

HIỆU QUẢ CỦA BÀO TỬ *BACILLUS SUBTILIS* BIỂU HIỆN INTERFERON ALPHA GÀ (*B. SUBTILIS*-ChIFN α) TRONG PHÒNG BỆNH NEWCASTLE TRÊN GÀ

Hồ Thị Việt Thu¹

ABSTRACT

A study on efficiency of recombinant Bacillus subtilis expressed chicken interferon alpha (B. subtilis-ChIFN α) in prevention of Newcastle disease for chickens was carried out in 3 week old chickens of Tamhoang breed by oral supply of 0.5×10^{10} spores of B. subtilis-ChIFN α per chicken and comparing the efficiency of standard ChIFN α with dose of 10^4 UI/chicken. The experimented results showed that after challenging by virulent Newcastle disease virus with dose of 10^4 ELD₅₀ per experimented chicken, the survive rate of chickens in B. subtilis-ChIFN α treatment was (79.17%) higher than that of chickens in standard ChIFN α treatment (45.83%) and than that of control (12.50%). Our results suggested that B. subtilis-ChIFN α could be potentially useful in the prevention of Newcastle disease in chickens.

Keywords: *B. subtilis-ChIFN α , Newcastle disease, chickens*

Title: *Efficiency of recombinant Bacillus subtilis expressed chicken interferon alpha (B. subtilis-ChIFN α) in prevention of Newcastle disease in chickens*

TÓM TẮT

Nghiên cứu hiệu quả phòng bệnh của bào tử Bacillus subtilis biểu hiện Interferon alpha gà (B. subtilis-ChIFN α) trong phòng bệnh Newcastle cho gà được thực hiện trên gà giống Tam Hoàng 3 tuần tuổi. Thí nghiệm được thực hiện bằng việc thử nghiệm cho gà uống với liều $0,5 \times 10^{10}$ bào tử B. subtilis-ChIFN α , sau đó công cường độc virus Newcastle độc lực cao với liều 10^4 ELD₅₀ cho mỗi gà thí nghiệm, đồng thời so sánh hiệu quả của ChIFN α chuẩn với liều 10^4 UI. Kết quả thí nghiệm cho thấy bào tử B. subtilis-ChIFN α có khả năng phòng bệnh Newcastle với tỷ lệ bảo hộ là 79,17% cao hơn so với tỷ lệ bảo hộ bởi ChIFN α chuẩn (45,83%) và so với lô đối chứng Bacillus subtilis (12,50%). Kết quả thí nghiệm chứng minh B. subtilis-ChIFN α có tiềm năng trong việc phòng bệnh Newcastle trên gà.

Từ khóa: *B. subtilis-ChIFN α , Newcastle disease, gà*

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh Newcastle là một trong các bệnh truyền nhiễm nguy hiểm nhất trên gia cầm do paramyxovirus gây ra. Tất cả các giống và lứa tuổi gà đều cảm nhiễm với bệnh, bệnh xảy ra ở tất cả các hình thức chăn nuôi, có tính chất lây lan nhanh, mạnh, tỷ lệ mắc bệnh và tỷ lệ chết cao, có thể lên đến 100% (Nguyễn Như Thanh *et al.*, 1997). Do kháng sinh không thể điều trị được bệnh, do đó một khi dịch bệnh xảy ra thì tổn thất vô cùng to lớn. Ngày nay, với sự phát triển của công nghệ sinh học ChIFN- α đã được sản xuất với qui mô lớn và chứng minh có hiệu quả trong việc phòng và trị đối với một số bệnh do virus trên người (Livonesi *et al.*, 2007) và

¹ Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

động vật (Mo *et al.*, 2001; Marcus *et al.*, 1999). Năm 2009, bộ môn Vi sinh Ký sinh – Khoa Dược, Đại học Y dược thành phố HCM đã nghiên cứu thành công qui trình sản xuất *Bacillus subtilis* biểu hiện interferon alpha gà (*B. subtilis*-ChIFN α) và bước đầu thử nghiệm cho thấy sản phẩm này có hiệu quả trong việc ức chế sự nhân lên của virus Newcastle trong điều kiện *in vitro* (Nguyễn Ngọc Ân *et al.*, 2010). Do đó, chúng tôi tiếp tục nghiên cứu khả năng phòng bệnh Newcastle của sản phẩm này trong điều kiện *in vivo*.

