

A review of the effect of probiotics as vaccine vectors in the prevention of viral infections

Mohammadreza Ghorani^{*\۶}, Fereshteh Asheghali^{\۷}

Abstract

Vaccine is one of the most important strategies against infectious diseases. In recent decades, several types of vaccines have been used in clinical pathology to prevent complex infections, especially viral infections such as human papillomavirus, rotavirus, and human immunodeficiency virus, which cannot be treated with specific molecules. Primary vaccination methods used attenuated or inactivated pathogens. Because most infections start with infectious processes at the mucosal surface, mucosal immunization may be a promising way to deal with a variety of infectious agents. Therefore, mucosal vaccines have been considered by researchers as a valuable option. Probiotic bacteria as a vaccine carrier are considered a promising strategy for mucosal vaccination. Scientists are trying to help design such vaccines by using probiotic bacteria as delivery systems for other antigens. In this study, the use of live probiotic strains as mucosal vaccine vectors to prevent viral infections was investigated. Important steps have been taken to develop new, safe, practical, and effective mucosal vaccines to prevent viral infections and reduce their mortality and destructive diseases.

Keywords: Vaccine vectors, Human deficiency virus, Influenza virus, Rotavirus, Papillomavirus

\۶. Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran. mo_gh66@yahoo.com

\۷. Ph.D. Student in Pharmaceutical and Food Control, School of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. f.asheghali@yahoo.com

مروری بر اثر پروبیوتیک‌ها به‌عنوان وکتورهای واکسن در پیشگیری از عفونت‌های ویروسی

محمد رضا قرآنی^{۱۸*}، فرشته عاشق‌علی^{۱۹}

چکیده

واکسن یکی از مهم‌ترین راهبردهای مقابله با بیماری‌های عفونی است. در دهه‌های گذشته، چندین نوع واکسن در آسیب‌شناسی بالینی برای جلوگیری از عفونت‌های پیچیده به ویژه عفونت‌های ویروسی مانند ویروس پاپیلومای انسانی، روتاویروس و ویروس نقص ایمنی انسان که نمی‌توانند با مولکول‌های خاصی درمان شوند، مورد استفاده قرار گرفتند. روش‌های واکسیناسیون اولیه از عوامل بیماری‌زای تضعیف شده یا غیرفعال استفاده می‌کردند. از آنجا که اکثر عفونت‌ها فرایندهای عفونی را از سطوح مخاطی آغاز می‌کنند، ایمن‌سازی مخاطی ممکن است راهی امیدوارکننده برای مقابله با انواع مختلف عوامل عفونی باشد. از این رو واکسن‌های مخاطی، به‌عنوان گزینه‌ای ارزشمند مورد توجه محققان قرار گرفته‌اند. باکتری‌های پروبیوتیک به‌عنوان یک حامل واکسن، راهبرد امیدوارکننده برای واکسیناسیون مخاطی در نظر گرفته می‌شوند. دانشمندان سعی می‌کنند با استفاده از باکتری‌های پروبیوتیکی به‌عنوان سیستم‌های تحویل آنتی‌ژن‌های دیگر در طراحی چنین واکسن‌هایی کمک کنند. در این مطالعه، استفاده از سویه‌های پروبیوتیکی زنده به صورت وکتورهای واکسن مخاطی برای جلوگیری از

۱۸. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز. mo_gh66@yahoo.com

۱۹. دانشجوی دکتری تخصصی کنترل دارو و فرآورده‌های آرایشی و بهداشتی، دانشکده داروسازی،

دانشگاه علوم پزشکی تبریز. f.ashghali@yahoo.com

عفونت‌های ویروسی بررسی می‌شود. گام‌های مهم در جهت توسعه واکسن‌های مخاطی جدید، ایمن، عملی و مؤثر برای جلوگیری از عفونت‌های ویروسی و کاهش مرگ و میر و امراض ویرانگر آن‌ها برداشته شده است.

واژه‌های کلیدی: وکتورهای واکسن، ویروس نقص ایمنی انسان، ویروس آنفلوانزا، ویروس روتا، ویروس پاپیلوما

مقدمه

واکسیناسیون یک راهبرد اساسی در کاهش بار بیماری‌های عفونی و همه‌گیری ویرانگر آن‌ها در سراسر جهان است. فواید واکسن‌های مؤثر به انسان محدود نمی‌شود، واکسیناسیون همچنین می‌تواند از بروز عفونت‌ها و مرگ در حیوانات (خصوصاً حیوانات اهلی) جلوگیری کند، بنابراین از ضررهای مهم اقتصادی جلوگیری می‌کند [۱۴].

واکسن‌ها به طور فعال سیستم ایمنی بدن میزبان را تحریک می‌کنند تا پاسخ‌های ایمنی همورال حفاظتی و حتی در حدی کمتر، پاسخ ایمنی سلولی را برانگیزند [۳۵] القای ایمنی همورال منجر به تولید آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده خاص می‌شود که عفونت را مسدود می‌کنند. ایمنی به‌واسطه سلول اساساً بر فعال شدن لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک متکی است که عفونت را پس از شروع تکثیر به‌صورت درون سلولی کنترل می‌کنند. روش‌های واکسیناسیون اولیه از عوامل بیماری‌زای تضعیف شده یا غیرفعال استفاده می‌کردند. در حالی که واکسن‌های غیرفعال، عوامل بیماری‌زای کشته شده هستند، واکسن‌های تضعیف شده متشکل از میکرووب‌های زنده‌ای هستند که بیماری‌زایی خود را از دست می‌دهند اما قدرت پادگنی خود را حفظ می‌کنند. از همه مهم‌تر، پیشرفت‌های اخیر در زمینه علوم زیست‌شناسی، اساساً ایمونولوژی، میکروبیولوژی و زیست‌شناسی مولکولی، پتانسیل توسعه راهبردهای اضافی واکسیناسیون را فراهم کرده‌اند. از میان آن‌ها می‌توان به استفاده از عوامل بیماری‌زای ویروسی و باکتریایی تضعیف شده زنده به‌عنوان وکتور یا وسیله حمل برای تحویل آنتی‌ژن‌های دیگر اشاره کرد. در چنین رویکردهایی، ژن‌های کدکننده آنتی‌ژن دیگر وارد

شده و متعاقباً توسط وکتور نو ترکیب زنده بیان می‌شوند [۳۱].

بیشتر واکسن‌های موجود در حال حاضر به‌صورت تزریقی تحویل داده می‌شوند، در حالی که تعداد کمی دیگر از طریق روش‌های تحویل واکسن بدون سوزن (مثلاً از طریق سطوح مخاطی مانند تجویز خوراکی) تجویز می‌شوند. درحقیقت، چندین عامل مانع از تولید واکسن‌های مخاطی مؤثر می‌شوند. بااین‌حال، استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک به‌عنوان سیستم تحویل آنتی‌ژن‌های دیگر ممکن است در طراحی چنین واکسن‌هایی کمک کنند. در این مقاله، استفاده از سویه‌های زنده پروبیوتیک به‌صورت وکتورهای واکسن مخاطی برای جلوگیری از عفونت‌های ویروسی را مورد بررسی قرار می‌دهیم. ابتدا ایمنی مخاطی و مزایای واکسن‌های مخاطی را به‌طور خلاصه شرح می‌دهیم. سپس در مورد استفاده بالقوه از پروبیوتیک‌های نو ترکیب به‌عنوان وسیله تحویل واکسن مخاطی بحث می‌کنیم و عواملی که پاسخ ایمنی القاء شده آن‌ها در میزان را تعدیل می‌کنند را ارائه می‌دهیم. سرانجام، اثرات محافظتی واکسن‌های مبتنی بر پروبیوتیک نو ترکیب در طی عفونت‌های ویروسی را، با تمرکز بر ویروس نقص ایمنی انسان (HIV)، ویروس‌های آنفلوانزا، روتاویروس‌ها، و ویروس پاپیلوما، بررسی می‌کنیم.

