

## POSTĘPY W OPRACOWANIU SZCZEPIONKI ANTY-CAMPYLOBACTER PRZEZNACZONEJ DLA DROBIU

Agnieszka Wyszyńska\*, Patrycja Kobierecka, Katarzyna Elżbieta Jagusztyn-Krynicka

Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Wpłynęło w lipcu, zaakceptowano w październiku 2019 r.

**Streszczenie:** Zakażenie bakteriami *Campylobacter jejuni/coli* jest wiodącą bakteryjną przyczyną biegunki u ludzi zarówno w krajach rozwijających się, jak i rozwiniętych. Badania epidemiologiczne wykazują, że większość przypadków kampylobakteriozy jest wynikiem konsumpcji zanieczyszczonego tymi pałeczkami niedogotowanego mięsa drobiowego. Śmiertelność związana z zakażeniem *Campylobacter* jest niska a większość pacjentów nie wymaga specjalnej terapii. Antybiotyki stosowane są jedynie w ciężkich, ogólnoustrojowych zakażeniach lub u pacjentów z upośledzoną odpornością. Dane epidemiologiczne odnotowują jednak coraz więcej przypadków poważnych autoimmunologicznych i neurologicznych powikłań rozwijających się w następstwie infekcji pałeczkami z rodzaju *Campylobacter*. Obecne działania krajów UE zmierzające w kierunku poprawy higieny i bezpieczeństwa biologicznego nie są wystarczające, aby kontrolować lub wyeliminować *Campylobacter* z łańcucha pokarmowego drobiu. Szacuje się, że zmniejszenie poziomu liczby *Campylobacter* w jelitach kurcząt powinno, w sposób znaczący, doprowadzić do ograniczenia częstości występowania kampylobakteriozy u ludzi. Publikacja przedstawia aktualny stan wiedzy na temat immunoprofilaktyki anty-*Campylobacter* u drobiu.

1. Kampylobakterioza – dane epidemiologiczne, objawy chorobowe. 2. Kampylobakterioza – źródło zakażenia. 3. Kampylobakterioza – profilaktyka. 4. Immunizacja kurcząt. 4.1. Bierna immunizacja. 4.2. Szczepionki całokomórkowe. 4.3. Szczepionki podjednostkowe. 5. Strategie opracowania nowoczesnych szczepionek podjednostkowych. 5.1 Poszukiwanie antygeny. 5.2. Wybór nośnika. 6. Modulacja odpowiedzi immunologicznej. 7. Droga podania antygeny. 8. Podsumowanie

### ADVANCEMENTS IN DEVELOPING ANTI-CAMPYLOBACTER VACCINE FOR POULTRY

**Abstract:** *Campylobacter jejuni/coli* is the leading bacterial cause of diarrhoea in humans in both developing and developed countries. Epidemiological studies show that most cases of campylobacteriosis are the result of the consumption of undercooked, contaminated poultry meat. Although campylobacteriosis is largely a self-limiting disease with low mortality, a specific treatment is required for patients infected with strains resistant to clinically important antibiotics and for patients who develop neurological symptoms or bacteremia in course of infection. Despite intensive efforts to improve an on-farm biosecurity practice over the past decade, about 70% of EU broiler chicken flocks remain *Campylobacter*-positive at slaughter. Control of spreading the *Campylobacter* infection in flocks of chickens by biosecurity actions turned out rather ineffective. The most efficient strategy to decrease the number of human *Campylobacter* infections may be to implement an immunoprophylactic method, namely, the protective vaccination of chickens. The publication presents the current state of knowledge on anti-*Campylobacter* immunoprophylaxis in poultry.

1. Campylobacteriosis – epidemiological data, disease symptoms. 2. Campylobacteriosis – source of infection. 3. Campylobacteriosis – prophylaxis. 4. Immunization of chicken. 4.1. Passive immunization. 4.2, *Campylobacter* Whole-cell Vaccines. 4.3. Subunit vaccines. 5. Strategies for developing modern subunit vaccines. 5.1 Searching for antigen. 5.2. The choice of a carrier. 6. Modulation of immune response. 7. The route of antigen administration. 8. Summary

**Słowa kluczowe:** antygeny, *Campylobacter*, immunoprofilaktyka, szczepionki

**Key words:** antigens, *Campylobacter*, immunoprophylaxis, vaccine

### 1. Kampylobakterioza – dane epidemiologiczne, objawy chorobowe

Bakterie rodzaju *Campylobacter* spp. to Gram-ujemne, mikroaerofilne, ruchliwe, spiralnie skręcone pałeczki należące do klasy *Epsilonproteobacteria*. Rodzaj ten tworzy 39 gatunków i 16 podgatunków [56]. Od 2005 roku kampylobakterioza jest najczęściej diagnozowaną zoonozą u mieszkańców państw członkowskich Unii Europejskiej. Według danych Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA, European

Food Safety Authority) w 2017 roku potwierdzono 246 158 przypadków infekcji pałeczkami *Campylobacter*, przy wskaźniku zachorowalności 64,8 na 100 000 osób [22]. W Stanach Zjednoczonych w 2017 r. patogen ten był najczęstszą przyczyną chorób przenoszonych przez żywność [58]. W ciągu ostatnich 10 lat częstość występowania i rozpowszechnienie kampylobakteriozy wzrosły również w krajach rozwijających się. Dane z części Afryki, Azji i Bliskiego Wschodu wskazują na endemiczny charakter kampylobakteriozy na tych obszarach, szczególnie u dzieci. Wskaźnik DALY

\* Autor korespondencyjny: Agnieszka Wyszyńska, Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; tel. 22 554-13-41; e-mail: agawysz@biol.uw.edu.pl

(disability adjusted life-years – lata życia skorygowane niesprawnością) dla zakażeń *Campylobacter* na całym świecie wynosi 7,5 mln, i wśród czynników etiologicznych biegunek ustępuje tylko wskaźnikowi DALY oznaczonemu dla rotawirusów [64].

Ze względu na łagodny, zwykle, przebieg zakażenia szacuje się, że zgłaszany jest tylko jeden na 47 przypadków kampylobakteriozy, co oznacza, że liczba infekcji *Campylobacter* jest wielokrotnie zaniżona [32]. W Polsce przyczyną małej liczby odnotowanych przypadków jest najprawdopodobniej nieskuteczny system monitorowania zakażeń tymi pałeczkami. W 2014 roku zapadalność w Polsce wynosiła 1,69 na 100 000 osób i należała do jednej z najniższych w Europie [80]. W krajach rozwijających się, podobnie jak w Polsce, dane epidemiologiczne zakażeń pałeczkami *Campylobacter* są fragmentaryczne, co wynika z niesprawnego programu nadzorowania przypadków kampylobakteriozy, bądź z jego braku. Jednocześnie, w przeciwieństwie do krajów rozwiniętych, przebieg infekcji *Campylobacter* u dorosłych jest w większości asymptomatyczny a manifestacja objawów zakażenia obserwowana jest głównie u dzieci poniżej piątego roku życia [73]. Sugeruje to, że kontakt z tym enteropatogenem we wczesnym dzieciństwie prowadzi do rozwoju odporności ochronnej [6, 45].

Kampanylobakteriozę u ludzi wywołuje najczęściej infekcja jednym z dwóch gatunków: *C. jejuni* lub *C. coli*. W krajach rozwijających się są one przyczyną odpowiednio 89–96% i 4–11% infekcji [76]. Odnotowywane są także nieliczne przypadki zakażeń wywołane przez inne gatunki, tj. *C. lari* lub *C. fetus* [44]. Zakażenie *Campylobacter* może przebiegać bezobjawowo, zwykle jednak wiąże się z występowaniem ostrych stanów zapalnych jelit, którym towarzyszy długotrwała, śluzowata biegunka. Objawy ustępują zazwyczaj samoistnie po około 7 dniach. Niekiedy infekcje pałeczkami *Campylobacter* prowadzą do rozwoju chorób autoimmunologicznych i neurologicznych, których przykładem jest neuropatia obwodowego układu nerwowego tj. zespół Guillaina-Barré (GBS, Guillain-Barré Syndrome) [19, 29]. Ryzyko jego wystąpienia, zwykle niewielkie (trzy przypadki na 10 000 zdiagnozowanych przypadków kampanylobakteriozy), wzrasta po infekcji określonymi serotypami (m. in. HS19, HS41) [87]. U podstaw rozwoju GBS leży zjawisko mimikry molekularnej. Powstające podczas infekcji *Campylobacter* przeciwciała rozpoznające bakteryjny lipooligosacharyd (LOS) wiążą się z gangliozydami występującymi na powierzchni komórek Schwanna i neuronu (GM1 i GD1a), co aktywuje układ dopełniacza, prowadzi do powstania kompleksu atakującego błonę (MAC, Membrane Attack Complex) i w konsekwencji, do uszkodzenia komórek nerwowych. Przyłączenie się przeciwciał w okolicy węzła Ranviera jest natomiast przyczyną zablokowania

kanałów sodowych, a tym samym zaburzeń polaryzacji komórki, czego efektem jest spowolnienie przewodnictwa nerwowego. Ponadto spowodowana infekcją aktywacja limfocytów T może wywołać migrację makrofagów w kierunku zajętego nerwu, a towarzyszące jej uwolnienie mediatorów stanu zapalnego prowadzić do uszkodzenia mieliny [19]. Aktualne badania wskazują również na związek pomiędzy zakażeniem *Campylobacter* a występowaniem reaktywnego zapalenia stawów [1, 88], zespołu nadwrażliwości jelita (IBS, Irritable Bowel Syndrome) oraz nowotworów jelita grubego [44].

W przebiegu infekcji znaczenie ma zarówno patogenność zakażającego szczepu, jak i funkcjonowanie układu odpornościowego gospodarza [44]. U ludzi z niesprawnie działającym układem odpornościowym (ludzie starsi, ludzie po przebytych chorobach nowotworowych czy zainfekowani wirusem HIV) *Campylobacter* jest często przyczyną infekcji uogólnionych oraz posocznicy [44, 76].

## 2. Kampanylobakterioza – źródło zakażenia

Do transmisji infekcji *Campylobacter* między ludźmi dochodzi bardzo rzadko. Źródłem zakażenia może być spożycie zanieczyszczonej komórkami patogena wody, niepasteryzowanego mleka czy też mięsa wołowego. Badania epidemiologiczne wykazują jednak, że większość przypadków kampanylobakteriozy wywoływanych jest spożyciem zainfekowanego pałeczkami niedogotowanego mięsa drobiowego, co jest zgodne z obserwacją, że głównym rezerwuarem pałeczek *Campylobacter* jest drób hodowlany oraz dzikie ptactwo [19, 85]. W 2016 r., według raportu EFSA, 36,7% przebadanych tuszek brojlerów dostępnych na rynku europejskim było zanieczyszczonych *Campylobacter* w liczbie przekraczającej 4 log<sub>10</sub> jtk/g mięsa. Niska dawka infekcyjna dla ludzi sprawia, że do zakażeń na tle *Campylobacter* dochodzi łatwo i często. W ostatnich latach odsetek ten pozostaje na względnie stałym poziomie, choć w roku 2015 dla EU wynosił 47%. Występują też znaczne różnice między poszczególnymi państwami członkowskimi Unii Europejskiej, co jest m.in. wynikiem stosowania różnych strategii pobierania próbek i metod testowania [21, 23]. Na polskim rynku bakteriami rodzaju *Campylobacter* zanieczyszczonych jest ponad 50% tusz drobiowych [49].

