

# ACTIVITATEA ANTI-GRIPALĂ

## A UNEI TULPINI PROBIOTICE - BACILLUS SUBTILIS

Darya Starosila,<sup>a</sup> Svetlana Rybalko,<sup>a</sup> Ludmila Varbanetz,<sup>b</sup> Naila Ivanskaya,<sup>a</sup> Iryna Sorokulova<sup>c</sup>

Gromashevsky Institute of Epidemiology and Infectious Diseases, National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine; Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences, Kiev, Ukraine; Department of Anatomy, Physiology and Pharmacology, Auburn University, Auburn, Alabama, USA<sup>c</sup>

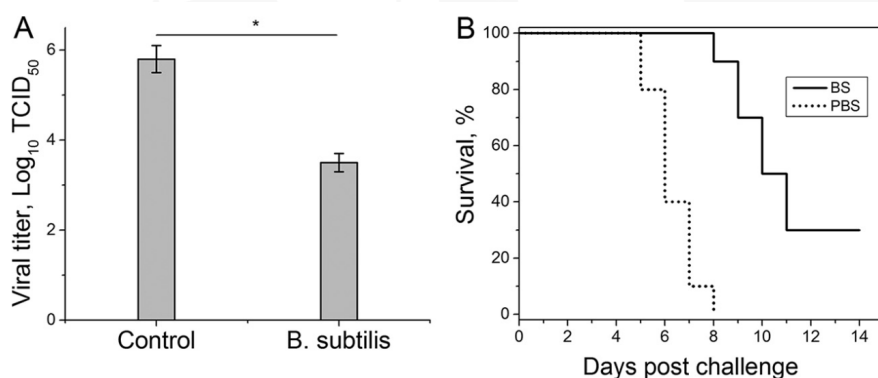
Primit 13 martie 2017 Retur pentru modificare  
28 Martie 2017 Acceptat 10 aprilie 2017  
Manuscris acceptat postat online la 17 aprilie 2017  
Citație Starosila D, Rybalko S, Varbanetz L, Ivanskaya N, Sorokulova I. 2017. Activitate anti-gripală a unei tulpini probiotice *Bacillus subtilis*. Agenți antimicrobieni Chemother 61 : e00539-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00539-17>. Copyright © 2017 Societatea Americană de Microbiologie. Toate drepturile rezervate. Adresă corespondență către Iryna Sorokulova, sorokib@auburn.edu.

TRADUS - CONAIR GROUP - 23.09.2020

**ABSTRACT** Dintre bacteriile *Bacillus*, *B. subtilis* este specia care produce cei mai mulți compuși antimicrobieni. În acest studiu, am analizat activitatea probioticului tulpina *B. subtilis* 3 împotriva virusului gripal. Efectul antiviral al acestei tulpini a fost demonstrat in vitro și in vivo. O nouă peptidă, P18, produsă de tulpina probiotică a fost izolată, purificată, sintetizată chimic și caracterizată. Studiile de citotoxicitate nu au demonstrat niciun efect toxic al P18 asupra celulelor rinichiului canin Madin-Darby (MDCK), chiar și la cea mai mare concentrație testată (100 g / ml). Inhibarea completă a virusului gripal in vitro a fost observată la concentrații de 12,5 până la 100 g / ml. Efectul protector al P18 la șoareci a fost comparabil cu cel al fosfatului de oseltamivir (Tamiflu). Studii suplimentare vor evalua potențialul peptidei P18 ca compus antiviral și ca un candidat promițător pentru dezvoltarea de noi vaccinuri antivirale.

**CUVINTE CHEIE** *Bacillus subtilis*, peptidă antivirală, virus gripal, probiotice

Bacteriile probiotice atrag multă atenție din partea oamenilor de știință și a medicilor ca instrumente importante pentru corectarea microbiotei și menținerea stării de sănătate a gazdei. Sunt cunoscute diferite mecanisme pentru efectele benefice ale probioticelor, cum ar fi producerea de substanțe antimicrobiene (1, 2), o reglare ascendentă a răspunsului imun și o reglare descendentă a răspunsului inflamator (3), stimularea secreției de mucus (4) și maturarea celulelor dendritice (5), o îmbunătățire a funcției barierei mucoasei intestinale și modularea expresiei genei gazdă (6). Bacteriile probiotice prezintă eficacitate în tratamentul și prevenirea diferitelor afecțiuni gastro-intestinale, inclusiv boala inflamatorie a intestinului, sindromul intestinului iritabil, enterocolita necrotizantă (7), diareea acută (8) și diareea asociată antibioticelor (9, 10). Noile aplicații ale probioticelor sunt concentrate pe condiții influențate de alterarea microbiotei intestinale, cum ar fi sindromul metabolic, obezitatea, dermatita atopică și tulburările de dispoziție (11). Bacteriile probiotice au fost testate pentru prevenirea și tratamentul infecțiilor virale. Diferite tulpini de *Bifidobacterium* și *Lactobacillus* au demonstrat efecte benefice în tratarea infecției cu rotavirus la animale și oameni (12-14). Unele bacterii probiotice administrate oral stimulează imunitatea respiratorie și cresc rezistența la infecțiile tractului respirator viral. Șoarecii infectați care primesc tratament oral sau intranasal cu tulpini de *Lactobacillus* au semne reduse de infecție gripală, titruri mai scăzute ale virusului în plămâni sau spălări nazale, greutate corporală crescută în timpul infecției și supraviețuire crescută (15). Eficacitatea bacteriilor probiotice în infecțiile tractului respirator a fost confirmată în studiile clinice la copii, adulți și persoane în vârstă (15). Deși studiile pe animale și studiile clinice demonstrează activități antivirale ale bacteriilor probiotice specifice, mecanismele acestor efecte sunt neclare.



**FIG 1** Activitatea antivirală a *B. subtilis* in vitro și in vivo. (A) Celulele MDCK au fost inoculate cu virusul gripal în urma tratamentului cu o tulpină *B. subtilis* (106 CFU per godeu). Titrurile virale au fost analizate prin titrare în celulele MDCK. \*,  $P < 0.05$ . (B) Șoarecii (10 pe grup) au primit o singură doză de *B. subtilis* (107 CFU pe șoarece) sau PBS prin gavaj oral. După 24 de ore, ambele grupuri de animale au fost infectate intranasal cu virusul gripal.