ایمنی مخاطی و واکسن‌ها

سطوح مخاطی (دستگاه گوارش، تنفسی و دستگاه تناسلی) یک مسیر ورود ضروری هستند که از طریق آن بیشتر عوامل عفونی، بدن را مورد حمله قرار می‌دهند. بااین‌حال، این سطوح توسط یک سیستم ایمنی مخاطی گسترده که نقش اصلی را در دفاع از مخاط‌ها بازی می‌کند، محافظت می‌شوند. مکانیسم‌های مؤثر و ایمنی پیچیده و چندگانه در سطوح مخاطی ایجاد می‌شوند تا محافظت از ایمنی مخاطی را فراهم سازند. تولید موضعی آنتی‌بادی‌های IgA ترشحی (sIgA) توسط سلول‌های پلاسمای مخاطی در این فرایند دارای اهمیت محوری است [۳۲].

از آنجا که اکثر عفونت‌ها فرایندهای عفونی را از سطوح مخاطی آغاز می‌کنند، ایمن‌سازی مخاطی ممکن است راهی امیدوارکننده برای مقابله با انواع مختلف عوامل عفونی باشد. نکته مهم‌تر اینکه، در مقایسه با واکسن‌های تزریقی، واکسن‌هایی که از راه‌های مخاطی تجویز می‌شوند، چندین مزیت را نشان می‌دهند: تجویز آنها ساده‌تر است (به صورت خوراکی، از راه بینی)، استفاده از آنها برای واکسیناسیون با حجم بالا (نیازی به پرسنل آموزش‌دیده نیست) عملی است و غیرتهاجمی هستند و خطر انتقال عفونت‌های قابل انتقال از طریق خون (از طریق سوزن‌های آلوده) کمتر است [۲۸]. علاوه بر این، درحالی‌که ایمن‌سازی سیستمیک به‌طور کلی در تحریک پاسخ‌های ایمنی مخاطی بی‌اثر است، نشان داده شده است که ایمن‌سازی مخاطی باعث ایجاد هر دو ایمنی مخاطی و سیستمیک می‌شود [۳۲]. اما، به‌رغم این مزایا، در حال حاضر تعداد محدودی واکسن‌های مخاطی از نظر تجاری مورد تأیید قرار گرفته‌اند (علیه ویروس‌های پولیو، روتا، آنفولانزا، باکتری‌های سالمونلاتیفی و ویبریوکلرا)، درحالی‌که اکثر روش‌های ایمن‌سازی از طریق مسیرهای تجویز تزریقی انجام می‌شوند [۳۳].

کمبود واکسن‌های مخاطی ممکن است به دلیل محدودیت‌های مختلفی باشد، از جمله تخریب احتمالی ناشی از آنزیم در محیط‌های سخت میزبان (به‌عنوان مثال، دستگاه گوارش)، چسبندگی کم و انتقال ضعیف آنتی‌ژن‌ها در میان سطوح مخاطی، ایمنی‌زایی ضعیف و القاء تحمل خاص آنتی‌ژن به جای پاسخ ایمنی محافظتی [۴۴]. در راستای این امر، نشان داده شد که آنتی‌ژن‌های غیرقابل تکرار محلول، پاسخ‌های ایمنی قوی را تحریک نمی‌کنند، به‌طور کلی لازم است که در دوزهای زیاد تجویز شوند و ممکن است منجر به عدم پاسخگویی سیستمی شوند [۱۲].

باکتری‌های پروبیوتیک به‌عنوان سیستم‌های تحویل واکسن: یک راهبرد امیدوارکننده برای واکسیناسیون مخاطی برای غلبه بر محدودیت‌هایی که مانع کارایی واکسن‌های مخاطی می‌شوند، رویکردهای خاصی پیشنهاد شده‌اند که می‌توانند تحویل، جذب و تظاهر آنتی‌ژن در مکان‌های مخاطی را به منظور تحریک پاسخ‌های ایمنی مناسب تقویت کنند. اینها شامل استفاده از سیستم‌های تحویل واکسن هستند [۳۳]، که می‌توانند ارگانسیم زنده یا وسایل مصنوعی (غیرزنده) مانند سیستم‌های تحویل مبتنی بر پلیمر

(میکرو و نانوذرات زیست‌فروپاش) یا سیستم‌های تحویل مبتنی بر لیپید (لیپوزوم) باشند. تاکنون، وکتورهای زنده باکتریایی (از جمله باکتری‌های بیماری‌زای ضعیف یا غیربیماری‌زای مقیم)، ویژه‌ترین وسایل تحویل واکسن مخاطی محسوب می‌شوند [۲۶]. باکتری‌های ضعیف شده زنده می‌توانند از طریق معرفی ژن‌های کدکننده آنتی‌ژن، به‌عنوان حاملان یا وسایل تحویل برای آنتی‌ژن‌های دیگر استفاده شوند. در روش‌های قبلی، از مسیرهای متوالی یا جهش‌زایی شیمیایی برای تولید سویه‌های باکتریایی ضعیف استفاده می‌شد [۱۵]. با این حال، پیشرفت در زیست فناوری با استفاده از حذف ژنتیکی، تضعیف باکتری‌ها جهت القای جهش‌های مشخص در ژن‌های کدکننده برای عوامل بیماری‌زای مهم مانند *سالمونلا تیفی موریوم* را ممکن ساخت.

وکتورهای واکسن باکتریایی ضعیف شده زنده دیگر بیماری‌زا نیستند، اما ایمنی‌زا باقی می‌مانند. استفاده از آن‌ها یک روش امیدوارکننده است، زیرا آن‌ها اولاً قادر به تحریک واکنش‌های ایمنی قوی، مانند عفونت‌های طبیعی هستند، ثانیاً ویژگی‌های کمکی ذاتی قوی دارند [۳۱]. در سطح عملی، آن‌ها همچنین چندین مزیت از جمله تولید ارزان و آسان، سادگی مصرف، اسکان احتمالی ژن‌های متعدد دیگر، القاء پاسخ‌های ایمنی در برابر هر دو آنتی‌ژن دگرسان و همسان و حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها با احتمال درمان در صورت وقوع واکنش‌های سوء دارند [۴۰]. با این حال، انتخاب و ساخت وکتورهای باکتریایی ضعیف زنده مراحل خسته‌کننده و وقت‌گیر هستند [۳۰]. علاوه بر این، چنین وکتورهایی ممکن است دو خطر مهم را ارائه دهند. اولین خطر عدم ثبات احتمالی سویه تضعیف شده، با برگشت بالقوه تضعیف‌سازی به فنوتیپ کامل بیماری‌زا در میزبان پس از تجویز است. مورد دوم واگیری احتمالی در میزبان‌های مستعد، مانند افراد با نقص ایمنی جزئی (شیرخواران، سالخوردگان) یا افراد در معرض نقص ایمنی به دلیل حفظ سطح واگیری باقی مانده توسط سویه‌های تضعیف شده است [۱۱].