Poziom kolonizacji jelita ptaków przez *Campylobacter* spp. osiąga nawet 10<sup>9</sup> jtk/gram zawartości jelita. Większość przeprowadzonych dotychczas badań wskazuje, że wysoki poziom kolonizacji jelit kurcząt nie powoduje objawów chorobowych u ptaków, co uniemożliwia odizolowanie zainfekowanych osobników od stada [54, 93]. Hermans i wsp. sugerowali, że stan taki jest wynikiem nieskuteczności układu odpornościowego

kurcząt połączonej z mechanizmami, które przekierowują odpowiedź zwierząt na tolerowanie patogena [35]. Doniesienia z ostatnich lat opisują jednak szkodliwe skutki zdrowotne kolonizacji jelit kurcząt przez *Campylobacter* [5, 40, 99]. W 2014 r. zaobserwowano np., że uszkodzenia błony śluzowej jelit brojlerów wywołane przez szczep *C. jejuni* M1, co umożliwiło translokację bakterii, takich jak np. *E. coli*, ze światła jelita do głębiej położonych tkanek. W efekcie u ptaków wystąpił ostry stan zapalny i biegunka [4, 5, 11, 40]. Uzyskane wyniki nakazują zatem zweryfikowanie przekonania, że *Campylobacter* jest wyłącznie komensalem ptaków.

Obecność *Campylobacter* jest wykrywana w przewodzie pokarmowym ptaków hodowlanych dopiero po 2 tygodniu ich życia [17, 67]. Sugeruje to istnienie mechanizmu przeciwdziałającego kolonizacji młodych ptaków przez tego patogena. Spekulowano, że za ten stan odpowiada wysoki poziom swoistych przeciwciał matczynych [12]. Obserwacje, że kurczęta przebywające w stadach razem z dorosłymi są wolne od *Campylobacter* przez pierwsze kilka tygodni po wylęgnięciu, wydają się to potwierdzać [81]. Istnieją również doniesienia sugerujące, że główną przyczyną, zależnego od wieku, zakażenia kurcząt przez *Campylobacter* jest zmiana składu mikrobiomu ptaków [31]. Przeprowadzone przez Ijaz i wsp. kompleksowe, codzienne badania mikrobiomu kurcząt od 3 do 35 dnia życia ptaków wykazały, że *Campylobacter* pojawia się w 16 dniu życia, tuż po zaobserwowaniu najbardziej znaczących zmian w profilach metabolicznych. Nie można wykluczyć, że jest to wynik pojawienia się środowiskowych czynników stymulujących rozwój tych drobnoustrojów [41].

### 3. Kampylobakterioza – profilaktyka

Duża liczba przypadków kampylobakteriozy, występowanie poinfekcyjnych powikłań, głównie neurologicznych, jak również rosnąca liczba szczepów *Campylobacter* opornych na antybiotyki stosowane w terapii (makrolidy i fluorochinolony) powodują, że zakażenia tym enteropatogenem stanowią poważny problem dla służb medycznych. Mikroorganizm ten znalazł się na opublikowanej w 2017 roku, przez Światową Organizację Zdrowia (World Health Organisation), liście gatunków bakterii będących, głównie ze względu na swą antybiotykooporność, największym zagrożeniem dla zdrowia ludzkiego [101]. W związku z tym, w ostatnich latach wysiłki badaczy skupiają się na opracowaniu strategii zapobiegania infekcjom *Campylobacter*. Ponieważ do zanieczyszczenia tusz drobiowych pałeczkami *Campylobacter* dochodzi na etapie produkcji, kontrolowanie zakażeń na tym poziomie (ubój, sprzedaż detaliczna i konsumpcja) powinno zmniejszyć liczbę przypadków kampylobakteriozy u ludzi. Strategie sto-

sowane w ramach holenderskiego programu CARMA (*Campylobacter* Risk Management and Assessment) nie przyniosły jednak spodziewanych rezultatów [33]. Szacuje się, że ograniczenie poziomu kolonizacji przewodu pokarmowego kurcząt przez patogenne szczepy *Campylobacter* spp. doprowadziłoby do znacznego obniżenia poziomu zachorowań wśród ludzi, a co za tym idzie, znacznej redukcji kosztów opieki zdrowotnej. Spadek liczby komórek *Campylobacter* w jelitach kurcząt zaledwie o 2 log powinien przełożyć się na około trzydziestokrotne obniżenie częstości występowania ludzkich infekcji [79]. Z początkiem 2018 roku weszło w życie Rozporządzenie Komisji UE (nr 2017/1495) wprowadzające kryterium higieny dotyczące bakterii *Campylobacter* w tuszach brojlerów, co umożliwi kontrolę zanieczyszczenia tusz podczas procesu uboju ptaków. Ustalono, że dopuszczalna liczba jtk/gram mięsa drobiowego nie może przekraczać 1000. W związku z powyższym analizowane są metody profilaktyki anty-*Campylobacter* na etapie hodowli drobiu, takie jak: podniesienie higieny na fermach, stosowanie dodatków do pasz lub wody pitnej np. kwasów organicznych i kwasów tłuszczowych, produktów pochodzenia roślinnego, bakteriocyn, bakteriofagów [61]. Wyniki uzyskane przez różne grupy badawcze nie pozwalają na jednoznaczne wnioski. W zależności od użytej metody obserwowano zarówno zmniejszenie poziomu kolonizacji jelit drobiu, jak również brak ochrony przed zasiedleniem jelita [13, 24, 61].

Interesujące badania przeprowadzili w 2015 roku Johnson i wsp. Podczas poszukiwania inhibitorów ekspresji czynnika kolonizacji *Campylobacter* – flagelliny, zidentyfikowali związki, które silnie hamowały wzrost patogena *in vitro* [43]. Aktywność anty-*Campylobacter* w modelu kurzym wykazywała jedynie Campynek-syna A. U połowy kurcząt, które otrzymały ten związek, kolonizacja jelit ślepych przez tego patogena była poniżej poziomu wykrywalności. Jednocześnie u 4 na 9 przebadanych kurcząt w ogóle nie zaobserwowano efektu ochronnego. Rok później Kumar i wsp. [50] zidentyfikowali 12 cząsteczek o właściwościach anty-*Campylobacter* należących do jednej z pięciu klas chemicznych: aryloamin, piperazyn, pirydazynon, sulfonamidów lub piperidyn. Dziesięć z nich wykazywało aktywność wobec patogena zlokalizowanego w komórkach Caco-2. Zaletą tych cząsteczek jest niska cytotoksyczność w stosunku do komórek Caco-2 i brak aktywności hemolitycznej wobec owczych czerwonych krwinek [50].

Duże zainteresowanie zyskało także stosowanie probiotyków jako środka zapobiegania lub zmniejszenia częstości występowania infekcji *Campylobacter* u drobiu [82]. Obiecujące wyniki otrzymały zespoły Konkel i Jagusztyn-Krynockiej [47, 65]. Zaobserwowali oni, że podanie kurczętom szczepów z rodzaju *Lactobacillus*, tj. *L. crispatus*, *L. salivarius*, *L. helveticus*



i *L. gallinarum* prowadzi do obniżenia poziomu kolonizacji jelit ślepych ptaków przez *Campylobacter* [47, 65]. Pałeczki kwasu mlekowego mogą zmniejszać poziom kolonizacji patogenów poprzez stymulację odporności adaptacyjnej, konkurowanie o niszę ekologiczną, koagregację oraz wytwarzanie hamujących metabolitów, takich jak kwasy organiczne czy bakteriocyny [47, 65]. Właściwości anty-*Campylobacter* wykazuje również *Saccharomyces cerevisiae*, który po podaniu broilerom *per os*, znacząco obniżał liczbę komórek patogena w jelicie ślepym, kale i na skórze. *S. cerevisiae* promował wzrost bakterii z rodzaju *Lactobacillus* oraz rywalizował z *Campylobacter* o substancje odżywcze i receptory umożliwiające adhezję do nabłonka jelit [26]. Przyczyną tak odmiennych wyników może być użycie linii kurzych o różnej wrażliwości na *Campylobacter* i probiotyki. Nie bez znaczenia jest również to, jaki szczep *Campylobacter* i jakiej wielkości inokulum zastosowano w eksperymencie kolonizacyjnym.

#### 4. Immunizacja kurcząt

Chów drobiu przeznaczonego na mięso trwa około 42 dni. Z tego powodu kurczęta powinny być zaszczepione krótko po wykluciu, przed ich zetknięciem się z *Campylobacter*. Szczepionka powinna wywoływać odporność krzyżową przeciw *C. jejuni* i *C. coli*, być łatwa w podaniu (*per os* lub *in ovo*), tania w produkcji oraz bezpieczna dla zwierząt i ludzi. Znacznym utrudnieniem w osiągnięciu tego celu jest fragmentaryczna wiedza o funkcjonowaniu układu odpornościowego kurcząt oraz o wpływie humoralnej odpowiedzi na skuteczność immunizacji. Wyniki, nielicznych jak dotąd, doświadczeń są kontrowersyjne.

*C. jejuni* to zewnątrzkomórkowy patogen, choć może przeżyć wewnątrz komórek nabłonka jelitowego, jak również w komórkach układu odpornościowego, takich jak monocyty i makrofagi [37, 98]. Umożliwia to unikanie mechanizmów obronnych układu odpornościowego. Skuteczne przetrwanie wewnątrz komórki wiąże się również z umiejętnością przewyciężenia stresów fizjologicznych, takich jak środowisko oksydacyjne generowane przez ludzkie jelito i przez nabłonek gospodarza lub komórki odpornościowe.

Ponieważ droga infekcji pałeczkami *Campylobacter*, niezależnie od gatunku gospodarza, to droga doustna, uważa się, że główną rolę w procesie ochronnym powinny odgrywać przeciwciała IgA obecne w śluzówce jelit. Ich rolę, jak również znaczenie limfocytów B, w odpowiedzi adaptacyjnej kurcząt przeciwko *Campylobacter* badali w 2017 roku Lacharme-Lora i wsp. [51]. Przeprowadzili oni bursektomię kurcząt (usunięcie torebki Fabrycjusza), w wyniku czego ptaki zostały pozbawione tej klasy limfocytów i, jak

stwierdzono, nie produkowały wydzielniczych przeciwciał sIgA. Naukowcy wykazali, że limfocyty B nie odgrywają istotnej roli w redukcji kolonizacji jelita ślepego przez *Campylobacter* do 7 tygodnia ich życia. Natomiast badanie treści jelitowej ptaków po 9 tygodniach od zakażenia wykazało, że kolonizacja jelita ślepego u ptaków posiadających torebkę Fabrycjusza była mniejsza o ponad 2 log w porównaniu do grupy kurcząt, u których przeprowadzono bursektomię [51]. Wyniki powyższych badań pokazują, że wytwarzanie przeciwciał odgrywa rolę w ograniczaniu infekcji *Campylobacter*, jednak proces ten wymaga dłuższego czasu aniżeli czas życia komercyjnego kurczęcia (7 tygodni).

