

ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ ПЕРОРАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ОРНИТОБАКТЕРИОЗА ПТИЦ

⁴Ф. Ян, аспирант

^{1,2,3}В.Н. Афонюшкин, кандидат биологических наук

¹В.Ю. Коптев, кандидат ветеринарных наук

²Я.В. Новик, кандидат ветеринарных наук

²Л.П. Ермакова, кандидат ветеринарных наук

¹Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН, р.п. Краснообск Новосибирской обл., Россия

²Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия

³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

⁴Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

E-mail: lisocim@mail.ru

Ключевые слова: *Ornithobacterium rhinotracheale*, оральная вакцина, *Bacillus subtilis*, эпитоп, OR77, челночный вектор.

Реферат. Работа выполнена на базе лаборатории фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и в секторе молекулярной биологии Сибирского федерального научного центра агробиотехнологий РАН. ДНК *Ornithobacterium rhinotracheale* была предоставлена птицефабриками Республики Мордовия Российской Федерации. У пораженных птиц наблюдались воспалительные изменения в гортани, верхней части трахеи и инфраорбитальных синусах, в дыхательных мешках – сгустки фибрина. Патологический материал субкультивировали на сердечно-мозговом бульоне в присутствии антибиотиков. Анализ субклеточной локализации белка OR77 проводился с помощью метода SignalP-6.0. Для поиска В-зависимых эпитопов гена OR77 использовалась база данных иммунных эпитопов (IEDB). Праймеры для клонирования конструировались, моделировался процесс клонирования участков гена OR77, содержащих В-зависимые эпитопы, путем лигирования *Bam*HI, *Hind*III в полилинкер челночного вектора *pBE-S*. Проведены эксперименты по клонированию активной эпитопной последовательности белка OR77 *O. rhinotracheale* в *Bacillus subtilis*, применению его в пероральной форме для выявления иммунной активности и других возможных побочных реакций. Анализ нуклеотидной последовательности проводили с помощью программы *UniproUGENEv*. Осуществлена процедура амплификации. Описана перспектива возможного синтеза новой недорогой и эффективной в эксплуатации вакцины против возбудителя *O. rhinotracheale*.

PROSPECTS FOR THE CREATION OF AN ORAL VACCINE AGAINST ORNITHOBACTERIOSIS OF BIRDERS

⁴F. Jan, PhD student

^{1,2,3}V.N. Afonyushkin, PhD in Biological Sciences

¹V.Yu. Koptev, PhD in Veterinary Sciences

²Ya.V. Novik, PhD in Veterinary Sciences

²L.P. Ermakova, PhD in Veterinary Sciences

¹Siberian Federal Scientific Center of Agrobiotechnologies RAS, pos. Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia

²Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

³Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

⁴Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

E-mail: lisocim@mail.ru

Keywords: *Ornithobacterium rhinotracheale*, oral vaccine, *Bacillus subtilis*, epitope, OR77, shuttle vector.

Abstract. The work was carried out at the pharmacogenomics laboratory of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences and in the molecular

biology sector of the Siberian Federal Scientific Center for Agrobiotechnologies of the Russian Academy of Sciences. *Ornithobacterium rhinotracheale* DNA was provided by poultry farms of the Republic of Mordovia of the Russian Federation. In affected birds, inflammatory changes were observed in the larynx, upper part of the trachea and infraorbital sinuses, and fibrin clots were observed in the respiratory sacs. Pathological material was subcultured in brain heart broth in the presence of antibiotics. Analysis of subcellular localisation of the OR77 protein was carried out using the SignalP-6.0 method. The immune epitope database (IEDB) was used to search for B-dependent epitopes of the OR77 gene. Primers for cloning were designed, and cloning regions of the OR77 gene containing B-dependent epitopes were simulated by ligating BamHI and HindIII into the polylinker of the shuttle vector pBE-S. Experiments were carried out to clone the active epitope sequence of the *O. rhinotracheale* OR77 protein in *Bacillus subtilis* and use it orally to identify immune activity and other possible adverse reactions. Nucleotide sequence analysis was performed using the UniproUGENEv program. The amplification procedure was carried out. The prospect of the possible synthesis of a new, inexpensive, and effective vaccine against the pathogen *O. rhinotracheale* is described.