به منظور غلبه بر این مشکلات، دانشمندان استفاده از باکتری‌های غیربیماری‌زای بی‌خطر را به‌عنوان وسایل تحویل آنتی‌ژن به کار گرفتند [۴۶]. در این زمینه، پروبیوتیک‌های غیربیماری‌زای زنده، به ویژه باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB)، طی دو

دهه گذشته توجه زیادی را به خود جلب کردند. در واقع، این میکروارگانیزم‌ها ویژگی‌های مهم ارتقادهنده سلامتی را نشان می‌دهند و به دلیل استفاده طولانی مدت و گسترده از آن‌ها در تخمیر و حفظ محصولات غذایی، بسیاری از آن‌ها وضعیت عموماً سالم تشخیص داده می‌شوند (GRAS) را دارند. این خصوصیات آن‌ها را در زمینه توسعه واکسن، به کاندیداهای جذاب جایگزین وکتور تبدیل می‌کنند [۵۰]. به این ترتیب، انواع پروبیوتیک‌ها برای بیان موفقیت‌آمیز آنتی‌ژن‌های باکتریایی، انگلی و ویروسی مهندسی می‌شوند تا به‌عنوان وسایل جدید تحویل واکسن عمل کنند [۴۲].

پارامترهایی که پاسخ‌های ایمنی ناشی از واکسن‌های پروبیوتیکی نو ترکیب را تعدیل می‌کنند

پاسخ‌های ایمنی محافظتی ناشی از پروبیوتیک‌های نو ترکیب به چندین پارامتر از جمله (الف) سویه باکتریایی؛ (ب) مسیر تجویز؛ (ج) مقدار آنتی‌ژن ترکیب شده، و (د) نحوه تولید و ارائه آنتی‌ژن بستگی دارد [۳]. مورد دوم می‌تواند در سه نوع مختلف رخ می‌دهد: الف) داخل سلولی، که از حفاظت آنتی‌ژنی در برابر شرایط محیطی سخت میزبان محافظت می‌کند، اما برای انتشار آن نیاز به فروپاشی سلولی دارد؛ ب) خارج سلولی، که در آن آنتی‌ژن در محیط خارجی منتشر می‌شود و با سطوح مخاطی میزبان مستقیماً تماس برقرار می‌کند اما می‌تواند در معرض شرایط سخت قرار بگیرد. و ج) اتصال به دیواره سلولی، که در آن آنتی‌ژن می‌تواند با بافت میزبان در تعامل باشد و به‌طور کلی در برابر تخریب پروتئین محافظت می‌شود [۷]. اگرچه برخی از داده‌ها نشان می‌دهند که آنتی‌ژن‌های متصل به دیواره سلولی پاسخ‌های ایمنی قوی‌تری دارند [۷]، داده‌های دیگر تأکید می‌کنند که نتیجه‌گیری این امر که کدام‌یک از آنتی‌ژن‌های بیان شده در فراهم ساختن ایمن‌سازی مخاطی مطلوب بهترین است، دشوار است [۴۹].

پاسخ‌های ایمنی ناشی از واکسن‌های پروبیوتیکی نو ترکیب می‌توانند با بیان همزمان آنتی‌ژن مورد نظر با سیتوکین‌های تحریک‌کننده ایمنی، کموکین‌ها، آنتی‌ژن‌های باکتریایی یا مولکول‌هایی که به‌طور ویژه به سلول‌های دندریتیک (DCs) متصل می‌شوند تقویت شوند [۴۸] در واقع، نشان داده شده است که موش‌های ایمن شده با سویه‌های

پروبیوتیکی بیان‌کننده آنتی‌ژن‌های دگرسان همراه با سیتوکین‌های پیش‌التهابی مانند اینترلوکین IL-2 و IL-6، IL-12، و IL-1 پاسخ ایمنی مؤثرتری نسبت به موش‌های ایمن شده با سویه‌هایی که فقط آنتی‌ژن را بیان می‌کنند، نشان می‌دهند. به‌طور مشابه، کموکین‌های (CCL3 (MIP-1، CXCL9 (MIG) و CXCL10 (IP-10) به‌طور کامل با موفقیت به‌عنوان یاری‌گرهای واکسن مورد استفاده قرار گرفتند و خواص تحریک‌کننده ایمنی را در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی نشان دادند [۹،۲۰]. توکسین‌های باکتریایی، از جمله توکسین کلرا، توکسین حساس به گرما اشرشیاکلائی B (LTB)، و آنتی‌ژن‌های باکتریایی فلاژلا [۲۱] همچنین پاسخ ایمنی در موش‌های واکسینه شده با سویه‌های پروبیوتیکی و بیان چنین محصولات باکتریایی همزمان با آنتی‌ژن مورد نظر را تقویت می‌کنند. استفاده از سویه‌های پروبیوتیکی برای تحویل اختصاصی آنتی‌ژن مورد نظر آمیخته شده با یک پپتید که DC (سلول‌های دندریتیک) را هدف قرار می‌دهد (DCpep) نیز یک روش نویدبخش جایگزین است که امکان انتقال سریع‌تر و کارآمدتر ماده ایمنی‌زا به DC‌های مخاطی را فراهم می‌آورد. این سلول‌ها، به نوبه خود، نقش محوری را در فعال‌سازی پاسخ‌های ایمنی محافظتی قوی دارند.

پروبیوتیک‌ها به‌عنوان وکتورهای واکسن برای جلوگیری از عفونت‌های ویروسی
دانشمندان اخیراً پتانسیل پروبیوتیک‌ها به‌عنوان وکتورهای واکسن مخاطی برای محافظت از میزبان در برابر انواع عفونت‌های ویروسی با کارایی بالا در مدل‌های حیوانی را گزارش کرده‌اند [۴۳]. در ادامه این اثرات محافظتی را در موارد عفونت‌های HIV، ویروس آنفلوانزا، روتاویروس و ویروس پاپیلوما مورد بحث قرار می‌گیرد.

HIV

توسعه واکسن کارآمد علیه HIV همچنان یک اولویت بهداشت جهانی است. از آنجا که HIV به واسطه مسیر مخاطی منتقل می‌شود، یک وکتور واکسن که در مخاط کلنیزه و تکثیر می‌شود، در برابر این ویروس ایدئال خواهد بود [۲۲].
مطالعات متعددی استفاده از پروبیوتیک‌ها، به‌ویژه LAB (lactic acid bacteria)،

به‌عنوان وسایل تحویل برای واکسن مخاطی علیه HIV را بررسی کرده‌اند. در سال ۲۰۰۳، ژین و همکاران^{۲۱} بررسی کردند که آیا لاکتوکوکوس لاکتیس^{۲۲} (*L. lactis*) مهندسی شده برای تولید یک پروتئین غشادار HIV-1 چسبیده به سطح به‌عنوان واکسن ضد HIV عمل می‌کند یا خیر. در این راستا، آن‌ها این سویه LAB را برای بیان حلقه V2-V4 غشای HIV اصلاح کردند. آن‌ها نشان دادند که تجویز خوراکی این وکتور نو ترکیب می‌تواند یک ایمنی مخاطی و سیستمیک مؤثر خاص HIV را القاء کند و محافظت از میزبان در برابر ویروس واکسینیا بیان‌کننده HIV پس از چالش داخل صفاقی در موش‌ها را نشان می‌دهد. با این حال، توکسین کلرا، که برای استفاده در انسان قابل قبول نیست، در این مطالعه به‌عنوان یک یاریگر مخاطی استفاده شد. لاکتوکوکوس لاکتیس همچنین به‌عنوان واکسن پس از اصلاح ژنتیکی برای رمزگذاری آنتی‌ژن gp120 از HIV-1 مورد استفاده قرار گرفت، و پاسخ‌های ایمنی درون‌تنی ناشی از این سویه با پاسخ‌های استخراج شده توسط *اشرشیاکلی* بیان‌کننده همین آنتی‌ژن مقایسه شدند [۱۶]. به دنبال ایمن‌سازی عضلانی، موش‌هایی که وکتورهای لاکتوکوکوس لاکتیس را دریافت کردند ایمنی هومورال مشابه ایمنی نشان داده شده توسط تیتراهای آنتی‌بادی gp120 را ایجاد کردند، اما پاسخ ایمنی سلولی ضعیف‌تری را نسبت به موش‌های دریافت‌کننده وکتور *اشرشیاکلی* ایجاد کردند.