Jednocześnie badania przeprowadzone przez Humphreya i wsp. [40] wykazały, że znaczący wpływ na wynik zakażenia *C. jejuni* i odpowiedź immunologiczną ma rasa kurcząt. Cztery komercyjne rasy brojlerów wykorzystane w eksperymencie różniły się czasem trwania i rozmiarem reakcji zapalnych, czego efektem była kolonizacja bądź choroba z uszkodzeniem błony śluzowej jelita [40]. Zaobserwowano również, że nie wszystkie kurczęta tej samej rasy są kolonizowane przez pałeczki eneteropatogena na zbliżonym poziomie, a oporność wydaje się być genetycznie zdeterminowana. Connel i wsp. [18] przy wykorzystaniu wysokoprzepustowego sekwencjonowania ptasiego genomu zidentyfikowali 219 genów wykazujących różny poziom ekspresji u kur opornych i u kur podatnych na kolonizację przewodu pokarmowego przez *C. jejuni*. Produkty tych genów biorą udział we wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, przekazywaniu sygnałów przez cytokiny, aktywacji limfocytów B i komórek T oraz wytwarzaniu immunoglobulin [18].

Oprócz nikłej wiedzy dotyczącej funkcjonowania układu odpornościowego kurcząt przyczyną dotychczasowych niepowodzeń w opracowaniu szczepionki dla kurcząt jest również wspomniana wcześniej różnorodność genetyczna szczepów *Campylobacter*.

##### 4.1. Bierna immunizacja

Bierna immunizacja polega na podaniu do uodparnianego organizmu surowicy odpornościowej. Hermans i wsp. [36] wykazali, że domięśniowa immunizacja sześciodniowych kurcząt przeciwciałami IgY otrzymanymi z żółtek jaj pochodzących od kur szczepionych lizatem *C. jejuni* prowadzi do obniżenia kolonizacji o cztery rzędy wielkości w porównaniu do grupy kontrolnej [36]. Dodatkowo zaobserwowano zmniejszoną transmisję *Campylobacter* do niezarażonych kurcząt. Natomiast w badaniach Paul i wsp. [71] immunizacja dodziobowa ptaków przeciwciałami IgY uzyskanymi z żółtek jaj kur niosek immunizowanych mieszkanką 7 antygenów *Campylobacter*, tj. adhezyną Peb1A, lipoproteiną JlpA (Jejuni lipoprotein A), białkiem CadF

wiążącym fibronektynę, podjednostką flageliny FlaA, MOMP (Major Outer Membrane Protein), FlpA oraz składnikiem pompy wielolekowej CmeC nie wykazała efektu ochronnego [71]. Rozbieżne wyniki potwierdzają obserwację, że efekt ochronny zależy od wielu czynników. W przytoczonych wyżej badaniach zastosowano m.in. inny schemat immunizacji oraz model kurzy.

#### 4.2. Szczepionki całokomórkowe

Jak dotąd próby opracowania skutecznej szczepionki powstałej w oparciu o zabite komórki patogena, tzw. CWC, nie powiodły się. Jedną z przyczyn niepowodzenia jest wysoka zmienność genetyczna *Campylobacter*. Dotyczy ona głównie genów kodujących białka biorące udział w syntezie LOS (lipooligosaccharide), CPS (capsular polysaccharide), biogenezie rzęsek czy aparatu ruchu. Występowanie licznych wariantów strukturalnych CPS oraz LOS pozwala na aktywne unikanie działania układu odpornościowego gospodarza [19, 25, 30, 100]. Sekwencjonowanie szczepów *C. jejuni* NCTC11168, 33292 and 81-176 przed i po pasażu przez przewód pokarmowy broilerów wskazuje, że środowisko to sprzyja powstawaniu zmienności genetycznej *C. jejuni*. Takiej prawidłowości nie obserwowano po pasażu przez przewód żołądkowo-jelitowy myszy [100]. Rodzaj *Campylobacter* charakteryzuje „otwarty genom”. Oznacza to, że w każdym nowo zsekwencjonowanym genomie szczepów tego rodzaju identyfikowane są unikatowe geny. Porównanie materiału genetycznego 7 szczepów *C. jejuni* i *C. coli* wykazało, że geny podstawowe, a więc występujące w genomach wszystkich przedstawicieli rodzaju, stanowią jedynie 59% [60]. Konstrukcja szczepionki CWC dla drobiu wydaje się być dużym wyzwaniem również dlatego, że kurczęta w trakcie swojego życia wielokrotnie ulegają kolonizacji przez różne szczepy *Campylobacter* spp. [86].

#### 4.3. Szczepionki podjednostkowe

Inna strategia zakłada wykorzystanie do immunizacji specyficznych oczyszczonych antygenów (z adiuwantem lub bez) lub dostarczanie ich do organizmu immunizowanego za pomocą odpowiednich nośników np. atenuowanego szczepu *Salmonella enterica* (sv. Typhimurium lub sv. Enteritidis), *E. coli*, *Eimeria tenella* lub nanocząstek. Szczepionki podjednostkowe uważane są za najbezpieczniejsze, lecz ich immunogenność w porównaniu do szczepionek zawierających całe komórki patogena, jest dużo niższa. Kluczową rolę w skuteczności szczepionki podjednostkowej odgrywa wybór antygeny. Potencjalny antygen powinien być rozpoznawany przez układ odpornościowy immunizowanego organizmu. Cechą niezbędną jest jego produkcja *in vivo*, gdy patogen oddziałuje z komórkami

gospodarza. Poza tym antygen szczepionkowy powinien być silnie konserwowany w obrębie różnych serotypów/genotypów, co ma szczególnie duże znaczenie w sytuacji, gdy patogenny organizm cechuje wysoki poziom zmienności genetycznej.

Do tej pory do konstrukcji prototypów szczepionek anty-*Campylobacter* użyto m.in. podjednostkę flageliny FlaA (flagellin subunit protein A), główne białko błony zewnętrznej (MOMP), składnik pompy wielolekowej CmeC, lipoproteiny CjaA i CjaC, białko związane z peptydoglikanem CjaD, adhezyną PEB1, żelazowy receptor enterobakteryjny CfrA (*Campylobacter jejuni* ferric-enterobactin receptor), dysmutazę ponadtlenkową SodB (Superoxide dismutase B) oraz białko wiążące DNA Dps (DNA binding protein from starved cells). Zastosowanie niezmodyfikowanego FlaA jako antygeny nie chroniło przed zakażeniem heterologicznymi szczepami. W przypadku FlaA-LTB (heat-labile enterotoxin B subunit), rCmeC, Dps SodB oraz FlaA w fuzji translacyjnej z domeną flageliny *S. enterica* aktywującą TLR5 (Toll-like receptor 5), indukowana odpowiedź immunologiczna (specyficzne wydzielnicze przeciwciała klasy sIgA w śluzie jelitowej oraz IgG w surowicy) zapewniała jedynie ograniczoną ochronę. Natomiast wyniki uzyskane po podaniu białka CjaA były wysoce zmienne, zależne od dawki preparatu, drogi podawania oraz schematu jego aplikacji [10, 16, 53, 92, 103] (Tab. I).

### 5. Strategie opracowania nowoczesnych szczepionek podjednostkowych

#### 5.1. Poszukiwanie antygeny

Tradycyjne techniki immunologii molekularnej do identyfikacji szczepionek są czasochłonne. Szeroka gama technologii (m.in. STM – Signature-tagged transposon mutagenesis, GSH – Genomic subtractive hybridization, SCOTS – Selective capture of transcribed sequences, sekwencjonowanie całego genomu, badania transkryptomyczne, proteomiczne) w połączeniu z metodami bioinformatycznymi zrewolucjonizowało proces poszukiwania atrakcyjnych kandydatów do konstrukcji szczepionek. Technika IIVIAT (*in vivo*-induced antigen technology) pozwala na przykład na identyfikację genów ulegających ekspresji *in vivo*, a więc podczas oddziaływania między gospodarzem i drobnoustrojem [77]. Kodowane przez nie białka mogą odgrywać ważną rolę w patogenezie w określonym układzie gospodarz-patogen, a ich potencjalny udział w wirulencji sprawia, że brane są również pod uwagę jako antygeny do opracowania szczepionek podjednostkowych czy jako markery diagnostyczne. Przeszukanie ekspresyjnej biblioteki genomowej (do stworzenia której

Tabela I  
Prototypy szczepionek anty-*Campylobacter*

Antygen	Kurzy model badawczy	Schemat immunizacji	Adiuwant	Zakażenie <i>Campylobacter</i>	Protekcja	Źródło
<b>Białka rekombinowane, nadproduktowane w systemie ekspresji <i>E. coli</i></b>						
Białko hybrydowe CadF-FlaA-FlpA	Broilery SPF	Podskórnice, 6 i 16 d.ż.	Montanid ISA 70VG	20 d.ż., <i>C. jejuni</i> F38011, 10 <sup>8</sup> jtk	27 d.ż., redukcja o 3 log10	[65]
Białko NHC	Ross308	<i>In ovo</i>	-	18 d.ż., <i>C. jejuni</i> 81-176, 10 <sup>5</sup> jtk	25 d.ż., brak protekcji	[75]
SodB	Leghorn	<i>Per os</i> , 1 i 14 d.ż.	TiterMax Gold*	28 d.ż., <i>C. jejuni</i> M1, 10 <sup>7</sup> jtk	35 d.ż., redukcja o 1 log10	
Dps	Cornish Rock	Podskórnice, 10 i 24 d.ż.	CFA	34 d.ż., <i>C. jejuni</i> NCTC11168, 10 <sup>5</sup> jtk	44 d.ż., brak protekcji	[92]
CmeC	Broilery	<i>Per os</i> ; 7 i 14 d.ż.	LT-R192G	35 d.ż., <i>C. jejuni</i> NCTC11168, 10 <sup>6</sup> jtk	45 d.ż., brak protekcji	[106]
N-glikozylowana nietaktywna ToxC <i>C. diphtheria</i>	SPF Leghorn	Podskórnice, 7 i 21 d.ż.	CFA, IFA	28 d.ż., <i>C. jejuni</i> 81-176, 10 <sup>6</sup> jtk	35 d.ż., redukcja o 7 log10	[68]
CjaA	SPF Light Sussex	Podskórnice, 1 i 15 d.ż.	TiterMax*	28 d.ż., <i>C. jejuni</i> M1, 10 <sup>7</sup> jtk	49 d.ż., redukcja o 1.9 log10	[10]
<b>Podjednostkowe szczepionki skonstruowane z wykorzystaniem wektorów</b>						
<i>S. Enteritidis</i> $\Delta$ aroA $\Delta$ htr/epitopy CjaD	Broilery	<i>Per os</i> , 1 d.ż.	-	21 d.ż., <i>C. jejuni</i> wyizolowany od kurcząt, 10 <sup>7</sup> jtk	32 d.ż., redukcja o 5 log10	[53]
<i>S. Typhimurium</i> $\chi$ 9718/ CjaD	Broilery	<i>Per os</i> , 1 i 14 d.ż.	-	28 d.ż., <i>C. jejuni</i> , 10 <sup>7</sup> jtk	35 d.ż., brak protekcji	[57]
<i>S. Typhimurium</i> $\chi$ 9088/ Dps	Cornish Rock	<i>Per os</i> ; 3, 10 i 16 d.ż.	CFA	26 d.ż., <i>C. jejuni</i> NCTC11168, 10 <sup>5</sup> jtk	36 d.ż., redukcja o 2.5 log10	[92]
<i>S. Enteritidis</i> $\Delta$ aroA $\Delta$ htr/epitopy CjaA	Broilery Cobb 500	<i>Per os</i> , 1 d.ż.	-	21 d.ż., <i>C. jejuni</i> wyizolowany od kurcząt, 10 <sup>7</sup> jtk	32 d.ż., redukcja o 2 log10	[53]
<i>S. Typhimurium</i> $\chi$ 3987/ CjaA	Broilery	<i>Per os</i> , 1 i 14 d.ż.	-	28 d.ż., <i>C. jejuni</i> 72Dz/92, 10 <sup>6</sup> jtk	37 i 40 d.ż., redukcja o 6 log10	[103]
<i>S. Typhimurium</i> $\chi$ 9718/ CjaA	Broilery Cobb 500	<i>Per os</i> , 1 i 14 d.ż.	-	28 d.ż., <i>C. jejuni</i> Wr1, 10 <sup>5</sup> jtk	35 i 42 d.ż., brak protekcji,	[52]
<i>S. Typhimurium</i> $\Delta$ aroA/ TetC-CjaA	SPF Light Sussex	<i>Per os</i> , 1 i 15 d.ż.	-	28 d.ż., <i>C. jejuni</i> M1, 10 <sup>7</sup> jtk	56 d.ż., redukcja o 1.5 log10	[10]
OMP zamknięte w nanocząstkach	Nie podana rasa kur	<i>Per os</i> ; podskórnice, 7 i 21 d.ż.	-	35 d.ż., <i>C. jejuni</i> 81-176, 10 <sup>7</sup> jtk	42 d.ż., podskórnice redukcja o 6 log10	[2]
Martwe komórki <i>E. coli</i> K12/ N-glikan <i>Campylobacter</i>	SPF Leghorn	<i>Per os</i> ; 7 i 21 d.ż.	-	28 d.ż., <i>C. jejuni</i> 81-176, 10 <sup>3</sup> jtk	35 d.ż., redukcja o 4 log10	[68]
Żywe komórki <i>E. coli</i> K12/ N-glikan <i>Campylobacter</i>	SPF Leghorn	<i>Per os</i> ; 7 i 21 d.ż.	-	28 d.ż., <i>C. jejuni</i> 81-176, 10 <sup>3</sup> jtk	35 d.ż., redukcja o 8 log10	[68]
OMV/ N-glikan <i>Campylobacter</i>	Leghorn	<i>Per os</i> ; 7 i 21 d.ż.	-	28 d.ż., <i>C. jejuni</i> 81-176, 10 <sup>2</sup> jtk	35 d.ż., redukcja o 4 log10	[74]