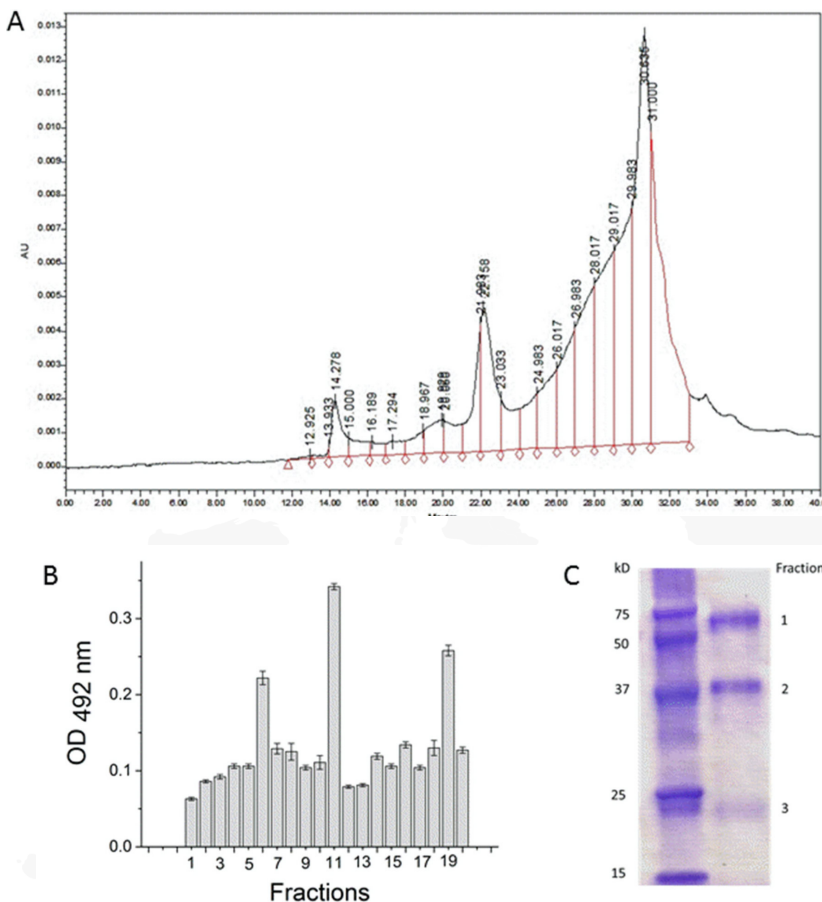
Supraviețuirea a fost monitorizată timp de 14 zile după infecție.

Studiul nostru anterior a arătat efecte benefice ale tulpinii probiotice *Bacillus subtilis* 3 în prevenirea și tratamentul infecțiilor bacteriene la modelele animale (16, 17) și în studiile clinice (8, 9). Activitatea antibacteriană a acestei tulpini probiotice a fost asociată cu producerea de antibiotice aminocoumarin cu un spectru larg de suprimare a agenților patogeni (18) și cu stimularea rezistenței imune a gazdei (19). Anterior, am constatat că unele bacterii pot produce peptide care imită hemaglutinina virusului gripal (20). Imitarea proteinelor oferă o modalitate de a găsi noi compuși terapeutici pentru tratamentul agenților patogeni (21). Bacteriile din genul *Bacillus* sunt considerate o sursă promițătoare în căutarea de noi substanțe inhibitorie datorită capacității lor de a produce un număr mare de peptide antimicrobiene (22). Acest studiu își propune să evalueze activitatea antivirală a probioticului *B. subtilis* 3 și să caracterizeze compușii RESULTSresponsabili pentru această activitate.

## REZULTATE

**Activitatea antivirală a *B. subtilis* 3 in vitro și in vivo.** Un studiu anterior de citotoxicitate nu a arătat niciun efect toxic al *B. subtilis* UCM B-5007 asupra celulelor rinichiului canin Madin-Darby (MDCK) la concentrații de 10<sup>7</sup> până la 10<sup>9</sup> CFU ml<sup>-1</sup> (datele nu sunt prezentate). Incubația virusului gripal cu bacterii *B. subtilis* a dus la o inhibare semnificativă a replicării virusului (Fig. 1A). Tulpina *B. subtilis* a fost, de asemenea, eficientă în prevenirea infecției gripale la animale. Șoarecii provocați cu o doză letală de virus gripal au început să moară în ziua 5 și toți au murit în ziua a 8-a. Pretratarea cu *B. subtilis* a protejat 30% din animale de o infecție letală (Fig. 1B).

**Izolarea și caracterizarea peptidelor *B. subtilis*.** Probele extrase de peptide au fost fracționate prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) și s-au obținut 20 de fracții (Fig. 2A). Fiecare fracție a fost analizată printr-un test imunosorbent legat de enzime (ELISA) folosind anticorpi împotriva peptidelor *B. subtilis*. Cea mai mare activitate de interacțiune cu anticorpi anti-mimetici peptidici a fost găsită în fracțiunea 11 (Fig. 2B). O analiză suplimentară a acestei fracțiuni prin electroforeză a arătat prezența a trei proteine cu mase moleculare de 55,1, 44,1 și 22,6 kDa (Fig. 2C). Fracțiunea 3, cu o masă moleculară de 22,6 kDa și care a exprimat cea mai mare activitate cu anti-*B. subtilis* anticorpi peptidici, a fost analizată în continuare prin ionizare prin desorbție cu laser asistată de matrice - timp de spectrometrie de masă de zbor (MALDI-TOF MS) (Fig. 3). Principalele proteine identificate în această fracție sunt prezentate în Tabelul 1. O analiză a secvențelor de proteine obținute împotriva bazei de date NCBI a relevat omologiile complete ale acestor proteine cu peptide cunoscute (Tabelul 1). Una dintre peptide, TVAAPSVFIFPPSDEQLK, sa dovedit a fi o componentă a anticorpului neutralizant al gripei A. Astfel, această peptidă a fost selectată pentru sinteza chimică pentru a evalua posibila sa activitate antivirală prin teste in vitro și in vivo.



**FIG 2** Izolarea și caracterizarea peptidelor *B. subtilis*. (A) Separarea prin HPLC a fracțiilor de proteine din *B. subtilis* 3. Peptidele (2 mg / ml) au fost aplicate pe o coloană TSKgel DEAE-5PW și fracțiunile au fost colectate prin eluție cu soluții de NaCl cu putere ionică crescătoare (0,01 și 1 M) cu 0,01 M Tris-HCl (pH 7,4). (B) Interacțiunile fracțiunii proteice cu anticorpi împotriva peptidelor din *B. subtilis* 3. Fiecare fracțiune peptidică colectată a fost uscată și analizată prin ELISA folosind anticorpi împotriva peptidelor *B. subtilis*. Fracțiunea 11 a prezentat cea mai mare activitate de interacțiune cu anticorpi. (C) Analiza electroforezei pe gel a fracțiunii 11. Omogenitatea fracției a fost analizată în poli-acrilamidă 12% împreună cu standardele de masă moleculară și colorate cu albastru Coomassie.

Caracterizarea și validarea peptidei sintetizate chimic TVAAP SVFIFPPSDEQLK. Identificarea peptidelor a fost confirmată prin analiza MALDI-TOF MS (Fig. 4). Studiile de citotoxicitate nu au demonstrat niciun efect toxic al acestei peptide, denumită P18, asupra celulelor MDCK (Fig. 5A), chiar și la cea mai mare concentrație testată (100g/ml). Nu s-au găsit degenerescențe celulare sau alte modificări morfologice după analiza microscopică a monostraturilor. Astfel, pentru alte experimente in vitro, peptidea a fost utilizată în concentrații cuprinse între 3,1 și 100g/ml. Peptida P18 a fost evaluată pentru capacitatea sa de a inhiba virusul gripal A / FM / 1/47 (H1N1)

in vitro. Inhibarea completă a virusului a fost observată la concentrații de 12,5 până la 100g/ml (Fig. 5B). Peptida P18 a redus semnificativ titrul viral la o concentrație de 6,2 µg / ml. Alte concentrații testate de P18 (3,1 și 1,6 µg / ml) nu au fost eficiente în inhibarea virusului.