کاجیکاوا^{۲۳} و همکاران یک سویه اصلاح شده ژنتیکی لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس (*L. acidophilus*)^{۲۴} را ساختند که بر روی سطح سلول خود، آنتی‌ژن Gag حاصل از HIV-1 ترکیب شده با فلاژلین *سالمونلا انتریکا* سرووار تیفوموریوم (FliC)^{۲۵} را به‌عنوان یک یاریگر بیان کرد. در شرایط برون‌تنی، آنتی‌ژن‌های دگرسان بیان شده توسط

۲۱. Xin

۲۲. *Lactococcus lactis*

۲۳. Kajikawa

۲۴. *Lactobacillus acidophilus*

۲۵. *Salmonella enterica* serovar typhimurium flagellin

این سویه قادر به تحریک بلوغ DCهای انسانی بودند. در شرایط درون تنی، ایمن‌سازی داخل معدی موش‌ها با این LAB نو ترکیب منجر به فعال شدن قوی TLR5، گیرنده خاص فلاژلین شد و یک پاسخ بهبود یافته IgA خاص Gag را با لنفوسیت‌های B فعال شده تولید کرد [۱۸]. اخیراً، همان گروه لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس را به‌عنوان یک پلتفرم واکسن مخاطی دهانی به کار بردند که در آن‌ها یک اپی توپ خطی را از ناحیه خارجی پروگزیمال غشاء (۲۶MPER) HIV-1 در پروتئین لایه سطحی باکتریایی بسیار بیان شده (۲۷SlpA) وارد کردند [۱۷]. ایمن‌سازی موش‌ها از طریق مسیر داخل معدی با چنین لاکتوباسیل‌های نو ترکیب، آنتی‌بادی‌های اختصاصی MPER را موجب می‌شود، اما پاسخ سلول T را تحریک نمی‌کند. این پاسخ آنتی‌بادی مستقل از سلول T ممکن است از استفاده از این سویه به‌عنوان یک پلتفرم واکسن پشتیبانی کند، زیرا یک بدنه در حال رشد از شواهد تأکید می‌کند که پاسخ‌های وکتور محور که سلول‌های T را فعال می‌کند ممکن است باعث عفونت HIV شود [۱۳]. با این حال، هر دو پاسخ آنتی‌بادی و سلول T در برابر SlpA نیز در موش‌های واکسینه شده برانگیخته شدند. برخی از سویه‌های پروبیوتیکی به جای کدنویسی برای آنتی‌ژن‌های HIV، برای بیان مولکول‌هایی که می‌توانند ورود HIV، و همچنین پروتئین‌هایی نشان‌دهنده فعالیت ویروسی HIV را مهار کنند، طراحی شدند. مثال‌ها شامل لاکتوباسیلوس جنسنی (*L. jensenii*) نو ترکیب کدنویسی‌کننده پروتئین‌های دو دامنه‌ای CD4 (2D CD4) است که ورود HIV-1 به سلول‌های هدف یا کدنویسی برای سیانوویرین-N بازدارنده HIV (CV-N) را با توانایی کلنیزه کردن واژن و تولید CV-N تمام قد هنگام تجویز داخل رحمی موش‌ها در مرحله فحلی، مهار می‌کند [۲۷].

ویروس‌های آنفلوانزا

۲۶. membrane proximal external region

۲۷. highly expressed bacterial surface layer protein (SlpA)

۲۸. *Lactobacillus jensenii*

ویروس‌های آنفلوانزا هم در انسان‌ها و هم در حیوانات یک مشکل سلامتی بزرگ هستند. با توجه به توانایی بالای آن‌ها در گسترش و جهش در درون میزبان، واکسیناسیون ممکن است یک روش بسیار کارآمد برای مقابله با این ویروس‌ها باشد. چندین سویه پروبیوتیک به‌عنوان سیستم تحویل آنتی‌ژن‌های ویروس آنفلوانزا استفاده شدند، به‌ویژه هماگلوتینین (HA) که خود را به‌عنوان یک آنتی‌ژن واکسن کاندید مؤثر نشان داده است.

پاسخ‌های ایمنی مخاطی و سیستمیک قابل توجهی که منجر به محافظت کامل از موش‌های واکسینه شده از یک دوز کشنده آنفلوانزای مرعی بسیار بیماری‌زا H5N1 می‌شوند با استفاده از لاکتوباسیلوس لاکتیس نو ترکیب بیان‌کننده آنتی‌ژن HA به‌دست آمدند [۲۳]. در این مطالعه، باکتری‌های لاکتوباسیلوس لاکتیس جهت بیان یا ترشح آنتی‌ژن به‌صورت داخل سلولی مهندسی شدند، و این وکتورها بر روی پلیمرهای چسبنده مخاطی بارگذاری شده و در مینی‌کپسول‌های روکش روده‌ای بسته‌بندی شدند. پس از تجویز خوراکی، سطوح بالای IgG سرم خاص HA و IgA مدفوعی در موش‌های واکسینه شده تشخیص داده شدند و بهترین نتایج با کپسول‌های حاوی سویه لاکتوباسیلوس لاکتیس که آنتی‌ژن‌های HA را ترشح می‌کنند، به‌دست آمدند. پاسخ‌های ایمنی محافظتی در برابر H5N1 نیز با استفاده از دو سویه نو ترکیب LAB، یعنی لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس (LA4356-pH) ATCC 4356 و لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرسویه لاکتیس D17 (pH-DLD17) ایجاد شدند. هر دو سویه برای بیان هماگلوتینین ۱ (HA1) دستکاری و سپس به‌صورت خوراکی به موش BALB/c تجویز شدند. موش‌های واکسینه شده با افزایش معنادار سطوح آنتی‌بادی‌های ویژه ضد HA1 IgA و IgG در مخاط و سرم به ترتیب پاسخ ایمنی مخاطی و سیستمیک را نشان دادند. با این حال، نویسندگان گفتند که DLD17-pH می‌تواند به‌عنوان یک کاندید واکسن خوراکی علیه H5N1 امیدوارکننده‌تر باشد، زیرا پاسخ‌های محافظتی مؤثرتری را در مقایسه با LA4356-pH ایجاد می‌کند. اخیراً، زاتراج و همکاران هماگلوتینین آنفلوانزای مرعی (H5) و مرغ IL-2 در لاکتوباسیلوس لاکتیس را، بیان کردند و آزمایش‌های

حیوانی انجام شده در موش‌ها نشان دادند که ایمن‌سازی با این سویه نوترکیب توسط گاوآژ داخل معدی باعث IgG و IgA سرمی خاص H5 می‌شود [۴۵].

یک سویه نوترکیب لاکتوباسیلوس پلانتاروم NC8 (*L. plantarum*) اصلاح شده برای بیان ژن HA از H9N2 نیز به‌عنوان یک وکتور واکسن در برابر این ویروس استفاده شد. موش‌هایی که به صورت خوراکی با این سویه نوترکیب واکسینه شدند به‌طور کامل در برابر یک چالش کشنده با H9N2 سازگار شده با موش محافظت شدند. علاوه بر این، معاینه ماکروسکوپی ریه‌های آن‌ها نشان داد که آن‌ها پس از چالش، آسیب ریوی را کاهش داده‌اند. موش‌های واکسینه شده ایمنی مخاطی، هومورال و سلولی کارآمد را با آنتی‌بادی‌های ضد IgG سرمی خاص HA و IgA مخاطی و همچنین پاسخ سلول T CD8+ را ایجاد کردند [۴۱]. اخیراً، نتایج امیدوارکننده مشابهی در برابر H9N2 در مدل‌های موش و مرغ که به صورت خوراکی با لاکتوباسیلوس پلانتاروم NC8 ایمن شده بودند به دست آمدند، که نشان دادند که HA ترکیب شده با DCPep خاص به‌طور مؤثر آنتی‌ژن‌ها را برای DCها هدف قرار می‌دهند. نویسندگان این مطالعه نشان می‌دهند که این راهبرد ممکن است تعداد واکسیناسیون‌ها و مقدار لاکتوباسیلوس پلانتاروم مورد نیاز برای تجویز خوراکی را کاهش دهد.