d.ż. - dzień życia; Białko NHC - białko fuzyjne zawierające flagelinę *C. jejuni* i domenę flageliny *S. Typhimurium* aktywującą TLR; SPF (Specific Pathogen Free) - wolne od specyficznego patogena; OMP (Outer Membrane Proteins) - białka błony zewnętrznej; Dps (DNA binding protein from starved cells) - białko wiążące DNA z komórek głodujących; CmeC - składnik pompy wielolekowej; ToxC - toksyna *Clostridium diphtheriae*; SodB (Superoxide dismutase B) - dysmutaza ponadtlenkowa B; TetC - toksyna tężcza; jtk - jednostka tworząca kolonię; OMV (Outer Membrane Vesicles) - pecherzyki błony zewnętrznej;  $\Delta$ aroA - inaktywowany szlak syntezy aminokwasów aromatycznych;  $\Delta$ htr - inaktywacja genu kodującego proteazę serynową; CFA - kompletny adiuwant Freund'a (complete Freund's adjuvant), IFA - niekompletny adiuwant Freund'a (incomplete Freund's adjuvant).

wykorzystano DNA zsekwencjonowanego szczepu *C. jejuni* NCTC11168) za pomocą ludzkiej surowicy od rekonwalescentów, wysyconej dodatkowo białkami szczepu *Campylobacter* hodowanego w warunkach laboratoryjnych, doprowadziło do zidentyfikowania 24 genów. Ich produkty pełnią różne funkcje metaboliczne (m.in. *leuC*, *ptmB*, *eno* i *fcl*), są zaangażowane w procesy biosyntezy (m.in. *tufB*) czy procesowanie informacji genetycznej. Dwa geny wykryte w tym eksperymencie (*cj1471c* oraz *cj1587c*) biorą udział w transporcie aminokwasów [39]. Podobna analiza została przeprowadzona z wykorzystaniem surowicy od kurcząt wysyconej białkami szczepu *Campylobacter* hodowanego *in vitro* [38]. Ten schemat postępowania doprowadził do identyfikacji 28 genów, z których jedynie pięć ulega ekspresji *in vivo* w obu gospodarzach, co jest prawdopodobnie wynikiem zupełnie innego przebiegu infekcji u ludzi i kurcząt. Zwraca uwagę fakt, że wśród wyróżnionej puli genów nie ma tych kodujących białka wykorzystane do konstrukcji prototypów szczepionek podjednostkowych (*cjaA*, *peb1*, *dps*). Analiza ta nie wykryła również genów takich jak *cadF*, *ciaB*, *pldA*, których unieczynnienie bezsprzecznie, jak wykazano w innych laboratoriach, obniża zdolność mikroorganizmu do kolonizacji.

Zastosowana po raz pierwszy w badaniach nad szczepionką przeciwko meningokokom grupy B „odwrotna wakcynologia” (reverse vaccinology) umożliwia identyfikację antygenów szczepionkowych *in silico*. Strategię taką zastosowali Meunier i wsp. [62]. W genomie *C. jejuni* 81176 poszukiwali genów kodujących białka zlokalizowane na powierzchni komórki o potencjalnych właściwościach adhezyjnych. Następnie analizowali antygenowość wybranych w ten sposób 22 białek i obecność epitopów w ich sekwencjach aminokwasowych (VaxiJen, BCPreds). Zwraca uwagę w tej grupie znaczący udział białek związanych z aparatem ruchu *Campylobacter* [62].

Spśród przetestowanych na brojlerach sześciu białek, cztery zmniejszyły liczbę *Campylobacter* w stolcu nawet o cztery rzędy wielkości z jednoczesnym rozwojem humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Natomiast w drugim badaniu, pomimo zaindukowania silnej odpowiedzi immunologicznej, nie zaobserwowano protekcji u kurcząt [63].

Trzeba jednak pamiętać, że nie zawsze geny wskazwane metodami bioinformatycznymi/ mikromacierzy kodują białka istotne w indukcji ochronnej odpowiedzi immunologicznej.

Ciekawą strategią mającą na celu przezwyciężenie problemu wysokiej różnorodności genetycznej szczepów *Campylobacter*, a także zwiększenie efektywności immunizacji, było zastosowanie hybrydowych białek zawierających epitopy różnych antygenów. Prowadzone aktualnie porównawcze analizy genomów oraz

proteomów wielu szczepów mają na celu poszukiwanie nowych antygenów *Campylobacter* przydatnych do konstrukcji szczepionki lub białek potencjalnie z możliwością wykorzystania jako celów nowych leków. W ostatnich latach nastąpił znaczny rozwój narzędzi umożliwiających wydajną analizę *in silico*. Badania immunoinformatyczne proteomu *Campylobacter* przeprowadzone w 2017 roku doprowadziły do identyfikacji kilku epitopów, które są konserwowane, prezentowane przez cząsteczki MHC-I i potencjalnie mogą zostać wykorzystane w opracowywaniu szczepionki chroniącej przed kampylobakteriozą [42, 59]. Ich użyteczność musi zostać jednak potwierdzona eksperymentalnie.

## 5.2. Wybór nośnika

Na skuteczność szczepionki, oprócz wyboru antygenów, ma wpływ także wybór nośnika. W tym charakterze stosowane są m.in. atenuowane szczepy różnych mikroorganizmów patogennych, VLPs (Virus Like Particles), wirusów, bakterie komensalne z grupy LAB (Lactic Acid Bacteria) lub też liposomy. Szczepionki podjednostkowe skonstruowane w oparciu o atenuowane szczepy patogenów mają wiele zalet: (1) silnie stymulują odpowiedź humoralną i/lub komórkową nie tylko przeciwko homologicznym antygenom, ale również przenoszonym antygenom heterologicznym, (2) możliwe są różne drogi podania (droga wziewna, donosowa, doustna, dooczną, dopochwowa, doodbytnicza), (3) podane na jeden z wymienionych sposobów indukują mechanizmy odpornościowe związane z błonami śluzowymi jak i ogólnoustrojową odpowiedź immunologiczną, (4) są łatwe i tanie w produkcji, (5) istnieje możliwość ich liofilizacji i przechowywania w temperaturze pokojowej. Przede wszystkim jednak atenuowane patogeny jelitowe przeżywają w środowisku układu pokarmowego zawierającym m.in. różne proteazy, defensyny, lizozym, a zatem są zdolne do ochrony przenieszonego heterologicznego antygeny.

Jako nośnik genów *Campylobacter* wykorzystywano na przykład żywe, atenuowane szczepy *S. enterica* sv. Enteritidis lub Typhimurium [34]. W ostatnich latach opracowano szereg ciekawych rozwiązań, m.in. regulowana opóźniona atenuacja, opóźniona synteza antygeny oraz regulowana opóźniona liza, które poprzez zwiększenie zdolności do przetrwania patogena w środowisku gospodarza, umożliwiają wywołanie optymalnej odpowiedzi immunologicznej. Atenuowane szczepy *Salmonella* były badane jako nośniki antygenów *Campylobacter* w immunoprofilaktyce kurcząt przez kilka grup badawczych [10, 53, 57, 103, 104]. W kilku eksperymentach stosowano wspomniane wcześniej antygeny CjaA i CjaD. Pomimo użycia tego samego antygeny, poziomy redukcji kolonizacji w eksperymentach ochronnych prowadzonych przez różne



grupy badawcze, różniły się diametralnie (od 6 log<sub>10</sub> do braku ochrony przed zakażeniem). Trudno wskazać przyczynę tak odmiennych wyników, jako że eksperymenty różniły się m.in. schematem immunizacji, użytym do zakażenia szczepem *Campylobacter*, rasą kurcząt wykorzystanych w eksperymencie ochronnym, serowarem i rodzajem atenuacji nośnikowego szczepu *Salmonella* oraz obecnością adiuwantu. Antygen CjaA stosowano także w konstrukcji szczepionki z wykorzystaniem *E. tenella* jako nośnika. Szczepionka podana dodziobowo skutkowała nieznacznie obniżonym poziomem kolonizacji [16].

Do przenoszenia obcych antygenów w procesie immunizacji wykorzystywane są również bakterie kwasu mlekowego (LAB). Jest to sztucznie wyodrębniona grupa o olbrzymiej różnorodności genetycznej oraz filogenetycznej, której cechą charakterystyczną jest zdolność do produkcji kwasu mlekowego. Dotychczas przeprowadzone badania wskazują, że podanie takich szczepów prowadzi do indukcji odpowiedzi immunologicznej zarówno w błonach śluzowych (sIgA), jak i ogólnoustrojowej reakcji układu odpornościowego przeciwko ekspresjonowanym heterologicznym antygenom, przy jednoczesnej niskiej odpowiedzi skierowanej przeciwko antygenom szczepu nośnikowego. Jako wektory szczepionkowe posiadają także inne zalety. Umożliwiając immunizację drogą śluzówkową zapewniają większą skuteczność walki z patogenami, dla których to właśnie śluzówka stanowi wrota infekcji. O atrakcyjności bakterii kwasu mlekowego w immunoprofilaktyce lub terapii decyduje również ich oporność na działanie niskiego pH soku żołądkowego oraz zdolność adhezji do komórek nabłonka jelitowego. Kluczową kwestią jest też bezpieczeństwo tych preparatów. Bakterie te (m.in. gatunki należące do rodzajów *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*) posiadają status GRAS, a część z nich zaliczamy do probiotyków, czyli organizmów, których krótkotrwała obecność lub kolonizacja wywiera pozytywny wpływ na wiele elementów fizjologii organizmu gospodarza. Niewątpliwą zaletą są również niskie koszty produkcji tego typu szczepionek oraz możliwość liofilizacji i przechowywania preparatu w temperaturze pokojowej [102].