2 PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương tiện

2.1.1 Vật liệu thí nghiệm

Virus Newcastle cường độc được xác định bằng kỹ thuật RT-PCR (NAVETCO) và thí nghiệm trên gà và phôi gà.

Bacillus subtilis và *B. subtilis* biểu hiện Interferon alpha gà (*B. subtilis*-ChIFN α) được sản xuất từ bộ môn Vi sinh Ký sinh- khoa Dược, Đại Học Y Dược, Tp. Hồ Chí Minh; ChIFN α chuẩn của hãng GenWay Biotech (USA).

Kháng nguyên và kháng thể chuẩn kháng virus Newcastle (Australian animal health laboratory, CSIRO, Australia), hồng cầu gà 1%, các hóa chất cần thiết dùng trong xét nghiệm ngưng kết hồng cầu (HA- Haemagglutination) và xét nghiệm ức chế ngưng kết hồng cầu (HI- Haemagglutination inhibition).

2.1.2 Đối tượng thí nghiệm

Gà thí nghiệm giống Tam Hoàng 1 ngày tuổi được mua từ trại giống thuộc tỉnh Vĩnh Long được nuôi tại trại thực nghiệm, Khoa Nông Nghiệp và Sinh Học Ứng Dụng, Trường Đại Học Cần Thơ. Khi gà đạt 3 tuần tuổi kiểm tra lại kháng thể thụ động kháng virus Newcastle, tất cả gà đều cho kết quả âm tính sẽ được đưa vào thí nghiệm. Tổng số gà thí nghiệm là 96 con.

2.1.3 Dụng cụ thiết bị

Ống tiêm y tế 1ml, kim tiêm, ống nghiệm vô trùng, bông gòn vô trùng, găng tay, bình trữ lạnh, type nhựa đựng huyết thanh, đĩa microplate đáy chữ U 96 giếng, micropipette, máy ly tâm, hematocrite.

2.2 Phương pháp tiến hành

2.2.1 Chuẩn bị gà thí nghiệm

Khi gà được mua về, để cho gà ổn định và nuôi đến 3 tuần tuổi mới đưa vào thí nghiệm. Trước khi tiến hành thí nghiệm chúng tôi chuẩn độ virus Newcastle trên phôi gà ấp 11 ngày tuổi bằng cách tiêm vào xoang niệu mô, sau đó tính liều gây chết phôi 50% (ELD50- Embryo lethal dose 50%). Gà thí nghiệm cũng được kiểm tra kháng thể thụ động kháng virus Newcastle từ mẹ truyền sang lúc 1 tuần tuổi, 2 tuần tuổi, 3 tuần tuổi bằng phản ứng ức chế ngưng kết hồng cầu gà với 4 đơn vị HA.

Trong thời gian nuôi, gà thí nghiệm được tiêm phòng các bệnh như: Gumboro, đậu và cúm. Quy trình tiêm phòng được thực hiện như bảng 1.

Bảng 1: Quy trình phòng bệnh ở gà thí nghiệm

Ngày tuổi	Loại vaccine	Cách sử dụng
7	Gumboro	Nhỏ mắt
10	Đậu	Chung qua da cánh
14	Cúm	Tiêm dưới da cổ
24	Gumboro	Nhỏ mắt

2.2.2 Bố trí thí nghiệm

Lúc gà được 3 tuần tuổi, tất cả đều âm tính với kháng thể kháng virus Newcastle và đã được chủng vaccine phòng bệnh Gumboro, bệnh cúm và bệnh đậu gà, những gà này được sử dụng trong thí nghiệm. Gà có trọng lượng đồng đều nhau được bố trí một cách ngẫu nhiên vào 2 thí nghiệm:

Thí nghiệm 1: khảo sát độc lực của virus Newcastle đối với gà thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 2 nghiệm thức và 3 lần lặp lại, mỗi đơn vị thí nghiệm gồm 2 con, tổng số gà ở mỗi nghiệm thức là 12 con. Tất cả gà được nuôi và chăm sóc với những điều kiện hoàn toàn giống nhau. Gà được gây nhiễm virus bằng cách cho uống 0,1ml huyền dịch virus Newcastle có chứa 10^4 ELD₅₀, gà đối chứng được uống 0,1ml dung dịch đệm Phosphate buffered saline (PBS). Bố trí thí nghiệm được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2: Bố trí thí nghiệm khảo sát độc lực virus Newcastle