محافظت در برابر ویروس‌های آنفلوانزا پس از تلقیح خوراکی و از راه بینی یک واکسن متشکل از لاکتوباسیلوس کازئی (*L. casei*) نوترکیب ارائه شد که این سویه نوترکیب پروتئین بسیار محافظت شده ماتریکس ۲ (M2) با زیرواحد توکسین کلرا A1 (CTA1) در سطح آن را نشان دهد. پاسخ‌های ایمنی سیستمیک و مخاطی مؤثر با سطوح بالای IgG سرمی خاص M2 و IgA مخاطی در موش‌های واکسینه شده تشخیص داده شدند. واکسیناسیون سطوح قابل توجهی از محافظت در برابر چالش‌های کشنده زیر انواع آنفلوانزا، از جمله H1N1، H5N1، H5N2، H9N2 و H7N3 را ایجاد کرد [۸].

باین‌حال، تأکید می‌شود که اثربخشی تجویز داخل معدی این واکسن نسبت به مسیر واکسیناسیون دهانی برتری دارد.

روتاویروس‌ها

روتاویروس‌ها عامل اصلی بروز اسهال شدید عفونی در نوزادان انسان و حیوانات در سراسر جهان در نظر گرفته می‌شوند. دو واکسن روتاویروس ضعیف زنده، روتاریکس^{۲۹} و روتاتک^{۳۰}، در سراسر جهان موجود هستند [۴۷]. به تازگی، تلاش‌های زیادی برای ایجاد واکسن‌های جدید بالقوه علیه روتاویروس‌ها با استفاده از آنتی‌ژن‌های نوترکیب، به‌ویژه پروتئین‌های ویروسی کپسید، و استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک به‌عنوان وسیله تحویل انجام شده‌اند.

در سال ۲۰۰۵، پترز^{۳۱} و همکاران ایمنی‌زایی لاکتوباسیلوس لاکتیس بیان‌کننده اشکال سیتوپلاسمی، ترشحی یا متصل به دیواره سلولی آنتی‌ژن کپسیدی خارجی روتاویروس VP7 را در حیوانات بررسی کردند [۲۴]. آن‌ها نشان دادند که ایمن‌سازی داخل معدی با این سویه نوترکیب می‌تواند تولید آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده را القا کند و نشان دادند که شکل ترشح شده VP7 نسبت به سایر اشکال ایمنی‌زاتر است. در همین راستا، یک مطالعه دیگر نشان داد که لاکتوباسیلوس لاکتیس بیان‌کننده آنتی‌ژن کپسید VP4 از روتاویروس خوکی در قسمت بیرونی دیواره سلولی موجب آنتی‌بادی‌های خاص موضعی ضد VP4 و مخاطی سیستمیک IgA و سرمی IgG در موش‌های ایمن شده به شیوه خوراکی شد [۲۴].

روتاویروس خوکی VP4 همچنین در سویه دیگر LAB، یعنی لاکتوباسیلوس کازئی، با یا بدون LTB حاصل از اشیراکلی بیان شد [۳۸]. کارایی این سویه‌ها در عمل به‌عنوان سیستم‌های تحویل آنتی‌ژن برای واکسیناسیون در موش‌های واکسینه شده بررسی شد. پس از تجویز خوراکی، هر دو سویه قادر به ایجاد پاسخ‌های ایمنی مخاطی و سیستمیک ضد روتاویروسی با سطوح بالای IgG سرمی ضد VP4 و IgA مخاطی بودند. با این حال، تیتراهای محافظتی IgA در حیوانات واکسینه شده با سویه‌های بیانگر پروتئین

۲۹. Rotarix

۳۰. RotaTeq

۳۱. Perez

فیوژن VP4-LTB نسبت به حیوانات واکسینه شده با سویه‌های بیانگر ژن VP4 بیشتر بودند، بنابراین این امر اثر LTB به‌عنوان یک یاریگر مخاطی را برجسته می‌کند. با استفاده از لاکتوباسیلوس لاکتیس، مارلی و همکاران وکتورهای مختلف بیان را طراحی کردند که برای بیان زیرواحد پروتئین اسپایک روتاویروس VP8 به شکل سیتوپلاسمی، ترشح شده و یا چسبیده به دیواره سلولی استفاده شدند [۲۹]. سپس اثر هر یک از این سویه‌های نوترکیب را در موش‌های واکسینه شده به‌صورت خوراکی ارزیابی شد. آن‌ها دریافتند که سویه بیان‌کننده فرم سیتوپلاسمی VP8 سطوح قابل توجهی از آنتی‌بادی‌های IgA روایده را به وجود می‌آورد، درحالی‌که سویه‌های تولیدکننده شکل چسبیده به سطح این آنتی‌ژن هر دو آنتی‌بادی ضد VP8 مخاطی و سیستمیک را ایجاد می‌کنند. علاوه بر این، نشان داده شد که IgA مخاطی ناشی از سویه‌های سیتوپلاسمی بیان‌کننده VP8 و IgG سرمی ناشی از سویه‌های چسبیده به دیواره سلولی بیانگر VP8، موجب بلاک ۵۰ و ۱۰۰ درصدی عفونت روتاویروس در سلول‌های جنینی کلیوی میمون در شرایط برون‌تنی شد.

اگرچه مطالعات ذکر شده در بالا نشان می‌دهند که سویه‌های پروبیوتیکی نوترکیب بیانگر آنتی‌ژن‌های روتاویروس دگرسان پاسخ‌های محافظتی را ارائه می‌دهند، اما هیچ آزمایش درون‌تنی را گزارش نمی‌کنند. سویه پروبیوتیکی غیربیماری‌زای باسیلوس سابتیلیس^{۳۲} (*B. subtilis*) ساخته شده برای بیان آنتی‌ژن کپسید درونی روتاویروس گاوی یا موشی VP6، به‌عنوان واکسن نوترکیب بالقوه علیه روتاویروس مورد آزمایش قرار گرفت. توانایی ایجاد محافظت در یک مدل چالش موش پس از تلقیح داخل بینی با سلول‌های رویشی یا اسپور سویه‌های نوترکیب مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان دادند که واکسن‌های روتاویروس مبتنی بر اسپور باسیلوس سابتیلیس، اما نه واکسن‌های مبتنی بر سلول رویشی، پاسخ‌های ایمنی محافظتی را در موش‌های ایمن شده و به چالش کشیده شده با ویروس به صورت خوراکی ایجاد می‌کنند. در واقع، اگرچه پاسخ‌های سیستمیک ناشی از اسپور و اشکال رویشی قابل مقایسه بودند، اما پاسخ‌های

۳۲. *Bacillus subtilis*

مخاطبی قابل مقایسه نبودند. این امر در سطوح IgG و IgA مدفوع بازتاب داده شد که افزایش قابل توجهی را در حیوانات واکسینه شده با اسپور اما نه با سلولی رویشی را نشان می‌دهند. علاوه بر این، هنگامی که کل توکسین کلرا یا یک توکسین حساس به گرما حاصل از یک فرم جهش یافته از اشرشیاکلی به‌عنوان یاری‌گر مخاطی در زمینه این سیستم بیان اضافه شد، محافظت مؤثر حاصل شد.