**Eficacitatea P18 in vivo.** Activitatea peptidei P18 pentru prevenirea și tratamentul infecției gripale a fost testată la șoareci. Pe baza rezultatelor eficacității P18 împotriva virusului gripal din studiile in vitro, s-a utilizat o concentrație de 12,5g/ml pentru tratamentele la animale. Oseltamivir fosfat (Tamiflu) a fost folosit ca un control pozitiv în aceste experimente. Toți șoarecii tratați cu soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) și infectați cu un virus au prezentat semne clinice de infecție (blana ciufulită, postură încovoiată, mișcare încetinită, frisoane, respirație dificilă, anorexie, mișcare puțin sau deloc și paralizie și au fost muribunzii) și a murit în ziua 8 a experimentului (Fig. 6). Tratamentul animalelor cu P18 și fosfat de oseltamivir înainte de infecție (Fig. 6A) a dus la o protecție semnificativă în comparație cu martorul (30% și 80%, respectiv). O eficacitate semnificativă a P18 a fost observată la animalele care au fost tratate după inocularea virusului (Fig. 6B). O singură aplicare orală de P18 a protejat 80% dintre șoareci; rata de supraviețuire după tratamentul cu fosfat de oseltamivir a fost de 70%. Niciunul dintre animalele care au supraviețuit nu a prezentat semne vizibile de gripă. Titrurile virale din plămâni au fost semnificativ mai mici la șoarecii pretratați cu fosfat de oseltamivir decât la martori și la cei tratați cu P18 (Fig. 6C). Cu toate acestea, tratamentul șoarecilor cu P18 după infecție a fost mai eficient în eliminarea virusului decât fosfatul de oseltamivir (Fig. 6C).

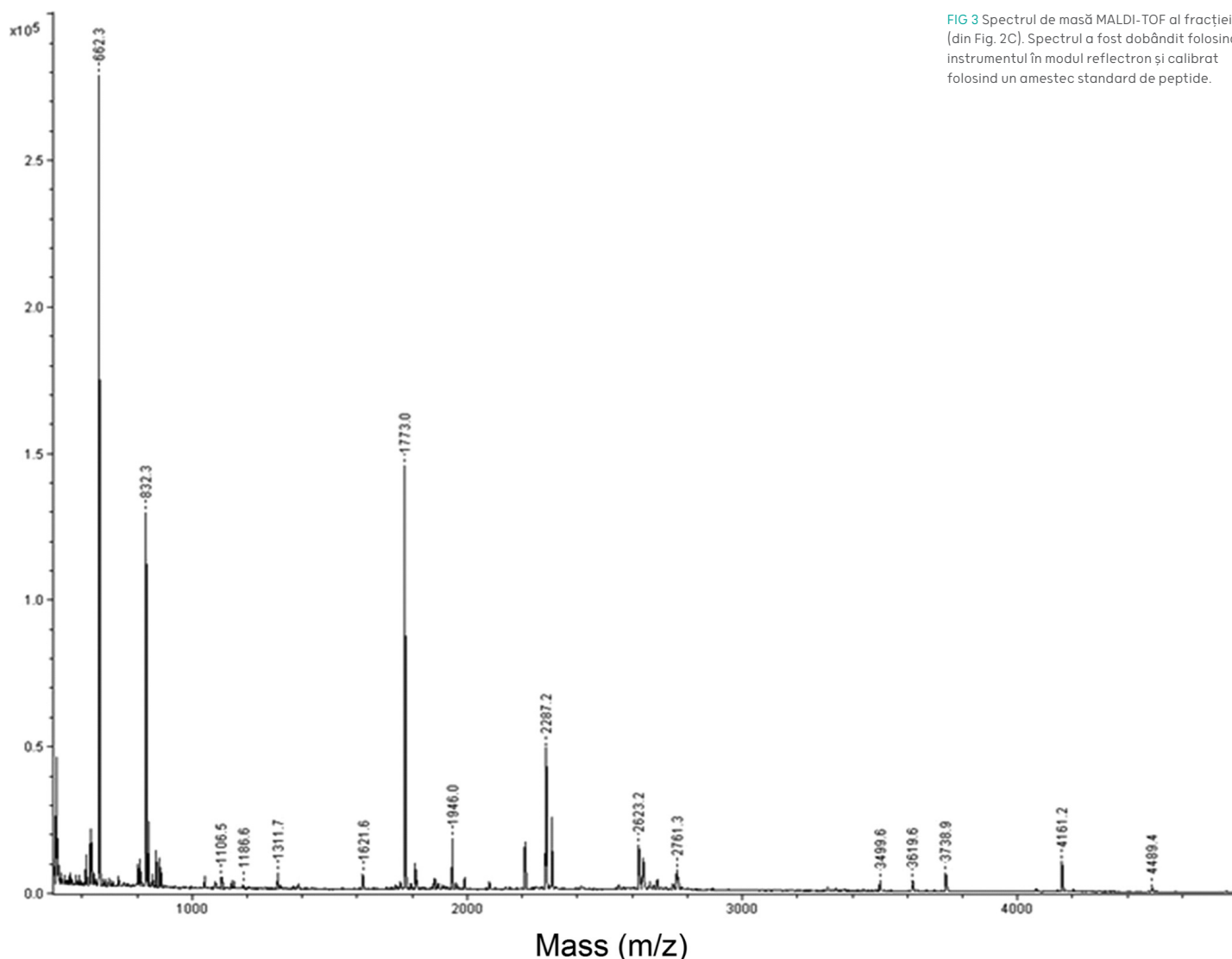


FIG 3 Spectrul de masă MALDI-TOF al fracției 3 (din Fig. 2C). Spectrul a fost dobândit folosind instrumentul în modul reflectron și calibrat folosind un amestec standard de peptide.

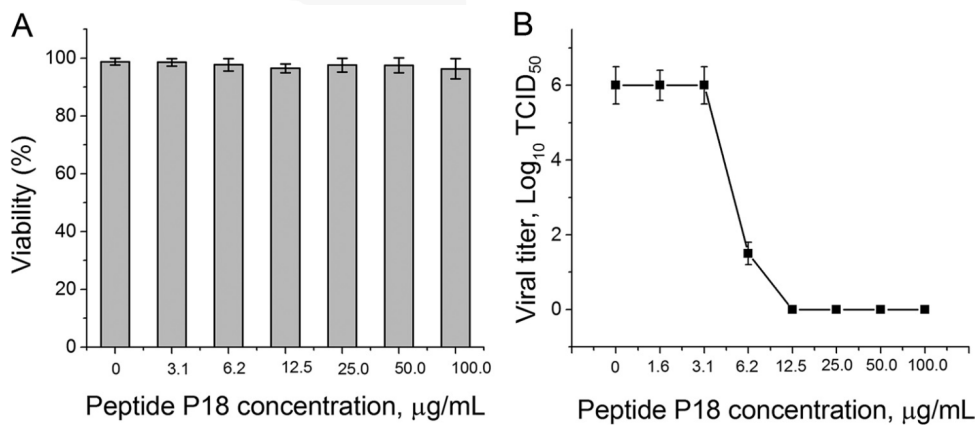
**TABLE 1** Characterization of proteins identified by MALDI-TOF MS