Nghiệm thức	Số lần lặp lại	Số gà trong một nghiệm thức	Liều	Đường cấp
PBS	3	12	0,1ml/con	Uống
Virus	3	12	10^4 ELD ₅₀ /0,1ml/con	Uống

ELD₅₀ (Embryo lethal dose 50%- liều gây chết 50% phôi gà), PBS: Phosphate buffered saline

Thí nghiệm 2: khảo sát hiệu quả của B. subtilis-ChIFN α trong phòng bệnh Newcastle

Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 3 nghiệm thức và 3 lần lặp lại, mỗi đơn vị thí nghiệm gồm 8 con gà được nuôi và chăm sóc với những điều kiện hoàn toàn giống nhau và trọng lượng như nhau. Số gà ở mỗi nghiệm thức là 24 con. Gà thí nghiệm được cho uống sinh phẩm 6 giờ trước khi công cường độc virus Newcastle bằng cách cho uống 10^4 ELD₅₀/0,1ml/con. Bố trí thí nghiệm và liều lượng sinh phẩm sử dụng trong thí nghiệm được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3: Bố trí thí nghiệm khảo sát độc lực virus Newcastle

Nghiệm thức	Số lần lặp lại	Số gà trong một nghiệm thức	Liều	Đường cấp
ChIFN α	3	24	104UI	Uống
B.subtilis-ChIFN α	3	24	0,5x1010	Uống
B.subtilis	3	24	0,5x1010	Uống

Trong thời gian thí nghiệm, tiến hành quan sát và theo dõi gà ở các nghiệm thức, ghi nhận số gà chết. Khi gà chết thì tiến hành mổ khám quan sát bệnh tích và lấy bệnh phẩm (gan, lách, não) để kiểm tra virus Newcastle bằng xét nghiệm HA và

định danh virus Newcastle bằng xét nghiệm HI với kháng thể đặc hiệu kháng virus Newcastle.

2.2.3 Chỉ tiêu theo dõi và phân tích số liệu

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ sống sót của gà sau khi công cường độc, số ngày trung bình từ lúc gây nhiễm đến khi gà chết, tần suất biểu hiện bệnh tích ở gà thí nghiệm qua mổ khám.

Phân tích số liệu: Phần mềm Minitab 13.2 (Ryan *et al.*, 2000) được sử dụng để phân tích số liệu, phương pháp Chi-square được sử dụng để so sánh tỷ lệ sống sót, phép thử t dùng so sánh số ngày trung bình từ khi gây nhiễm đến khi gà chết.

3 KẾT QUẢ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả khảo sát độc lực virus Newcastle

Bảng 4: Tỷ lệ gà chết khi gây nhiễm virus Newcastle

Nghiệm thức	Số gà thí nghiệm (con)	Số gà còn sống (con)	Tỷ lệ (%)
Virus	12	0	0,00
PBS	12	12	100,00

Kết quả bảng 4 cho thấy tất cả (12/12) gà gây nhiễm bởi virus Newcastle đều chết với tỷ lệ 100%, gà gây nhiễm chết có triệu chứng và bệnh tính đặc trưng của bệnh Newcastle, trong khi 100% (12/12) gà đối chứng đều khỏe mạnh, chứng tỏ virus Newcastle thí nghiệm là chủng virus có độc lực cao.

3.2 Kết quả hiệu quả phòng bệnh Newcastle trên gà của *B. subtilis*-ChIFN α

Hiệu quả của các sinh phẩm trong việc bảo vệ gà chống lại virus Newcastle cường độc được thể hiện qua số gà còn sống sót sau khi công cường độc, kết quả được trình bày ở bảng 5.