Ornithobacterium rhinotracheale является возбудителем орнитобактериоза, который вызывает расстройство дыхания, задержку роста и даже смерть, в основном поражая индеек и кур [1]. Куриное мясо занимает первое место в мире по потреблению, и такой опасный патоген заслуживает особого внимания [2].

Бактерии вида *O. riumrhinotracheale* сравнительно недавно признали в качестве патогенного возбудителя заболевания респираторных путей у значительного числа цыплят и индеек [3].

O. rhinotracheale – грамотрицательная, неподвижная, не образующая спор бактерия, принадлежащая к суперсемейству γРНКV и семейству Flavobacteriaceae. По данным литературы, выделено более 18 серотипов (A-R). Первое сообщение об орнитозе было сделано в Германии в 1981 г. [4]. По сравнению с другими патогенами, по *O. rhinotracheale* было опубликовано очень мало исследований, хотя это очень угрожающее заболевание. Присутствие данного патогена на птицефабриках игнорируется, отсутствуют надлежащие диагностические протоколы, не применяются адекватные меры изоляции и неправильно используются antimicrobные препараты, что приводит к неудачному лечению.

Учитывая, что большинство изолятов *O. rhinotracheale* выработали устойчивость к широко используемым лекарствам, иммунизация является лучшим методом профилактики или контроля инфекции *O. rhinotracheale* [5].

На протяжении многих лет проводились исследования различных новых вакцин. В нашем исследовании мы решили выбрать пероральную вакцину с живыми бактериями в качестве носителя. Мы считаем, что пероральное введение легко осуществимо на практике, а также может стимулировать мукозальный иммунитет [6].

Среди носителей пероральных вакцин *Bacillus subtilis* признан относительно экологически чистым носителем, обладающим эффективной системой секреции белков и адаптивным метаболизмом, а также способным производить споры в относительно суровых условиях [7]. Это свойство спор может быть использовано для повышения стабильности и многократного использования вакцин в относительно сложных условиях [8]. Технология отображения поверхности спор успешно применяется в различных производствах, включая вакцины [9].

Кроме того, исследование, проведенное А.А. Al-Seraih et al. [10], показало, что штамм *B. subtilis* обладает пробиотическими свойствами, что делает его подходящей добавкой к рациону домашней птицы. Таким образом, мы считаем, что *B. subtilis* является очень подходящим вектором для разработки вакцины.

Липопротеин Or77 является секретлируемым белком [10]. D.F. Schuijffel et al. [11, 12] показали, что в исследованных штаммах нескольких серотипов этот ген присутствует и высококонсервирован, а очищенный Or77 вызывает мощный перекрестный защитный иммунный ответ.

Цель работы – обосновать применение липопротеина Or77 при использовании *B. subtilis* в качестве вектора для разработки пероральной рекомбинантной вакцины.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнена на базе лаборатории фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и в секторе молекулярной биологии Сибирского федерального научного центра агробιοтехнологий РАН.

Нуклеотидные последовательности *O. rhinotracheale* были получены из базы данных GenBank после предварительного анализа литературных данных об известных протективных антигенах *O. rhinotracheale* различных серотипов. Анализ нуклеотидной последовательности проводили с помощью программы UniproU-GENEv. 43.0, выравнивание последовательности – с помощью AlignX в VectorNTI 8. Модель белка получена из базы данных UniPort [13].

Анализ субклеточной локализации белка OR77 проводился с помощью метода SignalP-6.0 [14].

Для поиска В-зависимых эпитопов гена OR77 использовалась база данных иммунных эпитопов (IEDB) [15].

Далее были сконструированы праймеры для клонирования и смоделирован процесс клонирования участков гена OR77, содержащих В-зависимые эпитопы, путем лигирования BamHI, HindIII в полилинкер челночного вектора pBE-S.