Molecular mass (kDa)	Peptide sequence	Source	Accession no.
17.73	SGTASVCLLNFFYPR	Chain A, crystal structure of the non-neutralizing HIV antibody	3MNV_A (PDB)
18.11	DIQMTQSPSSLSASVGDR	Immunoglobulin kappa light chain	BAC01680.1 (GenBank)
19.46	TVAAPSVFIFPPSDEQLK	Chain H, structure of influenza A neutralizing antibody	3ZTJ_H (PDB)
22.87	VDNALQSGNSGSEVTEQDSKSTYLSSTLTLSK	Chain L, structure of the antibody 7b2 that captures HIV-1 virions	4YDV_L (PDB)
37.38	VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK	Chain L, crystal structure of broadly neutralizing antibody	4NM4_L (PDB)
41.61	EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSK	Chain L, crystal structure of highly potent anti-HIV antibody	3RPI_L (PDB)

## DISCUȚIE

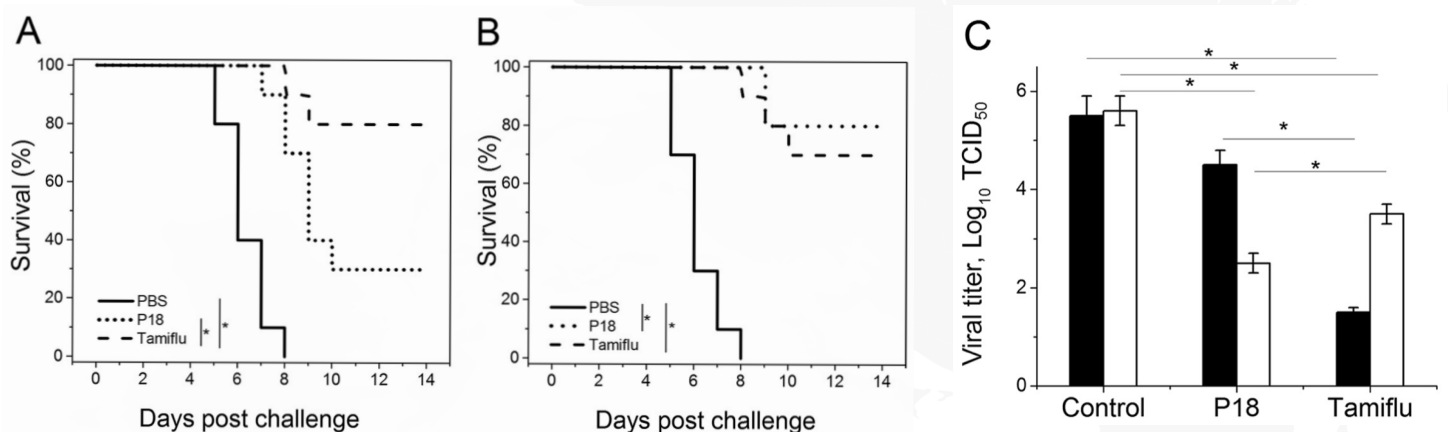
Gripa este încă o problemă semnificativă de sănătate, care duce la morbiditate și mortalitate ridicate în Statele Unite și în întreaga lume (23). Abordările terapeutice utilizate pentru prevenirea și tratamentul infecției gripale includ amantadina, inhibitorii neuraminazei (24) și vaccinurile (25). Cu toate acestea, unele dintre efectele adverse ale compușilor antivirali utilizați și dezavantajele vaccinării indică necesitatea unor terapii îmbunătățite și a tratamentului preventiv al infecției gripale. Au fost testate diferite alternative pentru combaterea virusului gripal. De exemplu, Ministerul Sănătății din China a recomandat utilizarea extractelor din unele plante naturale care au efecte imunomodulatoare benefice (26). Din ce în ce mai multe date științifice sugerează că bacteriile probiotice pot fi utilizate în mod eficient pentru a reduce riscul sau durata simptomelor gripei. Efectele benefice ale tulpinilor de *Lactobacillus* și *Bifidobacterium* au fost arătate în modele animale și în studiile clinice (15).

Studiul nostru a avut ca scop evaluarea eficacității antivirale a unei tulpini probiotice *B. subtilis*. Bacteriile au inhibat în mod semnificativ replicarea virusului gripal *in vitro* și au crescut rata de supraviețuire a șoarecilor supuși virusului după o singură doză de bacterii probiotice. Protecția șoarecilor împotriva virusului gripal prin pretratarea orală cu *Lactobacillus rhamnosus* M21 a fost raportată de Song și colab. (27). Autorii au tratat oral animale cu lactobacili timp de 2 săptămâni înainte de a le provoca o doză letală de virus. Într-un alt studiu, un tratament de 2 săptămâni folosind spori uciși de *B. subtilis* PY79 a protejat șoarecii de infecția gripală (28). Rata de protecție cu o singură doză de celule *B. subtilis* 3 vii a fost comparabilă cu rezultatele prezentate de Song și colab. (27) pentru *L. rhamnosus* M21.



**FIG 5** Caracterizarea peptidei P18. (A) Citotoxicitatea peptidei P18 a fost analizată prin testul MTT în celulele MDCK. Viabilitatea celulelor din godeurile de control (fără peptidă adăugată) a fost evaluată la 100%. Alte probe au fost normalizate la această valoare. (B) Monostratele de celule MDCK au fost infectate cu virusul gripal. După 1 oră de incubare, s-au adăugat diluții seriale ale peptidei P18 la godeuri și nu s-a adăugat nicio peptidă la godeurile de control. Titrurile virale au fost analizate la 3 zile după infecție prin titrare în celule MDCK.

Anterior, am constatat că unele bacterii pot produce peptide care imită hemaglutinina virusului gripal (20). Astfel, am decis să analizăm dacă mecanismul activității antivirale *B. subtilis* 3 este asociat cu producerea de peptide antivirale. Peptidele mimetice au fost izolate din mediul de cultură după 24 de ore de creștere a tulpinii probiotice. Analiza HPLC a relevat 20 de fracții care au fost testate în continuare cu anticorpi specifici. Frațiunea cu cea mai mare activitate a fost analizată de MALDI-TOF MS. Doar o peptidă din cele șase identificate sa dovedit a fi o componentă a gripei



**FIG 6** Eficacitatea peptidei P18 *in vivo*. Șoarecii au fost tratați cu PBS, P18 sau fosfat de osetamivir înainte de infecția cu virusul gripal (A) sau după infecție (B). În ziua 4 postinfecție, plămâniile de la trei șoareci din fiecare grup înainte de infecție (bare solide) și postinfecție (bare deschise) au fost îndepărtați, iar titrurile virale au fost evaluate în fiecare supernatant prin analiza TCID<sub>50</sub> în celulele MDCK (C). \*, P < 0,05.

Un anticorp neutralizant. Această peptidă (P18) a fost sintetizată chimic și testată in vitro și la animale. Inhibarea completă a virusului in vitro a fost observată la concentrații de 12,5 până la 100 g / ml. Bacilul bacterian este unul dintre cei mai mari producători de antimicrobiene. Din aceste bacterii au fost identificate peste 795 de antibiotice diferite, majoritatea de natură peptidică (29). Aceste antibiotice peptidice au un spectru larg de activitate, iar unele dintre ele au demonstrat activitate antivirală. Astfel, Torres și colab. (30) au caracterizat efectul virucid al bacteriocinei subtilozinei, produs de *B. amyloliquefaciens*, împotriva virusului herpes simplex. Surfactina și biosurfactanții produși de *B. subtilis* inhibă un spectru larg de virusi, inclusiv virusul Semliki Forest, virusul herpes simplex, herpesvirusul suid, virusul stomatitei veziculare, virusul imunodeficienței simiene, calicivirusul felin și virusul encefalomiocarditei murine (31). Autorii au afirmat că acțiunea antivirală a acestor compuși se datorează unei interacțiuni fizico-chimice a surfactantului activ cu membrană cu membrana lipidică a virusului.