ویروس پاپیلومای انسانی

ویروس پاپیلومای انسانی (HPV)^{۳۳} شایع‌ترین عفونت مقاربتی است. این گروه شامل بیش از ۱۵۰ ویروس مرتبط است. در میان آن‌ها، HPV نوع ۱۶ (HPV-16) مهم‌ترین عامل سبب‌شناختی سرطان دهانه رحم است، این سرطان دومین عامل شایع مرگ ناشی از سرطان در زنان است. سه واکسن پیش‌گیرانه (گارداسیل، گارداسیل ۹ و سرواریکس) در حال حاضر در دسترس هستند و نشان داده شده است که عفونت دستگاه تناسلی ناشی از برخی از انواع HPV، از جمله HPV-16، پیشگیری می‌کنند و باعث کاهش سرطان‌های مرتبط با آن‌ها می‌شوند [۲]. با این حال، این واکسن‌ها در بیمارانی که پیش از واکسیناسیون آلوده شده‌اند، موجب محافظت نمی‌شوند، بنابراین اهمیت توسعه واکسن‌های درمانی HPV را برجسته می‌کنند [۲].

HPV-16 آنکو پروتئین E7، که برای فرایند سرطان‌زایی ضروری است، را رمزگذاری می‌کند. این آنتی‌ژن ایمنی‌زا به‌طور سازنده در سرطان دهانه رحم تولید می‌شود و بدین ترتیب نامزد جذابی را برای ایجاد واکسن درمانی برای سرطان‌های مرتبط با HPV شکل می‌دهد. تولید آنتی‌ژن HPV-16 E7 قبلاً در هر دو سویه ایمن بدون ارزش غذایی / استریپتوکوکوس گوردونی (*S. gordonii*) [۳۷] و لاکتوباسیلوس لاکتیس [۴] گزارش شد. موش‌ها و میمون‌های واکسینه شده با استریپتوکوکوس گوردونی بیانگر E7 پاسخ‌های ایمنی محافظتی را نشان دادند [۳۴] در لاکتوباسیلوس لاکتیس، ساخت درون سلولی E7 منجر به تخریب سریع آن می‌شود، در حالی که اشکال ترشح شده و چسبیده

۳۳. Human papillomavirus

به سطح پایدار بودند و تولید شدند [۴] در موش‌ها، تجویز لاکتوباسیلوس لاکتیس از راه بینی بیانگر اشکال مختلف E7 منجر به بروز هر دو پاسخ ایمنی هومورال و سلولی می‌شود، که به ترتیب در تولید آنتی‌بادی‌های ضد E7 و ترشح سیتوکین‌ها مانند IL-2 و IFN- γ بازتاب یافتند [۵] با این حال، پاسخ قابل توجه بالاتر در حیوانات ایمن شده با سویه‌های بیانگر E7 به‌عنوان یک پروتئین متصل به سطح مشاهده شد [۵] محافظت به‌واسطه سویه‌های نو ترکیب تجویز شده مخاطی لاکتوکوکوس لاکتیس بیان‌کننده E7 متصل به دیواره سلولی و یک فرم ترشح شده از IL-12 در موش‌های به چالش کشیده شده با سطوح کشنده خط سلول توموری TC-1 بیان‌کننده آنتی‌ژن E7، مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان دادند که نیمی از موش‌های ایمن شده عاری از تومورهای ناشی از TC-1 بودند و این فعالیت ضد توموری طولانی به نظر رسید. علاوه بر این اثرات پیشگیرانه، سویه‌های لاکتوکوکوس ساخته شده در این مطالعه، خصوصیات درمانی را نشان دادند، زیرا تقریباً یک‌سوم موش‌ها هنگام ایمن شدن هفت روز پس از تزریق TC-1، عود تومور را نشان دادند. نویسندگان دریافتند که این اثرات ضد تومور ناشی از واکسیناسیون از طریق پاسخ‌های ایمنی سلولی وابسته به CD8+ و CD4+ رخ دادند [۶] اثرات ضد تومور مشابه اخیراً در موش‌های ایمن شده با سویه‌های نو ترکیب لاکتوباسیلوس لاکتیس که به‌طور هم‌زمان پروتئین E7 HPV-16 و ژن IL-12 را حمل می‌کنند، گزارش شدند [۲۵] یک مطالعه دیگر نشان داد که پاسخ‌های ایمنی و اثرات ضد توموری ناشی از لاکتوکوکوس‌های نو ترکیب که آنتی‌ژن E7 را در سطح خود نشان می‌دهند و IL-12 فعال بیولوژیکی را ترشح می‌کنند بعد از ایمن‌سازی از راه بینی نسبت به بعد از تجویز داخل معدی بالاتر بودند [۱۰] این مطالعه همچنین نشان داد که تجویز از راه بینی E7 متصل به سطح سلول بیانگر لاکتوباسیلوس پلانتاروم می‌تواند پاسخ‌های ایمنی خاصی را القا کند و باعث عود قابل توجه تومورهای ناشی از HPV در موش‌های واکسینه شده از راه بینی شود. این پاسخ‌ها به‌طور معنی‌داری بیشتر از پاسخ‌های ناشی از لاکتوباسیلوس لاکتیس متصل به این آنتی‌ژن و تجویز شد به همین روش بودند [۱۰]. لاکتوباسیلوس کازئی همچنین به‌عنوان یک سیستم تحویل E7 HPV-16 [۳۶] مورد

استفاده قرار گرفت. موش‌های C57BL/6 با استفاده از این سویه نوترکیب به صورت خوراکی واکسینه شدند، آنتی‌بادی‌های IgG سرمی و IgA مخاطی خاص E7 را نمایش دادند و ایمنی سلولی سیستمیک و موضعی را نشان دادند که پس از تقویت به‌طور قابل توجهی افزایش یافته بودند [۳۶]. موش‌های واکسینه شده همچنین لنفوسیت‌های سیتوتوکسیک مخاطی را علیه سلول‌های مثبت E7 HPV-16 نشان می‌دهند و حیوانات واکسینه شده با تومورهای ناشی از TC-1 کاهش تشکیل تومور و افزایش میزان بقا را نشان دادند [۳۶]. محافظت موش در برابر تومورهای ناشی از HPV-16 همچنین با استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک غیرژنتیکی اصلاح شده نشان‌دهنده یک آنتی‌ژن E7 پایدار در سطح آن با استفاده از اتصال دیواره سلولی مشتق از لاکتوباسیلوس کازئی به دست آمد [۳۹]. اخیراً، یک مطالعه فاز I / IIa شامل بیماران مبتلا به نئوپلازی درون اپیتلیال دهانه رحم مثبت HPV-16 درجه ۳، نشان داد که واکسیناسیون خوراکی با لاکتوباسیلوس کازئی بیانگر یک پروتئین E7 HPV-16 تمام‌قد اصلاح شده، یک پاسخ ایمنی مخاطی خاص E7 را در ضایعات دهانه رحم نشان داد [۱۹].

L1 و L2، پروتئین‌های کپسید عمده و جزئی HPV-16، به ترتیب، در لاکتوباسیلوس کازئی نیز بیان شدند. در سیتوپلاسم این باکتری‌ها، L1 HPV-16 قادر به جمع‌آوری خود به شکل ذرات شبیه ویروس (۳۴VLP) که اپی‌توپ‌های تطبیقی را نشان می‌دهند، بود. آنتی‌بادی‌های ضد L1 IgG در سرم موش‌هایی که به‌طور زیرجلدی با این سویه نوترکیب واکسینه شده بودند، تشخیص داده شدند [۱]. پروتئین L2 HPV-16 جزئی نیز بر روی سطح لاکتوباسیلوس کازئی بیان شد، و ایمن‌سازی خوراکی موش BALB/c با این سویه موجب آنتی‌بادی‌های IgG سرمی خاص L2 خاص و IgG و IgA واژینال شد. علاوه بر این، آنتی‌بادی‌های تولید شده توسط واکسیناسیون فعالیت‌های خنثی‌کننده متقابل را نشان می‌دهند و موش‌های واکسینه شده توسط شبه‌ویروس‌های HPV-16، HPV-18، HPV-45، و HPV-58 علیه عفونت تناسلی محافظت می‌شوند.