ДНК *O. rhinotracheale* была предоставлена птицефабриками Республики Мордовия Российской Федерации. У пораженных птиц наблюдались воспалительные изменения в гортани, верхней части трахеи и инфраорбитальных синусах, в дыхательных мешках – сгустки

фибрина. Патологический материал субкультивировали на сердечно-мозговом бульоне в присутствии антибиотиков ванкомицина (50 мкг/мл) и гентамицина (30 мкг/мл).

Образцы, положительные в диагностическом ПЦР-тесте, использовались для клонирования. ПЦР проводили традиционными методами на амплификаторе «Терцик» (ООО «ДНК-Технология», Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При исследовании потенциальных антигенов *O. rhinotracheale* мы выбрали липопротеины, белок OR77, следуя литературным данным [12].

Последовательность белка, использованная в данном исследовании, – AIC32820.1, соответствующая последовательность ДНК – KJ621039, 3D-моделирование высоко сходной последовательности белка A0A060IFZ8 (другой серотип), существующей в швейцарской модели (рис. 1), а также выравнивание последовательностей A0A060IFZ8 и AIC32820.1 представлены на рис. 2. Высокая степень сходства показала высокую степень консервативности среди различных серотипов.

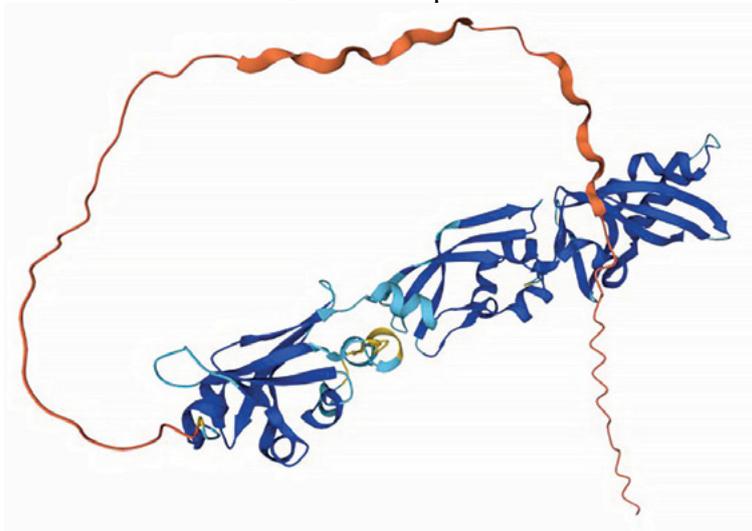


Рис. 1. OR77 из базы данных. Швейцарская модель (UniProt)
OR77 from the database. Swiss model (UniProt)

Примечание. Доверие к модели: темно-синий – очень высокое (pLDDT > 90); светло-синий – уверенное (90 > pLDDT > 70); желтый – низкое (70 > pLDDT > 50); красный – очень низкое (pLDDT < 50)

Note. Confidence in the model: dark blue – very high (pLDDT > 90); light blue – confident (90 > pLDDT > 70); yellow – low (70 > pLDDT > 50); red – very low (pLDDT < 50)

