Karnam A., Saha C., Lecerf M., Galeotti C., Kaveri S.V., Bayry J. IL-1 $\beta$  but not programmed death-1 pathway and programmed death ligand pathway, has a critical significance for the human Th17 response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Front. Immunol.*, 2016, 7: 465 (doi: 10.3389/fimmu.2016.00465).
  32. Hamada H., Garcia-Hernandez Mde L., Reome J.B., Misra C.K., Strutt T.M., McKinstry K.K., Cooper A.M., Swain S.L., Dutton R.W. Tc17, a unique subset of CD8 T cells that may protect against deadly influenza infection. *J. Immunol.*, 2009, 182(6): 3469-3481 (doi: 10.4049/jimmunol.0801814).
  33. Hong J.E., Kee Y.S., Park S.M., Cheon I.S., Choo H., Park B.-C., Park Y.M., Chang J., Cho J.-H., Song M.K., Khan S., Yun S.-N. Alveolar macrophages treated with *Bacillus subtilis* spores protect mice infected with respiratory syncytial virus A2. *Front. Microbiol.*, 2019, 10: 447 (doi: 10.3389/fmicb.2019.00447).
  34. Jakava-Viljanen M., Palva A. Isolation of surface (S) layer protein carrying *Lactobacillus* species from porcine intestine and faeces and characterization of their adhesion properties to different host tissues. *Veterinary Microbiology*, 2007, 124(3-4): 264-273 (doi: 10.1016/j.vetmic.2007.04.029).
  35. Ciszek-Lenda M., Nowak B., Śróttek M., Górska-Frączek S., Gamian A., Marcinkiewicz J. Immunosuppressive effect of systemic administration of *Lactobacillus rhamnosus* KL37C-derived exopolysaccharide on the OVA-specific humoral response. *Central European Journal of Immunology*, 2012, 37(4): 338-344 (doi: 10.5114/ceji.2012.32722).
  36. Konstantinov S.R., Smidt H., de Vos W.M., Bruijns S.C., Singh S.K., Valence F., Molle D., Lortal S., Altermann E., Klaenhammer T.R., van Kooyk Y. S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(49): 19474-19479 (doi: 10.1073/pnas.0810305105).