Activitatea antivirală ridicată in vitro a surfactinei și fengicinei a fost confirmată și de alți oameni de știință (32). Testarea compușilor antivirali produși de bacteriile *Bacillus* au fost efectuate numai in vitro. Am studiat eficacitatea peptidei sintetizate P18 pentru profilaxia și tratamentul infecției gripale la animale. Tratamentul prealabil al șoarecilor cu P18 a dus la o îmbunătățire semnificativă a ratei de supraviețuire, dar fosfatul de oseltamivir a fost mai eficient, arătând protecție la 80% dintre șoareci. Eficacitatea terapeutică a P18 a fost foarte pronunțată în comparație cu cea a activității fosfatului oseltamivir (în proporție de 80% și 70% din protecția șoarecilor, în consecință). O nouă peptidă de 20-aminoacizi (EB) derivată din secvența semnal a factorului de creștere a fibroblastelor 4 a demonstrat un efect protector la șoareci după tratament intranasal 6 h postinoculare cu virusul gripal (33). Administrarea intranasală a peptidei EB a dus la o întârziere semnificativă a mortalității și a semnelor clinice la șoarecii tratați, dar toți șoarecii au murit în ziua 11 postinfecție.

O supraviețuire crescută a șoarecilor infectați cu virusul gripal a fost găsită după tratamentul intravenos cu o proteină de fuziune albuminotioredoxină 1 din ser uman recombinant (HSA-Trx) (34). Proteina testată nu a avut niciun efect asupra replicării virusului pulmonar la șoarecii infectați cu gripă. Autorii au presupus că valoarea terapeutică a HSA-Trx rezultă din inhibarea răspunsurilor celulare inflamatorii și suprimarea supraproduției de oxid nitric (NO) în plămâni. În experimentele noastre, pretratarea și posttratarea șoarecilor cu peptida P18 au scăzut semnificativ titrurile virusului gripal în plămânii șoarecilor. Rezultatele obținute au demonstrat că peptida P18 inhibă replicarea virusului gripal in vitro și in vivo. Din câte știm, este primul raport despre izolarea și identificarea unei peptide *Bacillus* cu activitate puternică împotriva virusului gripal. Peptida P18 are omologie completă cu structura anticorpului neutralizant al gripei A. Putem specula că mecanismul activității antivirale a acestei peptide este în asemănarea sa cu anticorpului neutralizant. Acest lucru este confirmat de rezultatele testelor in vivo, în care P18 a prezentat un efect protector mai mare pentru animale în modul de aplicare a tratamentului. Studiul mimicii moleculare oferă un concept nou pentru dezvoltarea de noi medicamente antivirale și dezvoltarea vaccinului (35).

În rezumat, am arătat activitatea probioticului tulpina *B. subtilis* 3 împotriva virusului gripal in vitro și la animale. O nouă peptidă, P18, produsă de tulpina probiotică a fost izolată și caracterizată. P18 a inhibat virusul gripal in vitro, iar efectul său protector la șoareci a fost comparabil cu cel al fosfatului de oseltamivir. Studii suplimentare vor evalua potențialul peptidei P18 ca compus antiviral și ca un candidat promițător pentru dezvoltarea de noi vaccinuri antivirale.

## MATERIALE SI METODE

**Declarație de etică.** Toate procedurile la animale au fost aprobate de către comisia de revizuire internă a Institutului Gromashevsky de Epidemiologie și Boli Infecțioase, Academia Națională de Științe Medicale din Ucraina, Kiev, Ucraina.

**Animale.** Au fost folosiți șoareci BALB / c în vârstă de patru până la 6 săptămâni (BMS, Kiev, UA). Animalele au fost adăpostite în condiții fără patogeni specifici și au fost aclimatizate timp de 2 zile la temperatura camerei  $21 \pm 1^\circ \text{C}$ , umiditate ( $50\% \pm 5\%$ ) și iluminare (12 ore pe zi / 12 ore pe noapte), cu acces gratuit la apă și alimente.

**Culturi celulare.** Celulele de rinichi canin Madin-Darby (MDCK) au fost obținute de la Institutul de Virologie Ivanovsky (Moscova, Rusia). Celulele MDCK au fost cultivate în mediul Eagle modificat (DMEM) al lui Dulbecco (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SUA) cu 10% ser fetal bovin (Corning, Manassas, VA, SUA) la  $37^\circ \text{C}$  într-un incubator cu 5%  $\text{CO}_2$ .

**Microorganism.** *Bacillus subtilis* 3 (UCM B-5007) a fost obținut din colecția ucraineană de microorganisme (Kiev, Ucraina) și s-a propagat pe agar nutritiv (HiMedia, Mumbai, India). Virusul gripal A / FM / 1/47 (H1N1) a fost obținut de la Institutul de Virologie Ivanovsky (Moscova, Rusia) și adaptat la șoareci prin trecere pulmonară în serie. Virusul gripal a fost propagat în celulele MDCK. După 72 de ore, celulele infectate cu virus au fost recoltate și depozitate la  $-80^\circ \text{C}$ . Titrurile virale au fost determinate prin analiza dozei infecțioase cu cultură tisulară de 50% (TCID<sub>50</sub>). Virusul gripal a fost titrat la șoareci înainte de utilizare. Dozele necesare pentru a obține 50% mortalitate (DL<sub>50</sub>) la 10 zile după infecție au fost determinate după infecția intranasală a 20 șoareci BALB / c per grup.

**Izolarea peptidelor.** Tulpina *B. subtilis* UCM B-5007 a fost cultivată în bulion de nutrienți (HiMedia, Mumbai, India) pe un agitator rotativ (400 rpm) la 37 ° C timp de 24 de ore. După centrifugare la 4.000 g timp de 15 minute la 4 ° C, 200 ml de supernatant au fost tratați cu etanol 96% într-un raport de 1: 1,5 timp de 20 ore la 4 ° C. Proba obținută a fost centrifugată la 5.000 μg timp de 15 minute și supernatantul a fost aruncat. Peleta a fost resuspendată în 40 ml etanol 60%, centrifugată la 5.000 μg timp de 15 minute și spălată cu PBS. Această procedură a fost repetată de trei ori. Sonda din PBS a fost încălzită la 100 ° C timp de 10 min într-o baie de apă și apoi centrifugată la 5.000 μg timp de 15 min. Conținutul de proteine din supernatante a fost analizat printr-un test Lowry. Supernatanții au fost folosiți ca peptide pentru imunizarea animalelor și purificare ulterioară.

**Anticorpi împotriva peptidelor *B. subtilis*.** Șoarecii au fost imunizați cu peptide izolate printr-o injecție subcutanată de 100g în 0,1 ml de PBS cu o injecție boost ulterioară după 4 săptămâni. Imunoglobulinele IgG totale au fost purificate prin cromatografie de afinitate cu proteină A Sefaroză (36).