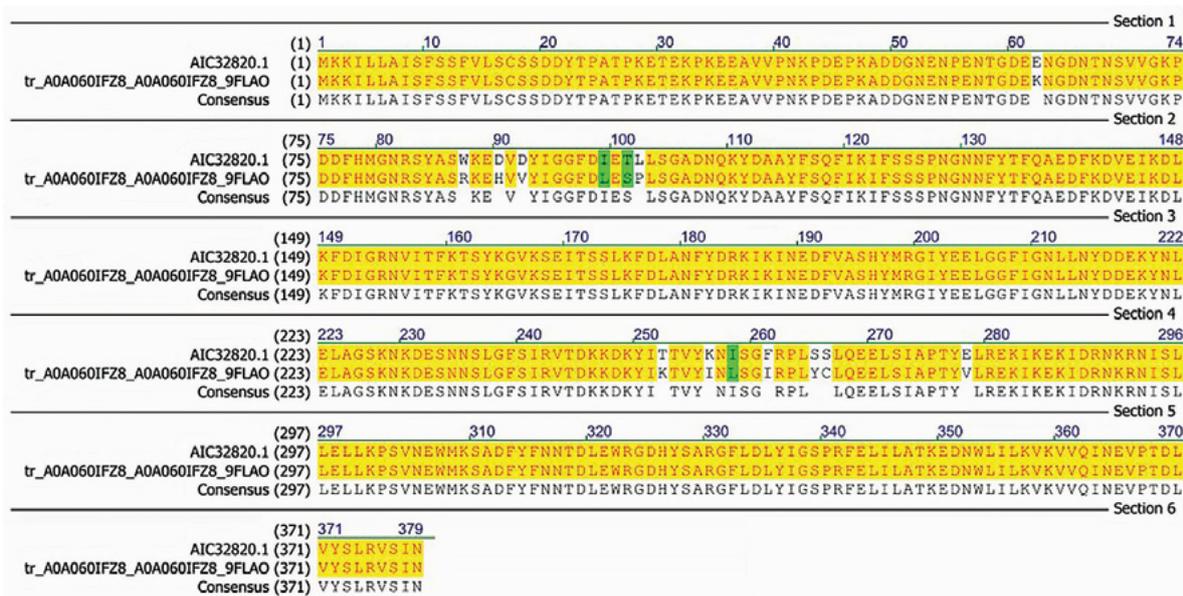


Рис. 2. Выравнивание A0A060IFZ8 и AIC32820.1
Alignment of A0A060IFZ8 and AIC32820.1

Примечание. Желтая часть представляет точное совпадение, зеленая часть – неполное совпадение, но аминокислотные остатки одного класса

Note. The yellow part represents an exact match, and the green part represents an incomplete match, but amino acid residues are of the same class.

Здесь мы используем компьютерный дизайн вакцин для предсказания полученных эпитопов-кандидатов (т.е. антигенной детерминанты) [15].

После некоторого периода отбора мы выбрали белок OR77 в качестве носителя для разработанной вакцины (рис. 3).

Согласно результатам биоинформатического анализа, 5 В-клеточных эпитопов были обнаружены в позициях 19-79, 215-220, 227-234, 244-251 и 286-292 аминокислотных остатков OR77 (табл. 1).

```
>AIC32820.1 Or77 [Ornithobacterium rhinotracheale]
MKKILLAISFSSFVLSCSDDYTPATPKETEKPKKEEAVVPNKPDEPK
ADDGNENPENTGDEENGDNNTNSVVGKPD DDFHMGNRSYASWKED
VDYIGGFDIETLLSGADNQKYDAAYFSQFIKIFSSSPNGNNFYTFQA
EDFKDVEIKDLKFDIGRNVITFKTSYKGVKSEITSSLKFDLANFYDRK
IKINEDFVASHYMRGIYEELGGFIGNLLNYDDEKYNLELAGSKNKDE
SNSNLGFSIRVTDKDKDYITTVYKNISGFRPLSSLQEELSIAPTYELR
EKIKEKIDRNKRNISLLELLKPSVNEWMKSA DFYFNNTDLEWRGDH
YSARGFLDLYIGSPRFELILATKEDNWLILKVKVQINEVPTDLVYSL
RVSIN
```

Рис. 3. Локализация В-клеточных эпитопов lmb по данным биоинформатического анализа
Localisation of B-cell epitopes of lmb, according to bioinformatics analysis

Примечание. Сегменты В-клеточного эпитопа отмечены синим цветом

Note. B cell epitope segments are marked in blue.

Аминокислотные и нуклеотидные последовательности В-эпитопов OR77 из *O. Rhinotracheale*
Amino acid and nucleotide sequences of OR77 B epitopes from *O. rhinotracheale*.