Bảng 5: Tỷ lệ gà còn sống ở các nghiệm thức sau khi gây nhiễm virus Newcastle

Nghiệm thức	Số gà thí nghiệm (con)	Số gà còn sống (con)	Tỷ lệ (%)
ChIFN α	24	11	45,83b
<i>B. subtilis</i> -ChIFN α	24	19	79,17a
<i>B. subtilis</i>	24	3	12,50c

Những giá trị trong cùng một cột với chữ mũ khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$)

Kết quả trên cho thấy chỉ có 12,50% (3/24) gà ở nghiệm thức *B. subtilis* sống sót sau khi công cường độc virus Newcastle. Trong khi đó ở hai nghiệm thức có sử dụng ChIFN α tỷ lệ sống sót của gà thí nghiệm sau khi công cường độc có cải thiện đáng kể, tỷ lệ sống sót cao nhất được ghi nhận trên gà ở nghiệm thức *B. subtilis*-ChIFN α với tỷ lệ 79,17% (19/24), cao hơn có ý nghĩa thống kê ($P=0,017$) so với gà uống ChIFN α (45,83%). Tỷ lệ gà sống sót ở nghiệm thức sử dụng *B. subtilis*-ChIFN α và ở nghiệm thức ChIFN α đều cao hơn so với gà đối chứng có ý nghĩa thống kê ($P=0,011$ và $P=0,000$). Kết quả trên chứng tỏ hiệu quả phòng bệnh Newcastle chủ yếu là do tác dụng của ChIFN α . Interferon đã từ lâu được biết là những cytokine có khả năng kháng lại virus bằng việc cản trở sự tổng hợp RNA và protein của virus, trong đó quan trọng nhất là IFN α và IFN β (Tizard, 2004), kết quả của quá trình này là ngăn cản sự xâm nhiễm của virus vào tế bào mới (Baron,

1970; Landolfo *et al.*, 1995; Tô Long Thành, 2009). Ở gia cầm, interferon alpha gà (ChIFN α) là tác nhân chống virus đầy tiềm năng, có hoạt tính cảm ứng promotor Mx cao (Schulz *et al.*, 1995), và có tác dụng làm giảm tình trạng nhiễm virus Newcastle khi cho uống với liều cao (Marcus *et al.*, 1999), ChIFN α có khả năng phòng và trị nhiều bệnh do virus khác trên gia cầm như bệnh cúm gia cầm do virus cúm H9N2 (Meng *et al.* 2011), virus gây bệnh viêm phế quản truyền nhiễm (Pei *et al.*, 2001), ức chế sự tăng sinh khối u do Rous sarcoma virus (Plachy *et al.*, 1999), có tác dụng phòng bệnh khá tốt đối với bệnh Gumboro và Newcastle trên gà thương phẩm (Mo *et al.*, 2001).

Kết quả trên cũng phù hợp với nghiên cứu *invitro* của Nguyễn Ngọc Ân *et al.* (2010) đã chứng minh *B.subtilis*-ChIFN α có khả năng bảo vệ tế bào xơ phôi gà khi gây nhiễm với 100 TCID₅₀ virus Gumboro hoặc virus Newcastle. Kết quả thí nghiệm cho thấy *B.subtilis*-IFN α có khả năng bảo vệ gà cao hơn so với ChIFN α , điều này có thể do bản chất của ChIFN α là protein do đó có thể bị các enzyme ở đường tiêu hóa như trypsin, pepsin, papain và các protease phân hủy (Michael *et al.*, 1980; Sinha *et al.*, 2004) làm giảm tác dụng của ChIFN α ; trong khi đó, *B.subtilis*-ChIFN α nhờ có *B. subtilis* ở dạng bào tử có thể chịu đựng các men protease. Ngoài ra, các nghiên cứu *in vivo* cho thấy mặc dù *B. subtilis* có vai trò giống như probiotics khi ở dạng bào tử nhưng khi vào đường ruột sẽ vẫn tiến hành chu kỳ sống, bào tử nảy mầm, sinh sản và lại sinh bào tử (Trần Thu Hoa *et al.*, 2001), điều này đã làm tăng lượng ChIFN α nên tăng tính kháng virus và bảo vệ các tế bào khỏe khác khỏi sự xâm nhiễm của virus. Ngoài ra, *B. subtilis* có khả năng tổng hợp kháng sinh, men protease, amylase, acid amin các hợp chất trao đổi khác và cả hoạt động điều hòa miễn dịch (Green *et al.*, 1999; United State Environmental Protection Agency, 1999). Các nghiên cứu lâm sàng cho thấy *B. subtilis* gây kích thích miễn dịch dịch thể và miễn dịch tế bào làm giảm tiêu chảy (Mazza, 1994). Virus gây bệnh Newcastle phát triển mạnh ở đường tiêu hóa gây xuất huyết, viêm loét đường tiêu hóa, gây tiêu chảy nên khi gà được uống *B. subtilis* đã làm giảm hiện tượng tiêu chảy và giảm tỷ lệ chết. Điều này giải thích kết quả bảng 4 là 100% (12/12) những gà sau khi gây nhiễm virus Newcastle với 10⁴ ELD₅₀ đều chết, trong khi đó những gà được cho uống *B.subtilis* trước khi gây nhiễm virus với cùng liều như trên nhưng có 12,5% (3/24) gà sống sót (Bảng 5).