**Purificarea peptidelor.** Peptidele au fost analizate și purificate prin Beckman System Gold HPLC (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Germania). Peptidele (2 mg / ml) au fost aplicate pe o coloană TSKgel DEAE-5PW (7,5 mm pe 75 mm). Frațiile au fost colectate prin eluare cu soluții de NaCl cu putere ionică crescătoare (0,01 și 1 M) cu 0,01 M Tris-HCl (pH 7,4). Fiecare fracțiune peptidică colectată a fost uscată, iar cele mai active fracții au fost identificate prin ELISA folosind anticorpi împotriva peptidelor *B. subtilis*. Cea mai activă fracție a fost analizată în poliacrilamidă 12% împreună cu standardele de masă moleculară și colorate cu albastru Coomassie, așa cum este descris în altă parte (37). Digestia enzimatică în gel a fost efectuată conform protocoalelor publicate (38, 39). Pe scurt, benzile proteice au fost excizate din gel, colorate cu albastru Coomassie și tăiate în cuburi (1 mm cu 1 mm). Cuburile de gel au fost destinate prin incubarea cu 100 ml de acetonitril 40% în 0,05 M bicarbonat de amoniu timp de 30 minute la 37 ° C cu vortexare ocazională. S-a adăugat acetonitril pur (500 μl) probelor și au fost incubate la temperatura camerei până când s-a terminat destinderea. Acetonitrilul a fost îndepărtat și bucățile de gel au fost uscate. Bucățile de gel uscate au fost acoperite cu tampon de digestie (12 μg / ml de tripsină în 0,05 M bicarbonat de amoniu) și lăsate să continue 12 ore la 37 ° C. Tamponul de extracție (50% [vol / vol] acetonitril, 1% [vol / vol] acid trifluoroacetic [TFA], 49% H<sub>2</sub>O) a fost adăugat pentru a obține raportul aproximativ de 1: 2 între volumele de digest și extracție, iar probele au fost incubate timp de 20 min la temperatura camerei.

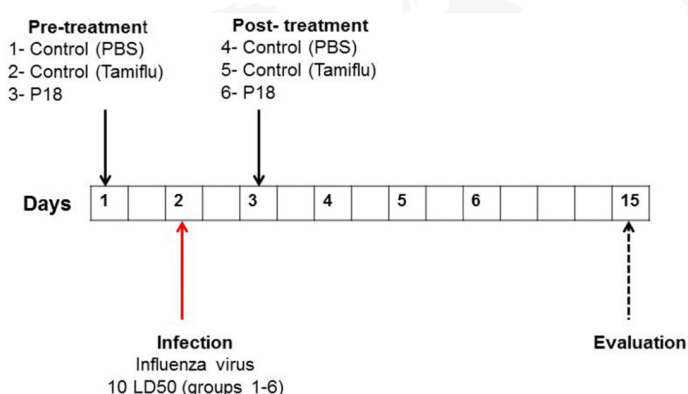
Pregătirea eșantionului pentru spectrometrie de masă (MS) cu ionizare prin desorbție cu laser asistată de matrice (MALDI) a fost efectuată folosind metoda picăturilor uscate conform unui protocol publicat (40). Pe scurt, 1 ofl din probă a fost pipetat pe placa de probă, amestecat cu 0,3 l de matrice și uscat la aer. Soluția matricială a fost preparată prin amestecarea unei soluții saturate de acid 2,5-dihidroxibenzoic în 50:50 H<sub>2</sub>O la acetonitril cu 0,1% TFA.

**Determinarea secvenței de aminoacizi a peptidei purificate.** Masa moleculară și secvența de aminoacizi a peptidei purificate au fost determinate cu MALDI-TOF MS (Ultraflex II, Bruker, Germania) așa cum este descris în altă parte (40). Spectrele au fost achiziționate folosind instrumentul în modul reflectron și calibrate folosind un amestec standard de peptide.

**Căutarea bazei de date și identificarea peptidelor.** Identificarea peptidelor a fost efectuată folosind un program Mascot (Matrix Science, SUA) căutând în baza de date NCBI.

**Sinteza peptidelor.** Secvența peptidică selectată TVAAPSVFIFPPSDEQLK a fost sintetizată de Metabion GmbH (Planegg, Germania) la cea mai mare puritate disponibilă (90%) folosind un sintetizator automat (Applied Biosystems 433A). Sintetizatorul a fost programat pentru un protocol standard de sinteză a peptidelor în fază solidă pe bază de fluorenilmetiloxi-carbonil (Fmoc). După finalizarea sintezei, peptida a fost scindată din rășină cu acid trifluoroacetic, purificată prin HPLC în fază inversă și analizată prin spectrometrie de masă MALDI.

**ELISA.** Godeurile unei farfurii ELISA cu 96 de godeuri au fost acoperite peste noapte la 4 ° C cu fracții proteice (2g / ml în tampon bicarbonat-carbonat, pH 9,6), au fost blocate cu lapte steril fără grăsimi timp de 1 oră la temperatura camerei, au reacționat cu anticorpi anti-peptidici timp de 1 oră la temperatura camerei și au fost spălați de 4 ori cu tampon (PBS plus 0,05% Tween 20). Anticorp IgG (gamma) de capră anti-șoarece (ser uman adsorbit și marcat cu peroxidază; Laboratoarele Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, MD) a fost adăugat și incubat 30 min la 37 ° C și vasul a fost spălat de 6 ori și tetrametilbenzidină (TMB) și hidrogen s-a adăugat peroxid în tampon citrat (pH 5,0). Reacția a fost oprită cu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. Densitatea optică a fost măsurată la 492/630 nm. Toate probele au fost testate în trei exemplare.



**FIG 7** Proiectare experimentală. Animalele au fost alocate a șase grupuri (13 șoareci în fiecare grup): (i) martor, pretratament PBS; (ii) control, pretratament cu fosfat de osetamivir; (iii) pretratamentul P18; (iv) control, posttratament PBS; (v) control, posttratament cu fosfat de osetamivir; (vi) P18 posttratament.

Cu o zi înainte de infecția cu virus, șoarecii de control al pretratării PBS au primit 0,2 ml PBS per os; șoarecii de control al pretratării fosfatului osetamivir au primit fosfat osetamivir (1 mg / kg) prin gavaj. Animalele de pretratament P18 au primit P18 (0,1 mg / kg) prin gavaj oral. Șoarecii din grupurile de post-tratament au fost infectați cu virusul gripal și, după 24 de ore, au fost tratați cu PBS, fosfat de osetamivir sau P18.

**Test de citotoxicitate.** Citotoxicitatea peptidei P18 a fost analizată printr-un test MTT [3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil -2H-tetrazol bromură] pe celule MDCK în plăci cu 96 de godeuri. Celulele au fost însămânțate la  $1 \times 10^4$  celule per godeu și incubate timp de 24 de ore la  $37^\circ\text{C}$  într-un incubator umidificat cu 5%  $\text{CO}_2$ . S-au adăugat cantități crescânde de peptidă (3,1 până la 100  $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) în fiecare godeu. Nu s-a adăugat nicio peptidă la godeurile de control. După 5 zile de tratament cu peptida, MTT (25  $\mu\text{l}$  la 5  $\text{mg} / \text{ml}$  în PBS) a fost adăugat la fiecare godeu și placa a fost incubată timp de 3 ore la  $37^\circ\text{C}$  într-o cameră umidificată. După incubare, soluția MTT a fost îndepărtată pentru a opri reacția și s-au adăugat 150  $\mu\text{l}$  de dimetil sulfoxid în fiecare godeu. Densitatea optică a fost măsurată la 570 nm folosind un cititor de microplăci (Bio-Tek, Winooski, VT). Viabilitatea celulelor din godeurile de control a fost evaluată la 100%. Alte probe au fost normalizate la această valoare. Pentru a confirma rezultatele MTT, monostraturile au fost, de asemenea, observate microscopic pentru a estima rotunjirea și alte modificări morfologice în comparație cu cele ale celulelor martor.