№	Последовательности нуклеотидов	Аминокислотные последовательности
1	AGTGATGATTACACTCCAGCCACACCTAAAGAAAACAGAAAAGCCTA AGGAAGAGGCTGTGGTTCCAAATAAGCCAGATGAACCAAAGGCTGA TGATGGAAACGAAAATCCAGAAAACACTGGAGATGAAGAGAATGG AGATAATACAACTCCGTTGTCGGGAAGCCTGATGATTTCCACATG	SDDYTPATPKETEKPKEEAVVPNKP DEPKADDGNENPENTGDEENGDN TNSVVGKPPDFHM
2	TACGACGATGAGAAATAC	YDDEKY
3	TCAAAAAACAAAGATGAATCCAAT	SKNKDESN
4	ACAGATAAAAAAGATAAGTAT	TDKKDKYI
5	AAAATAGATAGAAATAAAGA	KIDRNKR

Был проведен анализ субклеточной локализации белка OR77 с использованием метода SignalP-6.0 [14]. Результаты, приведенные на рис. 4, показывают, что белок действительно является секретлируемым белком, первая 16-17 аминокислотная последовательность может быть его сигнальным пептидом. Это также соответствует длинному В-клеточному эпитопу, начиная с аминокислоты 19 и далее на рисунке выше. Учитывая, что используемый нами вектор рВЕ-S содержит последовательность сигнального пептида *aprE SP*, не было

необходимости клонировать область сигнального пептида, поэтому мы смогли клонировать первую антигенную часть В-эпитопа непосредственно при конструировании праймеров. Затем мы использовали вектор рВЕ-S для импорта компоновки, содержащей эпитоп, в *B.subtilis*, и провели эксперименты на цыплятах, чтобы убедиться в наличии иммунного ответа у животных.

Праймеры, которые мы использовали для клонирования этого гена, приведены в табл. 2.

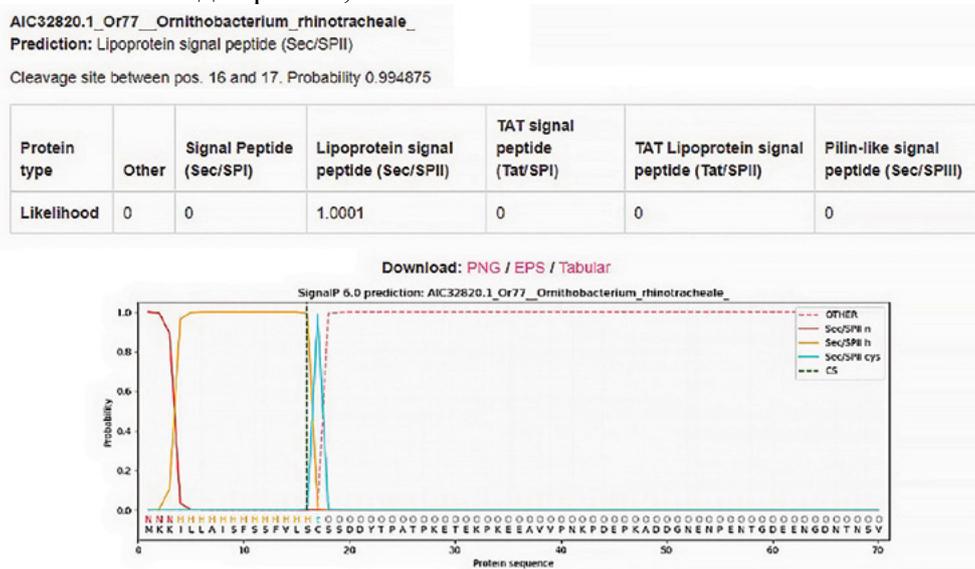


Рис. 4. Анализ субклеточной локализации белка OR77

Analysis of OR77 protein subcellular localisation

Примечание. n-область: n-концевая область сигнального пептида. Представлена для Sec/SPI, Sec/SPII, Tat/SPI и Tat/SPII. Обозначена как N; h-регион: центральная гидрофобная область сигнального пептида. Представлена для Sec/SPI, Sec/SPII, Tat/SPI и Tat/SPII. Обозначен как H; c-регион: C-концевая область сигнального пептида, указана для Sec/SPI и Tat/SPI; цистеин: консервированный цистеин в +1 участке расщепления липопротеинов, которая используется для липидирования. Обозначен как c; твин-аргининовый мотив: мотив двойного аргинина в конце n-области, характерный для сигнальных пептидов Tat. Обозначен как R.