نتیجه‌گیری

مقالات بررسی شده در این مطالعه، اثرات امیدوارکننده‌ای برای استفاده از سویه‌های پروبیوتیکی، به‌ویژه LAB، به‌عنوان وسیله کارآمد برای تحویل آنتی‌ژن‌های ویروسی به جایگاه‌های مخاطی را نشان می‌دهند. به نظر می‌رسد که این وکتورهای واکسن جذاب قادر به القاء ایمنی مخاطی و سیستمیک و ایجاد پاسخ‌های محافظتی ضدویروسی در مدل‌های حیوانی هستند. با این حال، چنین واکسن‌هایی از نظر تجاری در دسترس نیستند، و فقط تعداد معدودی از آن‌ها در حال حاضر در مرحله آزمایش‌های بالینی هستند، به‌ویژه موارد شامل لاکتوباسیلوس کازئی بیانگر آنتی‌ژن HPV-16 E7. با این وجود، بهینه‌سازی مستمر این ناقلین با جست‌وجو و شناسایی مؤثرترین سویه‌ها، مناسب‌ترین روش‌های ایمن‌سازی و قوی‌ترین و ایمن‌ترین یاریگرها باعث افزایش کارایی آن‌ها در آینده می‌شود. این‌ها گام‌هایی مهم در جهت توسعه واکسن‌های مخاطی جدید، ایمن، عملی و مؤثر برای جلوگیری از عفونت‌های ویروسی و کاهش مرگ و میر و امراض ویرانگر آن‌ها را نشان می‌دهند.

مراجع

1. Aires, K. A., A. M. Cianciarullo, S. M. Carneiro, L. L. Villa, E. Boccardo, G. Pérez-Martinez, I. Perez-Arellano, M. L. S. Oliveira and P. L. Ho. 2006. Production of human papillomavirus type 16 L1 virus-like particles by recombinant *Lactobacillus casei* cells. *Applied and environmental microbiology* 72: 745-752.
2. Angioli, R., S. Lopez, A. Aloisi, C. Terranova, C. De Cicco, G. Scaletta, S. Capriglione, A. Miranda, D. Luvero and R. Ricciardi. 2016. Ten years of HPV vaccines: State of art and controversies. *Critical reviews in oncology/hematology* 102: 65-72.
3. Bahey-El-Din, M. 2012. *Lactococcus lactis*-based vaccines from laboratory bench to human use: an overview. *Vaccine* 30: 685-690.
4. Bermudez-Humaran, L., P. Langella, A. Miyoshi, A. Gruss, R. T. Guerra, R. Montes de Oca-Luna and Y. Le Loir. 2002. Production of human papillomavirus type 16 E7 protein in *Lactococcus lactis*. *Applied and environmental microbiology* 68: 917-922.
5. Bermúdez-Humarán, L. G., N. G. Cortes-Perez, Y. Le Loir, J. M. Alcocer-

- González, R. S. Tamez-Guerra, R. M. de Oca-Luna and P. Langella. 2004. An inducible surface presentation system improves cellular immunity against human papillomavirus type 16 E7 antigen in mice after nasal administration with recombinant lactococci. *Journal of medical microbiology* 53: 427-433.
6. Bermúdez-Humarán, L. G., N. G. Cortes-Perez, F. Lefèvre, V. Guimarães, S. Rabot, J. M. Alcocer-Gonzalez, J.-J. Gratadoux, C. Rodriguez-Padilla, R. S. Tamez-Guerra and G. Corthier. 2005. A novel mucosal vaccine based on live Lactococci expressing E7 antigen and IL-12 induces systemic and mucosal immune responses and protects mice against human papillomavirus type 16-induced tumors. *The Journal of Immunology* 175: 7297-7302.
 7. Bermúdez-Humarán, L. G., P. Kharrat, J.-M. Chatel and P. Langella. 2011. Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. *Microbial cell factories* 10: 1-10.
 8. Chowdhury, M. Y., R. Li, J.-H. Kim, M.-E. Park, T.-H. Kim, P. Pathinayake, P. Weerathunga, M. K. Song, H.-Y. Son and S.-P. Hong. 2014. Mucosal vaccination with recombinant Lactobacillus casei-displayed CTA1-conjugated consensus matrix protein-2 (sM2) induces broad protection against divergent influenza subtypes in BALB/c mice. *PloS one* 9: e94051.
 9. Cortes-Perez, N. G., L. F. da Costa Medina, F. Lefèvre, P. Langella and L. G. Bermúdez-Humarán. 2008. Production of biologically active CXC chemokines by Lactococcus lactis: evaluation of its potential as a novel mucosal vaccine adjuvant. *Vaccine* 26: 5778-5783.
 10. Cortes-Perez, N. G., F. Lefèvre, G. Corthier, K. Adel-Patient, P. Langella and L. G. Bermúdez-Humarán. 2007. Influence of the route of immunization and the nature of the bacterial vector on immunogenicity of mucosal vaccines based on lactic acid bacteria. *Vaccine* 25: 6581-6588.
 11. Curtiss, R. 2002. Bacterial infectious disease control by vaccine development. *The Journal of clinical investigation* 110: 1061-1066.
 12. Czerkinsky, C., F. Anjueie, J. R. McGhee, A. Geoghegan, J. Holmgren, M. P. Kieny, K. Fujiyoshi, J. F. Mestecky, V. Pierrefite Carle and C. Rusk. 1999. Mucosal immunity and tolerance: relevance to vaccine development. *Immunological reviews* 170: 197-222.
 13. Fauci, A. S., M. A. Marovich, C. W. Dieffenbach, E. Hunter and S. P. Buchbinder. 2014. Immune activation with HIV vaccines. *Science* 344: 49-51.
 14. Gerdt, V., G. K. Mutwiri, S. K. Tikoo and L. A. Babiuk. 2006. Mucosal delivery of vaccines in domestic animals. *Veterinary research* 37: 487-510.
 15. Germanier, R. and E. Fiirer. 1975. Isolation and characterization of Gal E mutant Ty 21a of Salmonella typhi: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. *Journal of infectious diseases* 131: 553-558.
 16. Gram, G. J., A. Fomsgaard, M. Thorn, S. M. Madsen and J. Glenting. 2007. Immunological analysis of a Lactococcus lactis-based DNA vaccine expressing