**Activitatea antivirală in vitro.** Monostraturile de celule MDCK din plăci cu 96 de godeuri au fost spălate de trei ori cu DMEM conținând 2  $\text{g} / \text{ml}$  tosilulfonil fenilalanil clorometil cetonă (TPCK) tripsină și au fost infectate cu virusul gripal (100 UI / godeu). După 1 oră de incubare la temperatura camerei, virusul neabsorbit a fost aruncat și mediu fără ser a fost adăugat la fiecare godeu. Diluții seriale de peptidă sau tulpină *B. subtilis* (10<sup>6</sup> CFU per godeu) au fost adăugate la godeuri și incubate la  $37^\circ\text{C}$  timp de 3 zile în incubator cu 5%  $\text{CO}_2$ . După incubare, titrurile virale din mediu au fost analizate prin titrare în celulele MDCK.

**Activitate antivirală in vivo. (i) *B. subtilis* UCM B-5007.** Două grupuri de șoareci (10 șoareci în fiecare grup) au fost utilizate în acest studiu. Un grup a primit o singură doză de *B. subtilis* (10<sup>7</sup> CFU în 0,1 ml PBS per șoarece) prin gavaj oral, în timp ce șoarecii din al doilea grup au primit 0,1 ml PBS per șoarece. După 24 de ore, animalele din ambele grupuri au fost infectate intranasal cu virusul gripal (25 I pentru fiecare nară, 10LD<sub>50</sub>). Ratele de supraviețuire au fost monitorizate până la 14 zile postinoculare.

**(ii) Peptida P18.** Animalele au fost alocate în șase grupuri (13 șoareci în fiecare grup): (i) control, pretratament PBS; (ii) control, pretratament cu fosfat de oseltamivir; (iii) pretratamentul P18; (iv) control, posttratament PBS; (v) control, posttratament cu fosfat de oseltamivir; (vi) P18 posttratament. Cu o zi înainte de infecția cu virus, șoarecii din grupul de control al pretratării cu PBS au primit 0,2 ml PBS per os, iar șoarecii din grupul de control al pretratamentului cu fosfat de oseltamivir au primit fosfat de oseltamivir (1  $\text{mg} / \text{kg}$ ) prin gavaj. Animalele din grupul de pretratament P18 au primit P18 (0,1  $\text{mg} / \text{kg}$ ) prin gavaj oral. Șoarecii din grupurile de post-tratament au fost infectați cu virusul gripal și, după 24 de ore, au fost tratați cu PBS, fosfat de oseltamivir sau P18 (Fig. 7). Pentru a induce infecția, șoarecii au fost ușor aneșteziți prin inhalare de izofluran și inoculați intranasal cu virusul gripal (25 I pentru fiecare nară, 10LD<sub>50</sub>). Șoarecii au fost observați pentru mortalitate timp de 14 zile. În ziua 15, șoarecii au fost eutanasiați prin asfixierea  $\text{CO}_2$ . În ziua 4 postinfecție, plămânii de la trei șoareci din fiecare grup au fost îndepărtați, cântăriți și omogenizați în DMEM rece. Omogenatele au fost centrifugate la 3.200  $\mu\text{g}$  timp de 5 minute la  $4^\circ\text{C}$  și titrurile virale au fost evaluate în fiecare supernatant prin analiza TCID<sub>50</sub> în celulele MDCK.

**Analize statistice.** Toate rezultatele sunt prezentate ca mijloace și abateri standard. Diferențele dintre grupuri au fost analizate prin teste t cu două eșantioane sau analiza unică a varianței (ANOVA) urmată de corectarea lui Bonferroni. Analiza supraviețuirii a fost efectuată utilizând curbele Kaplan-Meier și un test log-rank. Nivelul de semnificație a fost stabilit la 0,05 pentru a defini semnificația statistică. Calculele statistice și graficarea graficului au fost efectuate folosind Microcal Origin versiunea 9.0 (Northampton, MA) și Microsoft Excel 2010.

## MULȚUMIRI

Această lucrare a fost susținută de Academia Națională de Științe Medicale din Ucraina (către DS, SR și NI), Academia Națională de Științe din Ucraina (către LV) și fondul Universității Auburn FOP 101002-139294-2050 (către IS).