Note. N-region: The N-terminal region of the signal peptide. Available for Sec/SPI, Sec/SPII, Tat/SPI and Tat/SPII. Designated as N; h-region: the central hydrophobic region of the signal peptide. Available for Sec/SPI, Sec/SPII, Tat/SPI and Tat/SPII. Designated as H; c-region: C-terminal region of the signal peptide, indicated for Sec/SPI and Tat/SPI; cysteine: conserved cysteine at the +1-lipoprotein cleavage site, which is used for lipidation. Denoted as c; twin-arginine motif: a double-arginine motif at the end of the n-region, characteristic of Tat signal peptides. It is designated as R.

Праймеры, применяемые в исследовании
Primers used in the study

№ n/n	Название	Последовательность
1	Fwd Or77_ORT	5'- gagGGATCCgcg AGTGATGA TTACA CTCCAGCCACACC -3'
2	Rev Or77_ORT	5'- gacAAGCTTggg CATGTGGA AATCATCAGGCTTCCC -3'

Примечание. Жирным шрифтом указана последовательность, необходимая для клонирования в плазмиды pBE-S с помощью рестриктазы BamH I и Hind III, обычным шрифтом обозначены последовательности, специфичные к участкам гена OR77; строчные буквы – защитные основания, заглавные буквы последовательности 1 – сайт разрезания фермента рестрикции BamHI, заглавные буквы последовательности 2 – сайт разрезания фермента рестрикции HindIII

Note. Bold font indicates the sequence required for cloning into pBE-S plasmids using BamH I and Hind III restrictase; regular font indicates sequences specific to regions of the OR77 gene; lowercase letters – protective bases, uppercase letters of sequence 1 – BamHI restriction enzyme cutting site, uppercase letters of sequence 2 – HindIII restriction enzyme cutting site.

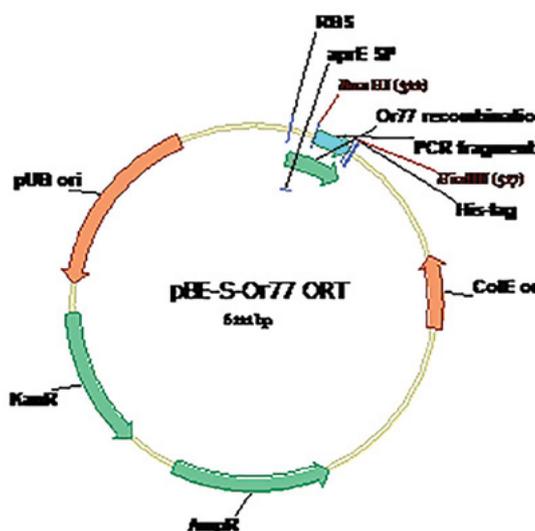


Рис. 5. Plasmid vector pBE-S map with insert OR77
Plasmid vector pBE-S map with insert OR77

Примечание. pUBori – ориджин для рода *Bacillus*, (сайт старта начала репликации плазмиды); ColE1 ori – ориджин для *E. coli*; KanR – ген устойчивости к канамицину (экспрессируется в бактериях рода *Bacillus*); AmpR – ген устойчивости к ампициллину (экспрессируется в *Escherichia coli*); His-tag – гистиридиновый хвост на никелевых колонках для выделения рекомбинантного белка; Hind III, BamHI – сайты рестрикции; OR77 recombination – фрагмент антигена OR77; aprESp – *B. subtilis* secretory signal peptide; RBS – промотерная область для экспрессии белка у микроорганизмов рода *Bacillus*.