Jak dotąd, spośród przedstawicieli bakterii z grupy LAB, jako nośnik antygenów *Campylobacter* wykorzystano szczep *Lactococcus lactis*. Szczep *L. lactis* prezentujący na powierzchni rCjaAD wykazywał wyższy efekt ochronny niż szczep *L. lactis* wytwarzający białko zlokalizowane w cytoplazmie oraz od szczepu *L. lactis* prezentującego na powierzchni CjaA, jednak różnice te nie były istotne statystycznie; poziom kolonizacji obniżył się jedynie o 1 rząd wielkości [46].

W roli nośników antygenów *Campylobacter* testowano także cząstki GEM (Gram-positive Enhancer Matrix) uzyskane z komórek *L. salivarius*. Struktury te

zawierają wzorce molekularne związane z patogenami (PAMP, Pathogen Associated Molecular Patterns), przez co zdolne są do indukowania procesów prozapalnych, a więc mogą wzmocnić działanie immunoterapeutyczne [3, 7]. Dodatkowo nie zawierają one rekombinowanego DNA. Cecha ta bywa wyraźnie podkreślana przez przeciwników stosowania, w różnych dziedzinach życia, GMO (Genetically Modified Organism). Jednak cząstki GEM stosunkowo szybko są usuwane z organizmu gospodarza, przez co indukcja odpowiedzi immunologicznej może wymagać skomplikowanych schematów szczepień, kilkukrotnego podawania preparatu [7].

Szczepionka składająca się z cząstek GEM *L. salivarius* prezentujących na powierzchni CjaA i CjaD, podana kurczętom podskórnie lub *per os*, nie prowadziła do obniżenia kolonizacji jelit kurcząt. Natomiast cząstki GEM *L. salivarius* prezentujące rCjaAD podane *in ovo* do zarodka kury w niewielkim stopniu obniżyły poziom kolonizacji jelita ptaków przez pałeczki *Campylobacter* w porównaniu do grupy kontrolnej [46].

Annamalai i wsp. jako nośnik antygenów *Campylobacter* użyli biodegradowalnych i biokompatybilnych nanocząstek – kopolimeru laktyny z glikolidem. Zarówno białka błony zewnętrznej zamknięte w nanocząstkach jak i same białka błony zewnętrznej podane kurczętom podskórnie znacząco obniżały poziom kolonizacji jelit ślepych przez pałeczki patogena [2].

Atrakcyjnymi nośnikami antygenów szczepionkowych są liposomy. Ich przydatność do celów immunizacyjnych po raz pierwszy opisali Allison i Gregoriadis w 1974 roku [97]. Zaletą liposomów – dwuwarstwowych pęcherzyków złożonych z amfipatycznych fosfolipidów, jest wydłużenie czasu uwalniania antygeny z ich wnętrza, ochrona antygeny przed nadmierną proteolizą i ułatwienie wchłaniania przez komórki prezentujące antygen (APC, Antigen-Presenting Cells) [96, 97], co prowadzi do stymulacji odpowiedzi immunologicznej nie tylko typu humoralnego, lecz także typu komórkowego [84]. Poza tym mogą być one produkowane na dużą skalę, przechowywane przez stosunkowo długi czas i, co najważniejsze, są uznane za bezpieczne i dobrze tolerowane przez organizm [78, 97]. Jak dotąd przeprowadzone nieliczne badania wskazują, że liposomy mogą być z powodzeniem stosowane do stymulacji układu odpornościowego kurcząt [15, 55, 105].

Obiecujące wyniki otrzymano w eksperymencie protekcyjnym, w którym wykorzystano liposomy wykorzystane do przeniesienia hybrydowego białka rCjaAD [46]. U ptaków immunizowanych *in ovo* zaobserwowano obniżenie kolonizacji o dwa rzędy wielkości w stosunku do grupy kontrolnej. Zwraca jednak uwagę fakt, że w jelitach połowy kurcząt kolonizacja była na poziomie niewykrywalnym zastosowaną metodą, czyli poniżej 1000 jtk/g zawartości jelita. Wyższy poziom protekcji



warunkowany przez liposomy może sugerować lepszą ochronę antygeny przed degradacją, jak również większą wydajność pobierania przez komórki prezentujące antygen. Jednocześnie może być to pozytywny efekt wczesnej modulacji systemu immunologicznego, co ma szczególne znaczenie w przypadku brojlerów, których długość życia nie przekracza 8 tygodni

Powierzchnia komórek *Campylobacter* bogata jest w glikozylowane białka. Mikroorganizmy te przeprowadzają dwa rodzaje procesu glikozylacji: N-glikozylację i O-glikozylację [90]. Dotychczasowe szczegółowe badania szlaku N-glikozylacji białek w komórkach *C. jejuni* wskazują, że glikoproteiny są silnie immunogennym czynnikiem biorącym udział w kolonizacji jelit kurcząt oraz w procesach adhezji i inwazji do ludzkich komórek nabłonka jelit [68]. N-glikan, konstytutywnie produkowany heptasacharyd, obecny jest we wszystkich izolatach *C. jejuni* i *C. coli*. Poznanie poszczególnych etapów syntezy glikanu, jego transportu oraz przyłączania do białek, umożliwi aktualnie jego zastosowanie w procesach biotechnologicznych [90, 91, 95]. Geny *C. jejuni* warunkujące procesy N-glikozylacji (*pgl*, protein glycosylation) sklonowane zostały na plazmidzie i wprowadzone do komórek *E. coli*, co nadało im zdolność glikozylowania białek zawierających odpowiednie motywy [68, 95]. Nothaft i wsp. skonstruowali prototypy szczepionek w oparciu o glikoproteiny [68]. Zastosowali oni dwie strategie. W pierwszej z nich, użyli rekombinowanej, nieaktywnej toksyny ToxC *Clostridium diphtheriae* zawierającej dziewięć powtórzeń sekwencji aminokwasowej wiążącej glikan. Do ekspresji rekombinowanej proteiny wykorzystali szczep *E. coli* kodujący białka szlaku glikozylacji *C. jejuni*. N-glikozylowana toksyna C została podana kurczętom na drodze iniekcji. Skuteczność tego prototypu szczepionki zależna była od zastosowanego schematu immunizacji. W drugiej strategii naukowcy przyłączyli heptasacharyd do zewnętrznego rdzenia lipopolisacharydu (LPS) *E. coli* K12, szczepu niezdolnego do produkcji antygeny O. Żywe bądź inaktywowane komórki *E. coli* prezentujące na powierzchni N-glikan *C. jejuni* podawano ptakom dodziobowo. Obie szczepionki indukowały produkcję przeciwciał typu IgY rozpoznających N-glikan, a co najważniejsze u immunizowanych ptaków zaobserwowano obniżenie kolonizacji jelit przez *Campylobacter* nawet o 8 rzędów wielkości. Szczepionka bazująca na żywych komórkach *E. coli* była bardziej skuteczna a jej podanie nie wpływało na zmianę składu kurzego mikrobiomu. Podanie wraz ze szczepionką szczepu probiotycznego (*Anaerosporebacter mobilis* lub *L. reuteri*) dodatkowo zwiększało jej skuteczność [69]. Należy zaznaczyć, że w wyżej wymienionych doświadczeniach wykorzystano kurczęta SPF (Specific Pathogen Free), pozbawione przeciwciał matczyńskich anty-*Campylobacter*, dlatego też powinny one zostać powtórzone z wyko-

rzystaniem brojlerów. Jako nośnika N-glikanu użyto także pęcherzyków błony zewnętrznej (OMV, Outer Membrane Vesicles). Prototyp szczepionki składający się z tzw. geOMV (glycoengineered Outer Membrane Vesicles), produkowanych w *E. coli*, podawany *per os*, także skutkował wysokim obniżeniem poziomu kolonizacji jelit kurcząt przez *Campylobacter* sp. [74].

## 6. Modulacja odpowiedzi immunologicznej

Szczepionki podjednostkowe, zarówno zawierające oczyszczone białka jak i te zawierające polisacharydy otoczkowe, dla zaindukowania wysokiego poziomu odpowiedzi odpowiedniej gałęzi układu odpornościowego wymagają stosowania odpowiednich adiuwantów. Elementem szczepionki, który nie tylko dostarcza antygen w odpowiednie miejsce, ale także może wzmocnić/ukierunkować odpowiedź immunologiczną organizmu, są nośniki. W immunoprofilaktyce kurcząt najczęściej stosowanymi immunostymulatorami są sole glinu oraz emulsje olejowe. W szczepionkach anty-*Campylobacter* przeznaczonych dla drobiu jak dotąd testowano tylko kilka adiuwantów: kompletny i niekompletny adiuwant Freund, Addavax™ (skwalen), modyfikowana toksyna LT *E. coli*, Montanide ISA 70 VG (emulsja wodno-olejowa) oraz TiterMax Gold (emulsja wodno-olejowa). Pogłębiająca się wiedza dotycząca funkcjonowania układu odpornościowego, głównie aktywności receptorów TLR (Toll-like receptors) oraz mechanizmu działania cytokin, pozwoli na wprowadzenie do praktyki adiuwantów takich jak: CpG – ODN (CpG oligodeoxynucleotides), modyfikowane toksyny, cytokiny czy nanocząstki. Różne objawy infekcji *Campylobacter* u ludzi i kurcząt sugerują konieczność zastosowania innych adiuwantów w szczepionkach przeznaczonych dla tych dwóch grup docelowych.

Receptory TLR to eukariotyczne białka rozpoznające tzw. wzorce molekularne komórek bakteryjnych (MAMP, Microbe-Associated Molecular Patterns). W większości są to białka transmembranowe, choć niektóre z nich zlokalizowane są w błonach organelli wewnątrz komórek eukariotycznych. Ligandy rozpoznawane przez receptory TLR – lipopolisacharyd, flagelina, lipoproteiny, DNA czy RNA, stanowią kryterium ich podziału. Stymulacja receptora skutkuje uruchomieniem, z wykorzystaniem białek adaptorowych, szlaków przekazywania sygnałów. Skutkiem tych procesów jest indukcja ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne a co za tym idzie indukcja ekspresji wielu elementów zarówno wrodzonej jak i nabytej odpowiedzi immunologicznej, wytwarzania wielu cytokin oraz antybakteryjnych peptydów (AMP) [48]. Stymulacja aktywności receptorów TLR przez komponenty szczepionek jest ostatnio obiektem wielu badań. Analizy genomów

ludzi i kur wykazały wiele podobieństw ale i różnic dotyczących receptorów TLR. U ludzi zidentyfikowano 10 rodzajów receptorów (hTR1-hTLR10). W genomach kur osiem z nich ma swoje homologii, brak jest TLR9, TLR8 jest nieaktywny, zaś TLR2 występuje w dwu izoformach. Dodatkowymi receptorami TLR, typowymi dla ptaków, są TLR15 oraz TLR21 [8, 27]. Kurzy receptor TLR21 rozpoznający DNA jest odpowiednikiem hTLR9. Stymulacja ptasich TLR21 za pomocą CpG – ODN (CpG – oligodeoxynucleotide) stymuluje głównie typ odpowiedzi Th-1. Choć *C. jejuni* oddziałuje z kilkoma ludzkimi receptorami TLR w podobny sposób jak z kurzymi, to chromosomowy DNA *Campylobacter* stymuluje jedynie chTLR21 a nie ludzki hTLR9. Różnice w odpowiedzi ludzkich i kurzych receptorów na kontakt z *C. jejuni* mogą być jednym z czynników odpowiedzialnych za różny przebieg infekcji [9, 70]. Flagelina *Campylobacter* będąca silnie immunogenym białkiem, często badana jako składnik prototypów podjednostkowych szczepionek, nie stymuluje receptorów TLR5. W celu modulowania odpowiedzi skonstruowano fuzyjne białko, połączenie flageliny *Campylobacter* z fragmentem flageliny *Salmonella* Enteritidis odpowiedzialnym za reakcje z receptorem TLR5. Otrzymany konstrukt przebadano na modelu kurzym. Uzyskano podwyższony poziom specyficznych IgY w surowicy, ale nie IgA w błonach śluzowych [75].