Kết quả ghi nhận số gà chết theo ngày sau khi gây nhiễm theo được trình bày qua bảng 6.

Bảng 6: Thời gian chết của gà thí nghiệm ở các nghiệm thức sau khi gây nhiễm

Nghiệm thức	Số gà chết theo ngày sau khi gây nhiễm (con)											Số trung bình $\bar{x} \pm SD$
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
ChIFN α					2	4	1	2	4			10,15 \pm 1,57
<i>B. subtilis</i> -ChIFN α							2	1	2			11,00 \pm 1,00
<i>B. subtilis</i>	6	6	5	4								5,33 \pm 1,11

Kết quả bảng 6 cho thấy, gà ở lô sử dụng *B.subtilis* -ChIFN α có số ngày trung bình từ lúc gây nhiễm đến khi gà chết (SNTBNĐC) là (11,00 \pm 1,00) dài hơn so với lô ChIFN α (10,15 \pm 1,57) không có ý nghĩa thống kê (P=0,203), nhưng SNTBNĐC của gà ở cả 2 nghiệm thức này đều cao hơn so với gà đối chứng chỉ sử dụng

B. subtilis ($5,33 \pm 1,11$) có ý nghĩa thống kê ($P=0,000$). Điều này cho thấy ChIFN đã hạn chế sự nhân lên của virus làm bệnh tiến triển chậm và kéo dài. Kết quả trên cũng phù hợp với kết quả thí nghiệm của Pei *et al.* (2001) khi sử dụng ChIFN có khả năng làm hạn chế số gà mắc bệnh viêm phế quản truyền nhiễm, làm bệnh chậm tiến triển và giảm mức độ trầm trọng của bệnh.

Để xác định nguyên nhân gây chết gà thí nghiệm, chúng tôi tiếp tục phát hiện virus Newcastle từ gà chết bằng xét nghiệm HA và giám định bằng xét HI với kháng thể đặc hiệu, kết quả được trình bày qua bảng 7.

Bảng 7: Kết quả xét nghiệm virus Newcastle từ gà chết ở các nghiệm thức

Nghiệm thức	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
ChIFN α	13	13	100,00
<i>B. subtilis</i> -ChIFN α	5	5	100,00
<i>B. subtilis</i>	21	21	100,00

Kết quả xét nghiệm cho thấy tất cả gà chết ở các nghiệm thức đều dương tính, cho phép khẳng định gà chết do bị bệnh Newcastle.

Kết quả khảo sát bệnh tích gà thí nghiệm được trình bày qua bảng 8.

Bảng 8: Tần suất xuất hiện bệnh tích gà thí nghiệm chết qua mổ khám (n=39)

Bệnh tích	Tần suất xuất hiện bệnh tích	
	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Dạ dày tuyến xuất huyết	39	100,00
Ruột xuất huyết	39	100,00
Hạch manh tràng viêm xuất huyết, hoại tử	32	82,05
Hậu môn xuất huyết	26	66,67
Khí quản xuất huyết	13	33,33
Lách hoại tử	9	23,08
Não xuất huyết	7	17,95
Dạ dày cơ xuất huyết	6	15,38

Kết quả khảo sát bệnh tích từ gà thí nghiệm cho thấy bệnh tích chủ yếu là hiện tượng xuất huyết ở các cơ quan nội tạng trong đó đáng chú ý là bệnh tích xuất huyết ở đường tiêu hóa với 100% gà khảo sát có bệnh tích xuất huyết ở dạ dày tuyến và ruột. Đây là những bệnh tích đặc trưng của virus Newcastle, đồng thời không phát hiện bệnh tích do những nguyên nhân khác.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Sản phẩm bào tử *Bacillus subtilis* biểu hiện interferon alpha gà có hiệu quả tốt trong việc phòng bệnh Newcastle cho gà thương phẩm khi cấp qua đường uống.