Note. pUBori – origin for the genus *Bacillus* (start site for the start of plasmid replication); ColE1 ori – origin for *E. coli*; KanR – kanamycin resistance gene (expressed in bacteria of the genus *Bacillus*); AmpR – ampicillin resistance gene (expressed in *Escherichia coli*); His-tag – histidine tail on nickel columns for isolating recombinant protein; Hind III, BamHI – restriction sites; OR77 recombination – fragment of the OR77 antigen; aprESp – *B. subtilis* secretory signal peptide; RBS is a promoter region for protein expression in microorganisms of the genus *Bacillus*.

Процедура амплификации проводилась следующим образом: при температуре 95 °C в течение 3 мин, затем 30 циклов по 10 с при 95 °C, 67 °C в течение 30 с, 72 °C в течение 20 с.

Челночный вектор pBE-S способен экспрессировать рекомбинантный белок в клетках *B.subtilis*, а также имеет дополнительное начало

для репликации в клетках *E. coli*. Разработанные нами праймеры имеют дополнительные сайты рестрикции BamHI и Hind III, что позволяет клонировать найденные эпитопы в полилинкер этого вектора (рис. 5), включая их амплификацию из первичных изолятов *O. rhinotracheale* и патологического материала.

ВЫВОДЫ

1. Доказанная безопасность *B. subtilis* для человека и животных позволяет разрабатывать пробиотические препараты, которые можно использовать в качестве биологически активной добавки для бройлеров.

2. *B. subtilis* может стимулировать реакции специфического иммунитета и усиливать инвазивность через слизистые барьеры кишечника и носоглотки.

3. Проанализированные данные обосновывают возможность использования энтероинвазивных штаммов *B. subtilis* в качестве

пероральной вакцины, содержащей эпитопы рекомбинантного белка OR77, против орнитобактериоза.

Работа выполнена при поддержке Китайского стипендиального совета (CSC), гранта № 22-26-20118 Российского научного фонда «Изучение возможных механизмов формирования протективного иммунного ответа в отношении некоторых инфекционных агентов свиней и кур при пероральном введении штамма-продуцента антигенов на основе микроорганизмов рода *Bacillus*» и финансовой поддержке Министерства науки и инновационной политики Новосибирской области.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Numee S., Hauck R., Hafez H.M. Detection and typing of *Ornithobacterium rhinotracheale* from German poultry flocks // *Avian Dis.* – 2012. – Vol. 56, N 4. – P. 654–658.
2. *Meat Consumption and Sustainability* / Yilmaz Önal H. [et al.]; Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Derg. – 2021.
3. Курьянова Н.Х. Биологические свойства бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale* – возбудителей орнитобактериоза птиц // Научный вестник Технологического института – филиала ФГБОУВПО Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина. – 2013. – № 11. – С. 60–64. – EDN: QBCWLH.
4. *Ornithobacterium rhinotracheale*: An update review about an emerging poultry pathogen / E.V. Barbosa [et al.] // *Vet Sci.* – 2020. – Vol. 7, N 1.
5. *In vitro* susceptibility of *Ornithobacterium rhinotracheale* to several antimicrobial drugs / V.E. Soriano [et al.] // *Avian Dis.* – 2003. – Vol. 47, N 2. – P. 476–480.
6. *Oral* administration of a streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues / Czerkinsky C. [et al.] // *Infect Immun.* – 1989. – Vol. 57, N 4. – P. 1072–1077.
7. *Bacillus subtilis*: A universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine / Su Y. [et al.] // *Microb Cell Fact. BioMed Central.* – 2020. – Vol. 19, N 1. – P. 1–12.
8. Hagemann M. Computers Aid Vaccine Design // *Science* (80-). – 2000. – Vol. 290, N 5489. – P. 80–82.
9. Chen H., Ullah J., Jia J. Progress in *Bacillus subtilis* Spore Surface Display Technology towards Environment, Vaccine Development, and Biocatalysis // *J Mol Microbiol Biotechnol.* – 2017. – Vol. 27, N 3. – P. 159–167.
10. *Effect* of *Bacillus subtilis* as a Probiotic on the Productive and Physiological Performance of Broilers / A.A. Al-Seraih [et al.] // *Arch Razi Inst.* – 2022. – Vol. 77, N 5. – P. 1647–1653.
11. *Successful* selection of cross-protective vaccine candidates for *Ornithobacterium rhinotracheale* infection / D.F. Schuijffel [et al.] // *Infect Immun.* – 2005. – Vol. 73, N 10. – P. 6812–6821.
12. *Vaccine* potential of recombinant *Ornithobacterium rhinotracheale* antigens / D.F. Schuijffel [et al.] // *Vaccine.* – 2006. – Vol. 24, N 11. – P. 1858–1867.
13. URL: <https://www.uniprot.org>. (дата обращения: 19.06.2023).
14. URL: <https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0>, (дата обращения: 19.06.2023).
15. URL: <https://www.iedb.org>. (дата обращения: 19.06.2023).