Coraz częściej stosowanymi adiuwantami w prototypach szczepionek są cytokiny o różnych aktywnościach. Ich użycie nie tylko wzmacnia ale także może ukierunkować odpowiedź immunologiczną [83]. W ostatnich latach badano mechanizm działania kilku ptasich cytokin (chIL-2, chIL-6, chIL-10 czy chIL-12) oraz ich efekt adiuwantowy w odniesieniu do kilku prototypów szczepionek, głównie przeciwko chorobom wirusowym. Ze względu na stosunkowo krótki czas przetrwania cytokin w organizmie uodparnianym są one najczęściej podawane w formie DNA (gen kodujący cytokinę sklonowany na plazmidzie pod kontrolą promotora eukariotycznego [14, 20, 89]. Przypuszczalnie cytokiny, dostarczane przy użyciu różnych nośników np. atenuowanych mikroorganizmów, bakterii kwasu mlekowego – LAB, liposomów czy nanocząstek) także znajdują zastosowanie w szczepionkach anty-*Campylobacter*.

## 7. Droga podania antygeny

Droga podania preparatu szczepionkowego to jeden z czynników determinujących poziom odpowiedzi immunologicznej i skuteczność immunizacji. Najczęściej badanymi drogami podania szczepionki jest iniekcja oraz *per os*. Na drodze iniekcji podawane są oczyszczone, natywne lub rekombinowane białka (SodB, Dps, CmeC, CjaA). Warto wspomnieć, że apli-

kowane są one często w obecności adiuwantów, czyli substancji wzmacniających odpowiedź immunologiczną tj. Montanid ISA 70VG, TiterMax Gold czy też kompletny adiuwant Freund.

Podanie antygeny *per os* umożliwia indukcję śluzówkowego układu odpornościowego przewodu pokarmowego, czyli drogi wnikania organizmu patogennego. Dodatkowo immunizacja dodziobowa jest najkorzystniejszą ekonomicznie formą aplikacji szczepionek (podana w pożywieniu lub w wodzie do picia). Co więcej, użycie szczepów kolonizujących przewód pokarmowy ptaków jako nośników białek immunogenychnych *Campylobacter* wydłuża czas ekspozycji organizmu na antygen, co zwiększa szansę wystąpienia skutecznej odpowiedzi immunologicznej.

W badaniach Nothaft i wsp. zaobserwowali zbliżony poziom protekcji u kurcząt, które otrzymały podskórnie N-glikozylowaną nieaktywną ToxC *C. diphtheria* lub dodziobowo żywe komórki *E. coli* prezentujące na powierzchni N-glikan *Campylobacter* [68]. Wyniki badań Annamalai i wsp. wskazały natomiast na wyższą skuteczność immunizacji podskórnej w zwalczaniu infekcji jelitowej *Campylobacter*. Szczepionka powstała w oparciu o białka błony zewnętrznej aplikowana na drodze iniekcji skutkowała obniżonym poziomem kolonizacji jelit ślepych przez pałeczki patogena. Natomiast u kurcząt, które ten sam prototyp szczepionki otrzymały dodziobowo nie zaobserwowano protekcji [2].

Obiecującą drogą podania antygeny jest immunizacja *in ovo*. Opracowana w latach 90. XX wieku technologia *in ovo* polega na podaniu antygenów do płynu owodniowego lub bezpośrednio do rozwijającego się zarodka. Immunizacja kurcząt *in ovo* od dawna jest szeroko stosowana przez przemysł drobiarski w zapobieganiu chorobom wirusowym [66]. Ten sposób aplikacji wykorzystano m.in. w przypadku szczepionki przeciwko chorobie Mareka, nowotworowej chorobie ptaków wywoływanej przez wirusy z rodziny *Herpesviridae*. Okazało się, że po podaniu szczepionki *in ovo* znacznie szybciej dochodzi do wytworzenia odpowiedzi immunologicznej chroniącej ptaki przed zakażeniem [72].

Proces rearanżacji genów immunoglobulin u ptaków występuje tylko raz podczas rozwoju embrionalnego i jest znany jako somatyczna konwersja genów. U kurcząt prekursorzy limfocytów B wytwarzających przeciwciała (Prebursal Stem Cells) są syntetyzowane między 8 a 14 dniem embriogenezy, a następnie zasiedlają torebkę Fabrycjusza, gdzie są poddawane różnicowaniu i klonowaniu. Dlatego podawanie szczepionki *in ovo* w czasie, gdy następuje rozwój komórek prekursorowych limfocytów ma swoje uzasadnienie. Dodatkowe zalety tej drogi immunizacji to zmniejszenie stresu w porównaniu z tradycyjnym szczepieniem oraz możliwość automatyzacji procesu szczepienia [94]. Szczepienie

*in ovo* może być dodatkowo połączone z dawką przypominającą podaną dopiero po wykluciu kurcząt

W badaniach Radomska i wsp. [75] u kurcząt, którym *in ovo* podano białko NHC (białko fuzyjne zawierające flagelinę *C. jejuni* i domenę flageliny *S. Typhimurium* aktywującą TLR) nie zaobserwowano efektu ochronnego. Odmienne wyniki otrzymała grupa badawcza Jagusztyn-Krynickiej. Prototypy szczepionek powstałe w oparciu o liposomy zawierające immunogenne białko lub pęcherzyki błony zewnętrznej podane *in ovo* znacząco obniżyły poziom kolonizacji jelit ślepych przez pałeczki *Campylobacter* [28, 47].

## 8. Podsumowanie

Wyniki otrzymane przez wiele grup badawczych pracujących nad konstrukcją szczepionek są trudne bądź nawet niemożliwe do porównania w związku z wieloma zmiennymi tj. wybrany antygen, schemat i droga immunizacji, zastosowanie adiuwantu czy szczep *C. jejuni* oraz jego dawka użyta w eksperymencie protekcyjnym. Dodatkowo postęp w technikach sekwencjonowania kurzych genomów zwrócił uwagę na istotne różnice genetyczne ras drobiu, które mogą mieć wpływ na funkcjonowanie ich układu odpornościowego oraz mechanizmy warunkujące kolonizację przewodu pokarmowego przez pałeczki *Campylobacter*.

Również różnorodność genetyczna szczepów *Campylobacter* hamuje rozwój skutecznej szczepionki. Wymagania skutecznej immunizacji mogą spełnić jedynie schematy szczepień uwzględniające tę różnorodność i złożoność antygenową. Można to osiągnąć albo poprzez wieloantygenowy skład szczepionki, albo przez zastosowanie różnych antygenów w kolejnych immunizacjach. Jednocześnie konieczne są strategie mające na celu wzmocnienie/modulację odpowiedzi immunologicznej kurcząt.

Nie ma wątpliwości, że antygen, obecność adiuwantu jak i wybór nośnika i droga immunizacji muszą być brane pod uwagę w procesie konstruowania skutecznej szczepionki. Trudno jednak przewidzieć, która z zastosowanych strategii przyniesie najlepsze rezultaty.

## Podziękowania

Artykuł został sfinansowany ze środków grantu NCN 2016/21/B/NZ6/01141 oraz NCN 2014/15/N/NZ2/00380.

## Piśmiennictwo

1. Ajene A.N., Fischer Walker C.L., Black R.E.: Enteric pathogens and reactive arthritis: a systematic review of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Shigella*-associated reactive arthritis. *J. Health Popul. Nutr.* **31**, 299–307 (2013)

2. Annamalai T., Pina-Mimbela R., Kumar A., Binjawadagi B., Liu Z., Renukaradhya G.J., Rajashekara G.: Evaluation of nanoparticle-encapsulated outer membrane proteins for the control of *Campylobacter jejuni* colonization in chickens. *Poult. Sci.* **92**, 2201–2211 (2013)
3. Audouy S.A., van Selm S., van Roosmalen M.L., Post E., Kanninga R., Neef J., Esteveo S., Nieuwenhuis E.E., Adrian P.V., Leenhouts K. i wsp.: Development of lactococcal GEM-based pneumococcal vaccines. *Vaccine*, **25**, 2497–2506 (2007)
4. Awad W.A., Dublec F., Hess C., Dublec K., Khayal B., Aschenbach J.R., Hess M.: *Campylobacter jejuni* colonization promotes the translocation of *Escherichia coli* to extra-intestinal organs and disturbs the short-chain fatty acids profiles in the chicken gut. *Poult. Sci.* **95**, 2259–2265 (2016)
5. Awad W.A., Molnar A., Aschenbach J.R., Ghareeb K., Khayal B., Hess C., Liebhart D., Dublec K., Hess M.: *Campylobacter* infection in chickens modulates the intestinal epithelial barrier function. *Innate Immun.* **21**, 151–160 (2015)
6. Blaser M.J.: Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *J. Infect. Dis.* **176 Suppl 2**, S103–105 (1997)
7. Bosma T., Kanninga R., Neef J., Audouy S.A., van Roosmalen M.L., Steen A., Buist G., Kok J., Kuipers O.P., Robillard G. i wsp.: Novel surface display system for proteins on non-genetically modified gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 880–889 (2006)
8. Brownlie R., Allan B.: Avian toll-like receptors. *Cell Tissue Res.* **343**, 121–130 (2011)
9. Brownlie R., Zhu J., Allan B., Mutwiri G.K., Babiuk L.A., Potter A., Griebel P.: Chicken TLR21 acts as a functional homologue to mammalian TLR9 in the recognition of CpG oligodeoxynucleotides. *Mol. Immunol.* **46**, 3163–3170 (2009)
10. Buckley A.M., Wang J., Hudson D.L., Grant A.J., Jones M.A., Maskell D.J., Stevens M.P.: Evaluation of live-attenuated *Salmonella* vaccines expressing *Campylobacter* antigens for control of *C. jejuni* in poultry. *Vaccine*, **28**, 1094–1105 (2010)
11. Byrne C.M., Clyne M., Bourke B.: *Campylobacter jejuni* adhere to and invade chicken intestinal epithelial cells *in vitro*. *Microbiology*, **153**, 561–569 (2007)
12. Cawthraw S.A., Newell D.G.: Investigation of the presence and protective effects of maternal antibodies against *Campylobacter jejuni* in chickens. *Avian Dis.* **54**, 86–93 (2010)
13. Cean A., Stef L., Simiz E., Julean C., Dumitrescu G., Vasile A., Pet E., Drinceanu D., Corcionivoschi N.: Effect of human isolated probiotic bacteria on preventing *Campylobacter jejuni* colonization of poultry. *Foodborne Pathog. Dis.* **12**, 122–130 (2015)
14. Chen H.Y., Shang Y.H., Yao H.X., Cui B.A., Zhang H.Y., Wang Z.X., Wang Y.D., Chao A.J., Duan T.Y.: Immune responses of chickens inoculated with a recombinant fowlpox vaccine coexpressing HA of H9N2 avian influenza virus and chicken IL-18. *Antiviral Res.* **91**, 50–56 (2011)
15. Chiou C.J., Tseng L.P., Deng M.C., Jiang P.R., Tasi S.L., Chung T.W., Huang Y.Y., Liu D.Z.: Mucoadhesive liposomes for intranasal immunization with an avian influenza virus vaccine in chickens. *Biomaterials*, **30**, 5862–5868 (2009)
16. Clark J.D., Oakes R.D., Redhead K., Crouch C.F., Francis M.J., Tomley F.M., Blake D.P.: *Eimeria* species parasites as novel vaccine delivery vectors: anti-*Campylobacter jejuni* protective immunity induced by *Eimeria tenella*-delivered CjaA. *Vaccine*, **30**, 2683–2688 (2012)
17. Conlan A.J., Coward C., Grant A.J., Maskell D.J., Gog J.R.: *Campylobacter jejuni* colonization and transmission in broiler chickens: a modelling perspective. *J. R. Soc. Interface*, **4**, 819–829 (2007)
18. Connell S., Meade K.G., Allan B., Lloyd A.T., Kenny E., Cormican P., Morris D.W., Bradley D.G., O'Farrelly C.: Avian resistance