- HIV gp120. *Genetic Vaccines and Therapy* 5: 1-11.
17. Kajikawa, A., L. Zhang, A. LaVoy, S. Bumgardner, T. R. Klaenhammer and G. A. Dean. 2015. Mucosal immunogenicity of genetically modified *Lactobacillus acidophilus* expressing an HIV-1 epitope within the surface layer protein. *PLoS One* 10: e0141713.
 18. Kajikawa, A., L. Zhang, J. Long, S. Nordone, L. Stoeker, A. LaVoy, S. Bumgardner, T. Klaenhammer and G. Dean. 2012. Construction and immunological evaluation of dual cell surface display of HIV-1 gag and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FliC in *Lactobacillus acidophilus* for vaccine delivery. *Clinical and vaccine immunology* 19: 1374-1381.
 19. Kawana, K., K. Adachi, S. Kojima, A. Taguchi, K. Tomio, A. Yamashita, H. Nishida, K. Nagasaka, T. Arimoto and T. Yokoyama. 2014. Oral vaccination against HPV E7 for treatment of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 (CIN3) elicits E7-specific mucosal immunity in the cervix of CIN3 patients. *Vaccine* 32: 6233-6239.
 20. Kuczkowska, K., G. Mathiesen, V. G. Eijsink and I. Øynebråten. 2015. *Lactobacillus plantarum* displaying CCL3 chemokine in fusion with HIV-1 Gag derived antigen causes increased recruitment of T cells. *Microbial cell factories* 14: 1-12.
 21. Lee, S., B. R. Belitsky, J. P. Brinker, K. O. Kerstein, D. W. Brown, J. D. Clements, G. T. Keusch, S. Tzipori, A. L. Sonenshein and J. E. Herrmann. 2010. Development of a *Bacillus subtilis*-based rotavirus vaccine. *Clinical and Vaccine Immunology* 17: 1647-1655.
 22. Lehner, T., L. Bergmeier, Y. Wang, L. Tao and E. Mitchell. 1999. A rational basis for mucosal vaccination against HIV infection. *Immunological reviews* 170: 183-196.
 23. Lei, H., Y. Xu, J. Chen, X. Wei and D. M.-K. Lam. 2010. Immunoprotection against influenza H5N1 virus by oral administration of enteric-coated recombinant *Lactococcus lactis* mini-capsules. *Virology* 407: 319-324.
 24. Li, Y.-j., G.-p. Ma, G.-w. Li, X.-y. Qiao, J.-w. Ge, L.-j. Tang, M. Liu and L.-w. Liu. 2010. Oral vaccination with the porcine rotavirus VP4 outer capsid protein expressed by *Lactococcus lactis* induces specific antibody production. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010.
 25. Li, Y., X. Li, H. Liu, S. Zhuang, J. Yang and F. Zhang. 2014. Intranasal immunization with recombinant *Lactococci* carrying human papillomavirus E7 protein and mouse interleukin 12 DNA induces E7 specific antitumor effects in C57BL/6 mice. *Oncology letters* 7: 576-582.
 26. Lin, I. Y., T. T. H. Van and P. M. Smooker. 2015. Live-attenuated bacterial vectors: tools for vaccine and therapeutic agent delivery. *Vaccines* 3: 940-972.
 27. Liu, X., L. A. Lagenaur, D. A. Simpson, K. P. Essenmacher, C. L. Frazier-Parker, Y. Liu, D. Tsai, S. S. Rao, D. H. Hamer and T. P. Parks. 2006.

- Engineered vaginal lactobacillus strain for mucosal delivery of the human immunodeficiency virus inhibitor cyanovirin-N. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50: 3250-3259.
28. Lycke, N. 2012. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nature Reviews Immunology* 12: 592-605.
 29. Marelli, B., A. R. Perez, C. Banchio, D. de Mendoza and C. Magni. 2011. Oral immunization with live *Lactococcus lactis* expressing rotavirus VP8* subunit induces specific immune response in mice. *Journal of virological methods* 175: 28-37.
 30. Mercenier, A., H. Müller-Alouf and C. Grangette. 2000. Lactic acid bacteria as live vaccines. *Current issues in molecular biology* 2: 17-25.
 31. Nascimento, I. and L. Leite. 2012. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Brazilian journal of medical and biological research* 45: 1102-1111.
 32. Neutra, M. R. and P. A. Kozlowski. 2006. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nature reviews immunology* 6: 148-158.
 33. Nizard, M., M. O. Diniz, H. Roussel, T. Tran, L. C. Ferreira, C. Badoual and E. Tartour. 2014. Mucosal vaccines: novel strategies and applications for the control of pathogens and tumors at mucosal sites. *Human vaccines & immunotherapeutics* 10: 2175-2187.
 34. Oggioni, M. R., R. Manganelli, M. Contorni, M. Tommasino and G. Pozzi. 1995. Immunization of mice by oral colonization with live recombinant commensal streptococci. *Vaccine* 13: 775-779.
 35. Plotkin, S. A. 2010. Correlates of protection induced by vaccination. *Clinical and vaccine immunology* 17: 1055-1065.
 36. Poo, H., H. M. Pyo, T. Y. Lee, S. W. Yoon, J. S. Lee, C. J. Kim, M. H. Sung and S. H. Lee. 2006. Oral administration of human papillomavirus type 16 E7 displayed on *Lactobacillus casei* induces E7 specific antitumor effects in C57/BL6 mice. *International journal of cancer* 119: 1702-1709.
 37. Pozzi, G., M. Contorni, M. R. Oggioni, R. Manganelli, M. Tommasino, F. Cavalieri and V. Fischetti. 1992. Delivery and expression of a heterologous antigen on the surface of streptococci. *Infection and Immunity* 60: 1902-1907.
 38. Qiao, X., G. Li, X. Wang, X. Li, M. Liu and Y. Li. 2009. Recombinant porcine rotavirus VP4 and VP4-LTB expressed in *Lactobacillus casei* induced mucosal and systemic antibody responses in mice. *BMC microbiology* 9: 1-11.
 39. Ribelles, P., B. Benbouziane, P. Langella, J. E. Suárez, L. G. Bermúdez-Humarán and A. Riazi. 2013. Protection against human papillomavirus type 16-induced tumors in mice using non-genetically modified lactic acid bacteria displaying E7 antigen at its surface. *Applied microbiology and biotechnology* 97: 1231-1239.
 40. Shata, M. T., L. Stevceva, S. Agwale, G. K. Lewis and D. M. Hone. 2000.

- Recent advances with recombinant bacterial vaccine vectors. *Molecular medicine today* 6: 66-71.
41. Shi, S.-H., W.-T. Yang, G.-L. Yang, Y.-L. Cong, H.-B. Huang, Q. Wang, R.-P. Cai, L.-P. Ye, J.-T. Hu and J.-Y. Zhou. 2014. Immunoprotection against influenza virus H9N2 by the oral administration of recombinant *Lactobacillus plantarum* NC8 expressing hemagglutinin in BALB/c mice. *Virology* 464: 166-176.
 42. Sleator, R. D. 2010. Probiotics—a viable therapeutic alternative for enteric infections especially in the developing world. *Discovery medicine* 10: 119-124.
 43. Sorokulova, I. 2014. Recombinant probiotics: future perspectives in disease treatment. *J Probiotics Health* 2: e109.
 44. Srivastava, A., D. V. Gowda, S. V. Madhunapantula, C. G. Shinde and M. Iyer. 2015. Mucosal vaccines: a paradigm shift in the development of mucosal adjuvants and delivery vehicles. *Apmis* 123: 275-288.
 45. Szatraj, K., A. K. Szczepankowska, V. S czy ska, K. Florys, B. Gromadzka, K. Łepek, G. Płucienniczak, B. Szewczyk, W. Zagórski-Ostojka and J. K. Bardowski. 2014. Expression of avian influenza haemagglutinin (H5) and chicken interleukin 2 (chIL-2) under control of the *ptcB* promoter in *Lactococcus lactis*. *Acta Biochimica Polonica* 61: 609-614.
 46. Tarahomjoo, S. 2012. Development of vaccine delivery vehicles based on lactic acid bacteria. *Molecular biotechnology* 51: 183.۱۹۹-
 47. Ward, R. L. 2008. Rotavirus vaccines: how they work or don't work. *Expert reviews in molecular medicine* 10.
 48. Wells, J. 2011. Mucosal vaccination and therapy with genetically modified lactic acid bacteria. *Annual review of food science and technology* 2: 423-445.
 49. Wells, J. M. and A. Mercenier. 2008. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 6: 349-362.
 50. Wyszyska, A., P. Kobierecka, J. Bardowski and E. K. Jagusztyn-Krynicka. 2015. Lactic acid bacteria—20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Applied microbiology and biotechnology* 99: 2967-2977.