REFERENCES

1. Numee S., Hauck R., Hafez H.M., Detection and typing of *Ornithobacterium rhinotracheale* from German poultry flocks, *Avian Dis*, 2012, Vol. 56, No. 4, pp. 654–658.
2. Yilmaz Önal H. [et al.], *Meat Consumption and Sustainability*, *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarımve Doğa Derg*, 2021.

3. Kur'yanova N.H., *Nauchnyj vestnik Tekhnologicheskogo instituta – filiala FGBOU VPO Ul'yanovskaya GSKHA im. P.A. Stolypina*, 2013, No. 11, pp. 60–64, EDN: QBCWLH. (In Russ.)
4. Barbosa E.V. [et al.], *Ornithobacterium rhinotracheale*: An update review about an emerging poultry pathogen, *Vet Sci.*, 2020, Vol. 7, No. 1.
5. Soriano V.E. [et al.], In vitro susceptibility of *Ornithobacterium rhinotracheale* to several antimicrobial drugs, *Avian Dis*, 2003, Vol. 47, No. 2, pp. 476–480.
6. Czerkinsky C. [et al.], Oral administration of a streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues, *Infect Immun*, 1989, Vol. 57, No. 4, pp. 1072–1077.
7. Su Y. [et al.], *Bacillus subtilis*: A universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine, *Microb Cell Fact. BioMed Central*, 2020, Vol. 19, No. 1, pp. 1–12.
8. Hagmann M., Computers Aid Vaccine Design, *Science (80-)*, 2000, Vol. 290, No. 5489, pp. 80–82.
9. Chen H., Ullah J., Jia J., Progress in *Bacillus subtilis* Spore Surface Display Technology towards Environment, Vaccine Development, and Biocatalysis, *J Mol Microbiol Biotechnol.*, 2017, Vol. 27, No. 3, pp. 159–167.
10. Al-Seraih A.A. [et al.], Effect of *Bacillus subtilis* as a Probiotic on the Productive and Physiological Performance of Broilers, *Arch Razi Inst*, 2022, Vol. 77, No. 5, pp. 1647–1653.
11. Schuijffel D.F. [et al.], Successful selection of cross-protective vaccine candidates for *Ornithobacterium rhinotracheale* infection, *Infect Immun*, 2005, Vol. 73, No. 10, pp. 6812–6821.
12. Schuijffel D.F. [et al.], Vaccine potential of recombinant *Ornithobacterium rhinotracheale* antigens, *Vaccine*, 2006, Vol. 24, No. 11, pp. 1858–1867.
13. <https://www.uniprot.org>. [data obrashcheniya 19.06.2023].
14. <https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0>. [data obrashcheniya 19.06.2023].
15. <https://www.iedb.org>. [data obrashcheniya 19.06.2023].