- to *Campylobacter jejuni* colonization is associated with an intestinal immunogene expression signature identified by mRNA sequencing. *PLoS One*, **7**, e40409 (2012)
19. Dasti J.I., Tareen A.M., Lugert R., Zautner A.E., Gross U.: *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 205–211 (2010)
  20. Degen W.G., van Zuilekom H.I., Scholtes N.C., van Daal N., Schijns V.E.: Potentiation of humoral immune responses to vaccine antigens by recombinant chicken IL-18 (rChIL-18). *Vaccine*, **23**, 4212–4218 (2005)
  21. EFSA: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J.* **14**, 4634 (2016)
  22. EFSA: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA J.* **16**, 262 (2018)
  23. EFSA, ECDC: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA J.* **2017**, **15**, 228 (2017)
  24. El-Shibiny A., Scott A., Timms A., Metawea Y., Connerton P., Connerton I.: Application of a group II *Campylobacter* bacteriophage to reduce strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* colonizing broiler chickens. *J. Food Prot.* **72**, 733–740 (2009)
  25. Esson D., Mather A.E., Scanlan E., Gupta S., de Vries S.P., Bailey D., Harris S.R., McKinley T.J., Meric G., Berry S.K. i wsp.: Genomic variations leading to alterations in cell morphology of *Campylobacter* spp. *Sci. Rep.* **6**, 38303 (2016)
  26. Fanelli A., Agazzi A., Alborali G.L., Pilotto A., Bontempo V., Dell'Orto V., Demey V., Caputo J.M., Savoini G.: Prevalence reduction of pathogens in poultry fed with *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology, Agronomy, Soc. Environ.* **19**, 3–10 (2015)
  27. Gillespie M., Shamovsky V., D'Eustachio P.: Human and chicken TLR pathways: manual curation and computer-based orthology analysis. *Mamm. Genome*, **22**, 130–138 (2011)
  28. Godlewska R., Kuczkowski M., Wyszynska A., Klim J., Derlatka K., Wozniak-Biel A., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Evaluation of a protective effect of *in ovo* delivered *Campylobacter jejuni* OMVs. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 8855–8864 (2016)
  29. Goodfellow J.A., Willison H.J.: Guillain-Barre syndrome: a century of progress. *Nat. Rev. Neurol.* **12**, 723–731 (2016)
  30. Guerry P., Poly F., Riddle M., Maue A.C., Chen Y.H., Monteiro M.A.: *Campylobacter* polysaccharide capsules: virulence and vaccines. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2**, 7 (2012)
  31. Han Z., Pielsticker C., Gerzova L., Rychlik I., Rautenschlein S.: The influence of age on *Campylobacter jejuni* infection in chicken. *Dev. Comp. Immunol.* **62**, 58–71 (2016)
  32. Havelaar A.H., Ivarsson S., Lofdahl M., Nauta M.J.: Estimating the true incidence of campylobacteriosis and salmonellosis in the European Union, 2009. *Epidemiol. Infect.* **141**, 293–302 (2013)
  33. Havelaar A.H., Mangen M.J., de Koeijer A.A., Bogaardt M.J., Evers E.G., Jacobs-Reitsma W.F., van Pelt W., Wagenaar J.A., de Wit G.A., van der Zee H. i wsp.: Effectiveness and efficiency of controlling *Campylobacter* on broiler chicken meat. *Risk Anal.* **27**, 831–844 (2007)
  34. Hegazy W.A., Hensel M.: *Salmonella enterica* as a vaccine carrier. *Future Microbiol.* **7**, 111–127 (2012)
  35. Hermans D., Pasmans F., Heyndrickx M., Van Immerseel F., Martel A., Van Deun K., Haesebrouck F.: A tolerogenic mucosal immune response leads to persistent *Campylobacter jejuni* colonization in the chicken gut. *Crit. Rev. Microbiol.* **38**, 17–29 (2012)
  36. Hermans D., Van Steendam K., Verbrugge E., Verlinden M., Martel A., Seliwiorstow T., Heyndrickx M., Haesebrouck F., De Zutter L., Deforce D. i wsp.: Passive immunization to reduce *Campylobacter jejuni* colonization and transmission in broiler chickens. *Vet. Res.* **45**, 27 (2014)
  37. Hickey T.E., Majam G., Guerry P.: Intracellular survival of *Campylobacter jejuni* in human monocytic cells and induction of apoptotic death by cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.* **73**, 5194–5197 (2005)
  38. Hu Y., Huang J., Jiao X.A.: Screening of genes expressed *in vivo* during interaction between chicken and *Campylobacter jejuni*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 217–224 (2014)
  39. Hu Y., Huang J., Li Q., Shang Y., Ren F., Jiao Y., Liu Z., Pan Z., Jiao X.A.: Use of *in vivo*-induced antigen technology to identify *in vivo*-expressed genes of *Campylobacter jejuni* during human infection. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 363–370 (2014)
  40. Humphrey S., Chaloner G., Kemmett K., Davidson N., Williams N., Kipar A., Humphrey T., Wigley P.: *Campylobacter jejuni* is not merely a commensal in commercial broiler chickens and affects bird welfare. *MBio.* **5**, e01364-01314 (2014)
  41. Ijaz U.Z., Sivaloganathan L., Mckenna A., Richmond A., Kelly C., Linton M., Stratakos A., Lavery U., Elmi A., Wren B. i wsp.: Comprehensive longitudinal microbiome analysis of the chicken cecum reveals a shift from competitive to environmental drivers and a window of opportunity for *Campylobacter*. *Front Microbiol.* **15**, 2452 (2018)
  42. Jain R., Singh S., Verma S.K., Jain A.: Genome-wide prediction of potential vaccine candidates for *Campylobacter jejuni* using reverse vaccinology. *Interdiscip. Sci.* **11**, 337–347 (2019)
  43. Johnson J.G., Yuhas C., McQuade T.J., Larsen M.J., DiRita V.J.: Narrow-spectrum inhibitors of *Campylobacter jejuni* flagellar expression and growth. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 3880–3886 (2015)
  44. Kaakoush N.O., Castano-Rodriguez N., Mitchell H.M., Man S.M.: Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **28**, 687–720 (2015)
  45. Kirkpatrick B.D., Tribble D.R.: Update on human *Campylobacter jejuni* infections. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **27**, 1–7 (2011)
  46. Kobierecka P.A., Olech B., Ksiazek M., Derlatka K., Adamska I., Majewski P.M., Jagusztyn-Krynicka E.K., Wyszynska A.K.: Cell Wall Anchoring of the *Campylobacter* antigens to *Lactococcus lactis*. *Front. Microbiol.* **7**, 165 (2016)
  47. Kobierecka P.A., Wyszynska A.K., Aleksandrak-Piekarczyk T., Kuczkowski M., Tuzimek A., Piotrowska W., Gorecki A., Adamska I., Wieliczko A., Bardowski J. i wsp.: *In vitro* characteristics of *Lactobacillus* spp. strains isolated from the chicken digestive tract and their role in the inhibition of *Campylobacter* colonization. *MicrobiologyOpen*, **6**, (2017)
  48. Kopp E., Medzhitov R.: Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 396–401 (2003)
  49. Korsak D., Mackiw E., Rozynek E., Zylowska M.: Prevalence of *Campylobacter* spp. in retail chicken, turkey, pork, and beef meat in Poland between 2009 and 2013. *J. Food. Prot.* **78**, 1024–1028 (2015)
  50. Kumar A., Drozd M., Pina-Mimbela R., Xu X., Helmy Y.A., Antwi J., Fuchs J.R., Nislow C., Templeton J., Blackall P.J. i wsp.: Novel anti-*Campylobacter* compounds identified using high throughput screening of a pre-selected enriched small molecules library. *Front. Microbiol.* **7**, 405 (2016)
  51. Lacharme-Lora L., Chaloner G., Gilroy R., Humphrey S., Gibbs K., Jopson S., Wright E., Reid W., Ketley J., Humphrey T. i wsp.: B lymphocytes play a limited role in clearance of *Campylobacter jejuni* from the chicken intestinal tract. *Sci. Rep.* **7**, 45090 (2017)
  52. Laniewski P., Kuczkowski M., Chrzastek K., Wozniak A., Wyszynska A., Wieliczko A., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Evaluation of the immunogenicity of *Campylobacter jejuni* CjaA