Cần tiếp tục khảo sát hiệu quả của sản phẩm này đối với các bệnh do virus khác với những đường cấp khác nhau.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Green D.H., Wakeley P.R., Page A., Barnes A., Baccigalupi L., Ricca E., and Cutting S.M. (1999). Characterization of two bacillus probiotics, *Appl. Environ. Microbiol.* 65(9), pp. 4288-4291
- Livonesi M.C., de Sousa R.L., Badra S.J., Figueiredo L.T. (2007). “*In vitro* and *in vivo* studies of the interferon-alpha action on distinct orthobunyavirus”. *Antiviral Res.* 75(2), pp.121-128.
- Marcus P.I., van der Heide L., Sekellick M.J. (1999). “Interferon action on avian viruses. I. Oral administration of chicken interferon-alpha ameliorates Newcastle disease”. *J. Interferon Cytokine Res.* 19(8), pp.881-885.
- Mazza P. (1994). “The use of *Bacillus subtilis* as an antidiarrhoeal microorganism”. *Bol. Chi. Farm.* 133 (1), pp.3-18.
- Meng S., Yang L., Xu C., Qin Z., Xu H., Wang Y., Sun L., Liu W. (2011). “Recombinant chicken interferon- α inhibits H9N2 influenza virus *in vivo* by oral administration”. *J. Interferon Cytokine Res.*, 20(5), pp.1-6.
- Mo C.W., Cao Y.C., Lim B.L. (2001). “The *in vivo* and *in vitro* effects of chicken interferon alpha on infectious bursal disease virus and Newcastle disease virus infection”. *Avian Dis.* 45(2), pp.389-399.
- Nguyễn Ngọc Ân, Nguyễn Thị Thu Trang, Nguyễn Thanh Tố Nhi, Hồ Thị Việt Thu, Nguyễn Ngọc Hải và Trần Thu Hoa. (2010). “Tác dụng *invitro* kháng virus gây bệnh Gumboro và tả gà của *Bacillus subtilis* tái tổ hợp biểu hiện interferon alpha gà”. *Tuyển tập hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc khu vực phía Nam 2009*. Nhà xuất bản Khoa Học và Kỹ Thuật, trang 376-381.
- Nguyễn Như Thanh, Nguyễn Bá Hiên và Trần Thị Lan Hương, (1997). *Vi sinh vật Thú Y*. Nhà Xuất bản Nông Nghiệp Hà Nội.
- Plachy J., Weining K.C., Kremmer E., Puehler F., Hala K., Kaspers B., Staeheli P. (1999). “Protective effects of type I and type II interferons toward Rous sarcoma virus-induced tumors in chickens”. *J. Virol.* 256(1), pp.85-91.
- Ryan B., Joiner B.L., Ryan J.R. (2000), *Minitab statistis software release 13*, Duxdury Press.
- Schulz U., Rinderle C., Sekellick, M.J., Marcus, P.I. and Staeheli, P. (1995). “Recombinant chicken ineterferon from *Escherichia coli* and transfected COS cells is biologically active”, *Eur. J. Bioch.* 229(1), pp. 73–76.
- Sinha J., Plantz BA., Inan M., Meagher MM. (2005). “Causes of proteolytic degradation of secreted recombinant proteins produced in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: case study with recombinant ovine interferon-T”, *Biotech. Bioengin.* , 89(1), pp.102-112.
- Tizard I.R. (2004). “Cytokines and the immune system”. *Veterinary immunology - An introduction*. 7th ed, Elsevier, USA, pp. 133-143.
- Tran Thu Hoa, Le Hoang Duc, Isticato R., Baccigalupi L., Ricca E., Phan Huynh Van and Cutting S.M. (2001). “Fate and dissemination of *B. subtilis* in murine model”. *Appl. Inv. Micr.*, pp.3819-3823.
- United State Environmental Protection Agency (1997). “*Bacillus subtilis* final risk assessment”, http://epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra009.htm.