## REFERINȚE

1. Suskovic J, Kos B, Beganovic J, Pavunc AL, Habjanic K, Matoic S. 2010. Antimicrobial activity - the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technol Biotechnol* 48:296-307.
2. Sorokulova I. 2013. Modern status and perspectives of Bacillus bacteria as probiotics. *J Probiotics Health* 1:e106. <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000e106>.
3. Aureli P, Capurso L, Castellazzi AM, Clerici M, Giovannini M, Morelli L, Poli A, Pregliasco F, Salvini F, Zuccotti GV. 2011. Probiotics and health: an evidence-based review. *Pharmacol Res* 63:366-376. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2011.02.006>.
4. Caballero-Franco C, Keller K, De Simone C, Chadee K. 2007. The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: G315-G322. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00265.2006>.
5. Smits HH, Engering A, van der Kleij D, de Jong EC, Schipper K, van Capel TMM, Zaat BAJ, Yazdanbakhsh M, Wierenga EA, van Kooyk Y, Kapsen-berg ML. 2005. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin. *J Allergy Clin Immunol* 115:1260-1267. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.03.036>.
6. Reid G, Younes JA, Van der Mei HC, Gloor GB, Knight R, Busscher HJ. 2011. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nat Rev Microbiol* 9:27-38. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2473>.
7. Sanders ME, Guarner F, Guerrant R, Holt PR, Quigley EMM, Sartor RB, Sherman PM, Mayer EA. 2013. An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut* 62:787-796. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302504>.
8. Gracheva NM, Gavrilov AF, Solov'eva AI, Smirnov VV, Sorokulova IB, Reznik SR, Chudnovskaia NV. 1996. The efficacy of the new bacterial preparation biosporin in treating acute intestinal infections. *Zh Mikro- biol Epidemiol Immunobiol* 1996:75-77. (In Russian.)
9. Horosheva T, Vodyanov V, Sorokulova I. 2014. Efficacy of Bacillus probiotics in prevention of antibiotic-associated diarrhoea: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *JMM Case Rep* 2014:1. <https://doi.org/10.1099/jmmcr.0.004036>.
10. Szajewska H, Kolodziej M. 2015. Systematic review with meta-analysis: Lactobacillus rhamnosus GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children and adults. *Aliment Pharmacol Ther* 42:1149-1157. <https://doi.org/10.1111/apt.13404>.
11. Reid G. 2015. The growth potential for dairy probiotics. *Int Dairy J* 49:16-22. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.04.004>.
12. Kandasamy S, Vlasova AN, Fischer D, Kumar A, Chattha KS, Rauf A, Shao L, Langel SN, Rajashekara G, Saif LJ. 2016. Differential Effects of Esche- richia coli Nissle and Lactobacillus rhamnosus strain GG on human rotavirus binding, infection, and B cell immunity. *J Immunol* 196:1780-1789. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501705>.
13. Shornikova AV, Casas IA, Mykkanen H, Salo E, Vesikari T. 1997. Bacterio- therapy with Lactobacillus reuteri in rotavirus gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J* 16:1103-1107. <https://doi.org/10.1097/00006454-199712000-00002>.
14. Lee DK, Park JE, Kim MJ, Seo JG, Lee JH, Ha NJ. 2015. Probiotic bacteria, B longum and L acidophilus inhibit infection by rotavirus in vitro and decrease the duration of diarrhea in pediatric patients. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 39:237-244. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2014.09.006>.
15. Lehtoranta L, Pitkaranta A, Korpela R. 2014. Probiotics in respiratory virus infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33:1289-1302. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2086-y>.
16. Sorokulova IB, Kirik DL, Pinchuk IV. 1997. Probiotics against Campylo- bacter pathogens. *J Travel Med* 4:167-170. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8305.1997.tb00813.x>.
17. Sorokulova I. 2008. Preclinical testing in the development of probiotics: a regulatory perspective with Bacillus strains as an example. *Clin Infect Dis* 46:S92-S95. <https://doi.org/10.1086/523334>.
18. Pinchuk IV, Bressollier P, Verneuil B, Fenet B, Sorokulova IB, Megraud F, Urdaci MC. 2001. In vitro anti-Helicobacter pylori activity of the probiotic strain Bacillus subtilis 3 is due to secretion of antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 45:3156-3161. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.11.3156-3161.2001>.
19. Rybalko SL, Khristova ML, Shapiro AV, Varbanets LD, Zubkova NL, Zadorozhna VI, Ivans'ka NV, Sorokulova IB, Grytsak TF, Furzikova TM, Pinchuk IV, Patskovski YV, Diadiun ST, Smirnov VV, Urdaci MA. 2003. Usage of new bacterial adjuvants for vaccination by anti-influenza and anti-poliomyelitis vaccines. *Biopolym Cell* 19:262-269. <https://doi.org/10.7124/bc.00065A>.
20. Rybalko SL, Maximenok EV, Khristova ML, Shapiro AV, Varbanets LD. 2005. Carbohydrates biopolymers of bacteria mimic peptides of influ- enza virus and HIV. *Lab Diagn* 2:26-30.
21. Johnson MA, Pinto BM. 2008. Structural and functional studies of peptide-carbohydrate mimicry, p 55-116. In Peters T (ed), *Bioactive conformation II*, vol 273. Springer-Verlag Berlin, Berlin.
22. Sumi CD, Yang BW, Yeo IC, Hahn YT. 2015. Antimicrobial peptides of the genus Bacillus: a new era for antibiotics. *Can J Microbiol* 61:93-103. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0613>.
23. Shah NS, Greenberg JA, McNulty MC, Gregg KS, Riddell J, Mangino JE, Weber DM, Hebert CL, Marzec NS, Barron MA, Chaparro-Rojas F, Restrepo A, Hemmige V, Prasadhrathsint K, Cobb S, Herwaldt L, Raabe V, Cannavino CR, Hines AG, Bares SH, Antiporta PB, Scardina T, Patel U, Reid G, Mohazabnia P, Kachhdiya S, Le BM, Park CJ, Ostrowsky B, Robicsek A, Smith BA, Schied J, Bhatti MM, Mayer S, Sikka M, Murphy-Aguilu I, Patwari P, Abeles SR, Torriani FJ, Abbas Z, Taya S, Doktor K, Chakrabarti A, Doblecki-Lewis S, Looney DJ, David MZ. 2016. Bacterial and viral co-infections complicating severe influenza: incidence and impact among 507 U.S. patients, 2013-14. *J Clin Virol* 80:12-19. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2016.04.008>.
24. Abraham MK, Perkins J, Vilke GM, Coyne CJ. 2016. Influenza in the emergency department: vaccination, diagnosis, and treatment: clinical practice paper approved by American Academy of Emergency Medicine clinical guidelines committee. *J Emerg Med* 50:536-542. <https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2015.10.013>.
25. Belongia EA, Simpson MD, King JP, Sundaram ME, Kelley NS, Osterholm MT, McLean HQ. 2016. Variable influenza vaccine effectiveness by subtype: a systematic review and meta-analysis of test-negative design studies. *Lancet Infect Dis* 16:942-951. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00129-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00129-8).
26. Li JH, Wang RQ, Guo WJ, Li JS. 2016. Efficacy and safety of traditional Chinese medicine for the treatment of influenza A (H1N1): a meta- analysis. *J Chin Med Assoc* 79:281-291. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2015.10.009>.
27. Song JA, Kim HJ, Hong SK, Lee DH, Lee SW, Song CS, Kim KT, Choi IS, Lee JB, Park SY. 2016. Oral intake of Lactobacillus rhamnosus M21 enhances the survival rate of mice lethally infected with influenza virus. *J Microbiol Immunol Infect* 49:16-23. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.07.011>.
28. Song M, Hong HA, Huang JM, Colenutt C, Khang DD, Thi VAN, Park SM, Shim BS, Song HH, Cheon IS, Jang JE, Choi JA, Choi YK, Stadler K, Cutting SM. 2012. Killed Bacillus subtilis spores as a mucosal adjuvant for an H5N1 vaccine. *Vaccine* 30:3266-3277. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.03.016>.
29. Berdy J. 2005. Bioactive microbial metabolites. A personal view. *J Anti- biot (Tokyo)* 58:1-26. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.1>.
30. Torres NI, Noll KS, Xu S, Li J, Huang Q, Sinko PJ, Wachsman MB, Chikindas ML. 2013. Safety, formulation, and in vitro antiviral activity of the antimicrobial peptide subtilisin against herpes simplex virus type 1. *Probiotics Antimicrob Proteins* 5:26-35. <https://doi.org/10.1007/s12602-012-9123-x>.
31. Vollenbroich D, Ozel M, Vater J, Kamp RM, Pauli G. 1997. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from Bacillus subtilis. *Biologicals* 25:289-297. <https://doi.org/10.1006/biol.1997.0099>.
32. Huang XQ, Lu ZX, Zhao HZ, Bie XM, Lu FX, Yang SJ. 2006. Antiviral activity of antimicrobial lipopeptide from Bacillus subtilis fmbj against pseudorabies virus, porcine parvovirus, Newcastle disease virus and infectious bursal disease virus in vitro. *Int J Pept Res Ther* 12:373-377. <https://doi.org/10.1007/s10989-006-9041-4>.
33. Jones JC, Turpin EA, Bultmann H, Brandt CR, Schultz-Cherry S. 2006. Inhibition of influenza virus infection by a novel antiviral peptide that targets viral attachment to cells. *J Virol* 80:11960-11967. <https://doi.org/10.1128/JVI.01678-06>.
34. Tanaka R, Ishima Y, Enoki Y, Kimachi K, Shirai T, Watanabe H, Chuang VTG, Maruyama T, Otagiri M. 2014. Therapeutic impact of human serum albumin-thioredoxin fusion protein on influenza virus-induced lung injury mice. *Front Immunol* 5:561. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014>