- protein delivered by *Salmonella enterica* sv. Typhimurium strain with regulated delayed attenuation in chickens. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 281–292 (2014)
53. Layton S.L., Morgan M.J., Cole K., Kwon Y.M., Donoghue D.J., Hargis B.M., Pumford N.R.: Evaluation of *Salmonella*-vectored *Campylobacter* peptide epitopes for reduction of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. *Clin. Vaccine Immunol.* **18**, 449–454 (2011)
  54. Lee M.D., Newell D.G.: *Campylobacter* in poultry: filling an ecological niche. *Avian Dis.* **50**, 1–9 (2006)
  55. Li W., Watarai S., Iwasaki T., Kodama H.: Suppression of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis excretion by intraocular vaccination with fimbriae proteins incorporated in liposomes. *Dev. Comp. Immunol.* **28**, 29–38 (2004)
  56. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: LPSN. <https://www.bacterio.net/campylobacter.html> (30.09.2019)
  57. Łaniewski P.L., M. Wszyńska, A. Majewski, P. Godlewska, R. Jagusztyn-Krynicka, E.K.: Assessment of chicken protection against *Campylobacter jejuni* infection by immunization with avirulent *Salmonella enterica* sv. Typhimurium strain producing *Campylobacter* CjaD/Pal protein. *Vaccine: Develop. Therapy*, **2**, 43–50 (2012)
  58. Marder Mph E., Griffin P., Cieslak P., Dunn J., Hurd S., Jervis R.: Preliminary incidence and trends of infections with pathogens transmitted commonly through food – Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006–2017. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **67**, 324–328 (2018)
  59. Mehla K., Ramana J.: Surface proteome mining for identification of potential vaccine candidates against *Campylobacter jejuni*: an *in silico* approach. *Funct. Integr. Genomics*, **17**, 27–37 (2017)
  60. Meric G., Yahara K., Mageiros L., Pascoe B., Maiden M.C., Jolley K.A., Sheppard S.K.: A reference pan-genome approach to comparative bacterial genomics: identification of novel epidemiological markers in pathogenic *Campylobacter*. *PLoS One*, **9**, e92798 (2014)
  61. Meunier M., Guyard-Nicodeme M., Dory D., Chemaly M.: Control strategies against *Campylobacter* at the poultry production level: biosecurity measures, feed additives and vaccination. *J. Appl. Microbiol.* **120**, 1139–1173 (2016)
  62. Meunier M., Guyard-Nicodeme M., Hirchaud E., Parra A., Chemaly M., Dory D.: Identification of novel vaccine candidates against *Campylobacter* through reverse vaccinology. *J. Immunol. Res.* **2016**, 5715790 (2016)
  63. Meunier M., Guyard-Nicodeme M., Vigouroux E., Poezevara T., Beven V., Quesne S., Bigault L., Amelot M., Dory D., Chemaly M.: Promising new vaccine candidates against *Campylobacter* in broilers. *PLoS One*, **12**, e0188472 (2017)
  64. Murray C.J., Vos T., Lozano R., Naghavi M., Flaxman A.D., Michaud C., Ezzati M., Shibuya K., Salomon J.A., Abdalla S. i wsp.: Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, **380**, 2197–2223 (2012)
  65. Neal-McKinney J.M., Lu X., Duong T., Larson C.L., Call D.R., Shah D.H., Konkel M.E.: Production of organic acids by probiotic lactobacilli can be used to reduce pathogen load in poultry. *PLoS One*, **7**, e43928 (2012)
  66. Negash T., al-Garib S.O., Gruys E.: Comparison of *in ovo* and post-hatch vaccination with particular reference to infectious bursal disease. A review. *Vet. Q.* **26**, 76–87 (2004)
  67. Newell D.G., Elvers K.T., Dopfer D., Hansson I., Jones P., James S., Gittins J., Stern N.J., Davies R., Connerton I. i wsp.: Biosecurity-based interventions and strategies to reduce *Campylobacter* spp. on poultry farms. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 8605–8614 (2011)
  68. Nothhaft H., Davis B., Lock Y.Y., Perez-Munoz M.E., Vinogradov E., Walter J., Coros C., Szymanski C.M.: Engineering the *Campylobacter jejuni* N-glycan to create an effective chicken vaccine. *Sci. Rep.* **6**, 26511 (2016)
  69. Nothhaft H., Perez-Munoz M.E., Gouveia G.J., Duar R.M., Wanford J.J., Lango-Scholey L., Panagos C.G., Srithayakumar V., Plastow G.S., Coros C. i wsp.: Coadministration of the *Campylobacter jejuni* N-Glycan-Based vaccine with probiotics improves vaccine performance in broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**, (2017)
  70. Patel B.A., Gomis S., Dar A., Willson P.J., Babiuk L.A., Potter A., Mutwiri G., Tikoo S.K.: Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs (CpG-ODN) predominantly induce Th1-type immune response in neonatal chicks. *Dev. Comp. Immunol.* **32**, 1041–1049 (2008)
  71. Paul N.C., Al-Adwani S., Crespo R., Shah D.H.: Evaluation of passive immunotherapeutic efficacy of hyperimmunized egg yolk powder against intestinal colonization of *Campylobacter jejuni* in chickens. *Poult. Sci.* **93**, 2779–2787 (2014)
  72. Peebles E.D.: *In ovo* applications in poultry: A review. *Poult. Sci.* **97**, 2322–2338 (2018)
  73. Platts-Mills J.A., Kosek M.: Update on the burden of *Campylobacter* in developing countries. *Curr Opin. Infect. Dis.* **27**, 444–450 (2014)
  74. Price N.L., Goyette-Desjardins G., Nothhaft H., Valguarnera E., Szymanski C.M., Segura M., Feldman M.F.: Glycoengineered Outer Membrane Vesicles: a novel platform for bacterial vaccines. *Sci. Rep.* **6**, 24931 (2016)
  75. Radomska K.A., Vaezirad M.M., Verstappen K.M., Wosten M.M., Wagenaar J.A., van Putten J.P.: Chicken immune response after *in ovo* immunization with chimeric TLR5 activating flagellin of *Campylobacter jejuni*. *PLoS One*, **11**, e0164837 (2016)
  76. Robyn J., Rasschaert G., Pasmans F., Heyndrickx M.: Thermotolerant *Campylobacter* during broiler rearing: risk factors and intervention. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **14**, 81–105 (2015)
  77. Rollins S.M., Peppercorn A., Hang L., Hillman J.D., Calderwood S.B., Handfield M., Ryan E.T.: *In vivo* induced antigen technology (IVIAT). *Cell Microbiol.*, **7**, 1–9 (2005)
  78. Romero E.L., Morilla M.J.: Topical and mucosal liposomes for vaccine delivery. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **3**, 356–375 (2011)
  79. Rosenquist H., Nielsen N.L., Sommer H.M., Norrung B., Christensen B.B.: Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *Int. J. Food Microbiol.* **83**, 87–103 (2003)
  80. Sadkowska-Todys M., Kucharczyk B.: Campylobacteriosis in Poland in 2013 and 2014. *Przegl. Epidemiol.* **70**, 209–215 (2016)
  81. Sahin O., Luo N., Huang S., Zhang Q.: Effect of *Campylobacter*-specific maternal antibodies on *Campylobacter jejuni* colonization in young chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5372–5379 (2003)
  82. Saint-Cyr M.J., Guyard-Nicodeme M., Messaoudi S., Chemaly M., Cappellet J.M., Dousset X., Haddad N.: Recent advances in screening of anti-*Campylobacter* activity in probiotics for use in poultry. *Front. Microbiol.* **7**, 553 (2016)
  83. Schmidt C.S., Morrow W.J., Sheikh N.A.: Smart adjuvants. *Expert Rev Vaccines*, **6**, 391–400 (2007)
  84. Schwendener R.A.: Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. *Ther. Adv. Vaccines*, **2**, 159–182 (2014)
  85. Silva J., Leite D., Fernandes M., Mena C., Gibbs P.A., Teixeira P.: *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Front. Microbiol.* **2**, 200 (2011)
  86. Skanseng B., Trosvik P., Zimonja M., Johnsen G., Bjerrum L., Pedersen K., Wallin N., Rudi K.: Co-infection dynamics of

- a major food-borne zoonotic pathogen in chicken. *PLoS Pathog.* **3**, e175 (2007)
87. Skarp C.P.A., Hanninen M.L., Rautelin H.I.K.: Campylobacteriosis: the role of poultry meat. *Clin Microbiol. Infect.* **22**, 103–109 (2016)
  88. Stavropoulos P.G., Soura E., Kanelleas A., Katsambas A., Antoniou C.: Reactive arthritis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **29**, 415–424 (2015)
  89. Su B.S., Chiu H.H., Lin C.C., Shien J.H., Yin H.S., Lee L.H.: Adjuvant activity of chicken interleukin-12 co-administered with infectious bursal disease virus recombinant VP2 antigen in chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **139**, 167–175 (2011)
  90. Szymanski C.M., Logan S.M., Linton D., Wren B.W.: *Campylobacter* – a tale of two protein glycosylation systems. *Trends Microbiol.* **11**, 233–238 (2003)
  91. Terra V.S., Mills D.C., Yates L.E., Abouelhadid S., Cuccui J., Wren B.W.: Recent developments in bacterial protein glycan coupling technology and glycoconjugate vaccine design. *J. Med. Microbiol.* **61**, 919–926 (2012)
  92. Theoret J.R., Cooper K.K., Zekarias B., Roland K.L., Law B.F., Curtiss R., 3rd, Joens L.A.: The *Campylobacter jejuni* Dps homologue is important for *in vitro* biofilm formation and cecal colonization of poultry and may serve as a protective antigen for vaccination. *Clin. Vaccine Immunol.* **19**, 1426–1431 (2012)
  93. Thibodeau A., Fravallo P., Yergeau E., Arsenault J., Lahaye L., Letellier A.: Chicken caecal microbiome modifications induced by *Campylobacter jejuni* colonization and by a non-antibiotic feed additive. *PLoS One*, **10**, e0131978 (2015)
  94. Toro H., Tang D.C., Suarez D.L., Sylte M.J., Pfeiffer J., Van Kampen K.R.: Protective avian influenza *in ovo* vaccination with non-replicating human adenovirus vector. *Vaccine*, **25**, 2886–2891 (2007)
  95. Wacker M., Linton D., Hitchen P.G., Nita-Lazar M., Haslam S.M., North S.J., Panico M., Morris H.R., Dell A., Wren B.W. i wsp.: N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science*, **298**, 1790–1793 (2002)
  96. Watarai S., Iwase T., Tajima T., Yuba E., Kono K.: Efficiency of pH-sensitive fusogenic polymer-modified liposomes as a vaccine carrier. *Sci. World J.* **2013**, 903234 (2013)
  97. Watson D.S., Endsley A.N., Huang L.: Design considerations for liposomal vaccines: influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. *Vaccine*, **30**, 2256–2272 (2012)
  98. Watson R.O., Galan J.E.: *Campylobacter jejuni* survives within epithelial cells by avoiding delivery to lysosomes. *PLoS Pathog.* **4**, e14 (2008)
  99. Williams L.K., Sait L.C., Trantham E.K., Cogan T.A., Humphrey T.J.: *Campylobacter* infection has different outcomes in fast – and slow-growing broiler chickens. *Avian Dis.* **57**, 238–241 (2013)
  100. Wilson D.L., Rathinam V.A., Qi W., Wick L.M., Landgraf J., Bell J.A., Plovanich-Jones A., Parrish J., Finley R.L., Mansfield L.S. i wsp.: Genetic diversity in *Campylobacter jejuni* is associated with differential colonization of broiler chickens and C57BL/6J IL10-deficient mice. *Microbiology*, **156**, 2046–2057 (2010)
  101. World Health Organisation: Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/> (30.09.2019)
  102. Wyszynska A., Kobierecka P., Bardowski J., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Lactic acid bacteria – 20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 2967–2977 (2015)
  103. Wyszynska A., Raczko A., Lis M., Jagusztyn-Krynicka E.K.: Oral immunization of chickens with avirulent *Salmonella* vaccine strain carrying *C. jejuni* 72Dz/92 *cjaA* gene elicits specific humoral immune response associated with protection against challenge with wild-type *Campylobacter*. *Vaccine*, **22**, 1379–1389 (2004)
  104. Wyszynska A., Zycka J., Godlewska R., Jagusztyn-Krynicka E.K.: The *Campylobacter jejuni/coli cjaA (cj0982c)* gene encodes an N-glycosylated lipoprotein localized in the inner membrane. *Curr. Microbiol.* **57**, 181–188 (2008)
  105. Yaguchi K., Ohgitani T., Noro T., Kaneshige T., Shimizu Y.: Vaccination of chickens with liposomal inactivated avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) vaccine by eye drop or coarse spray administration. *Avian Dis.* **53**, 245–249 (2009)
  106. Zeng X., Xu F., Lin J.: Development and Evaluation of CmeC Subunit Vaccine against *Campylobacter jejuni*. *J. Vaccines Vaccin.* **1**, (2010)