



Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii

Uniwersytetu Gdańskiego
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr Paulina Czoska

Zakażenia bakteriami *Campylobacter jejuni* – badania oddziaływań bakterii, przeciwciał i układu odpornościowego.

Campylobacter jejuni Infections – Investigations into
Bacterial, Antibody, and Immune System Interactions

Praca przedstawiona
Radzie Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego
celem uzyskania stopnia doktora
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych
w dyscyplinie naukowej biotechnologia

Promotor: dr hab. Mariusz Grinholc, prof. UG
Zakład Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej
Promotor pomocniczy: dr Magda Rybicka-Misiejko
Zakład Fotobiologii i Diagnostyki Molekularnej

GDAŃSK 2025



Rozprawa doktorska została przygotowana w Zakładzie Badawczo-Wdrożeniowym Ośrodka Salmonella IMMUNOLAB sp. z o. o. pod opieką ŚP prof. dr hab. Renaty Głośnickiej oraz mgr Aleksandry Kościuk w ramach programu Doktorat Wdrożeniowy, współfinansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (nr projektu DWD/4/54/2020).

Spis treści

WYKAZ SKRÓTÓW	2
1 STRESZCZENIE I ABSTRACT	4
1.1 STRESZCZENIE	4
1.2 ABSTRACT	5
2 WSTĘP	6
2.1 <i>CAMPYLOBACTER JEJUNI</i> – CHARAKTERYSTYKA	6
2.2 KAMPYLOBAKTERIOZY	10
2.3 STRATEGIE ZWALCZANIA <i>C. JEJUNI</i> I OBNIŻANIA LICZBY ZACHOROWAŃ	13
2.4 KURZE PRZECIWCIAŁA IGY	14
2.5 PRZECIWCIAŁA IGY JAKO ELEMENT STRATEGII OGRANICZANIA KAMPYLOBAKTERIOZ – ZAŁOŻENIA PRACY	16
3 CELE PRACY	18
4 MATERIAŁY	19
4.1 SZCZEPY BAKTERYJNE	19
4.2 PODŁOŻA HODOWLANE	19
4.3 ROZTWORY I BUFORY	20
4.4 GOTOWE ZESTAWY ODCZYNNIKÓW	21
4.5 ADJUWANTY DO IMMUNIZACJI	21
4.6 ODCZYNNIKI I MATERIAŁY DO IZOLACJI PRZECIWCIAŁ IGY Z ŻÓŁTEK JAJ KURZYCH	21
4.7 ODCZYNNIKI DO SDS-PAGE	21
4.8 ODCZYNNIKI DO TESTÓW ELISA	22
4.9 URZĄDZENIA	23
5 METODY	24
5.1 METODY PRAC ZE SZCZEPAMI <i>C. JEJUNI</i>	24
5.2 METODY ZWIĄZANE Z IZOLACJĄ PRZECIWCIAŁ IGY Z ŻÓŁTEK JAJ	28
5.3 METODY ANALIZY IZOLOWANYCH PRZECIWCIAŁ	30
5.4 BADANIA <i>IN VITRO</i>	31
5.5 BADANIA <i>IN VIVO</i>	32
5.6 ANALIZY STATYSTYCZNE	35
6 WYNIKI	37
6.1 ANALIZA PORÓWNAWCZA SZCZEPÓW TERENOWYCH ORAZ WZORCOWYCH SZCZEPÓW <i>C. JEJUNI</i>	37
6.2 OKREŚLENIE WSPÓŁCZYNNIKA KONWERSJI McF–CFU DLA <i>C. JEJUNI</i> (KALIBRACJA WZGLĘDEM SKALI MCFARLANDA W KONTEKŚCIE PRZYGOTOWANIA INOKULUM DO BADAŃ <i>IN VITRO</i> I <i>IN VIVO</i>)	39
6.3 OCZYSZCZANIE IGY METODĄ WODNĄ Z PRECYPITACJĄ NaCl NAJBARDZIEJ EKONOMICZNĄ Z PORÓWNYWANYCH METOD	41
6.4 HAMOWANIE WZROSTU BAKTERII <i>C. JEJUNI</i> PRZEZ PRZECIWCIAŁA IGY	46
6.5 BADANIE <i>IN VIVO</i> WPŁYWU INAKTYWOWANYCH BAKTERII <i>C. JEJUNI</i> NA UKŁAD ODPORNOŚCIOWY KUR	48
7 DYSKUSJA	52
7.1 ZNACZENIE RÓŻNIC GENOTYPOWYCH SZCZEPÓW <i>C. JEJUNI</i> DLA POTENCJAŁU WIRULENCJI	53
7.2 OPTIMALIZACJA METODY IZOLACJI IGY POD KĄTEM SKUTECZNOŚCI I WDROŻENIA	53
7.3 SKUTECZNOŚĆ PRZECIWCIAŁ IGY WOBEC <i>C. JEJUNI</i> W WARUNKACH <i>IN VITRO</i>	54
7.4 WNIOSKI Z BADAŃ <i>IN VIVO</i> : ODPOWIEDŹ IMMUNOLOGICZNA I OGRANICZENIA MODELU	54
7.5 PODSUMOWANIE DYSKUSJI	55
8 WNIOSKI	56

9	ODWOŁANIA	57
10	SPIS RYCIN	64
11	SPIS TABEL	64

Wykaz skrótów

Skrót	Rozwinięcie
ATCC	Amerykańska Kolekcja Kultur Typowych (ang. <i>American Type Culture Collection</i>)
BHI	Bulion z wyciągiem mózgowo-sercowym (ang. <i>Brain Heart Infusion Broth</i>)
BSA	Albumina surowicy bydlęcej (ang. <i>Bovine Serum Albumin</i>)
BSL-2	Poziom bezpieczeństwa biologicznego 2 (ang. <i>Biosafety Level 2</i>)
CCDA	Agar z węglem aktywnym, cefoperazonem i deoksycholanem (ang. <i>Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar</i>)
CCV	Wakuola zawierająca <i>Campylobacter</i> (ang. <i>Campylobacter-containing vacuole</i>)
CDT	Toksyna cytolityczno-rozprężająca (ang. <i>Cytolethal Distending Toxin</i>)
CFU	Jednostka tworząca kolonię (ang. <i>Colony Forming Unit</i>)
CJ	<i>Campylobacter jejuni</i>
DNA	Kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DO	Rozpuszczony tlen (ang. <i>Dissolved Oxygen</i>)
EFSA	Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (ang. <i>European Food Safety Authority</i>)
ELISA	Test immunoenzymatyczny ELISA (ang. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EPS	Egzopolisacharyd
FCA	Kompletny adiuwant Freund'a (ang. <i>Freund's Complete Adjuvant</i>)
FIA	Niekompletny adiuwant Freund'a (ang. <i>Freund's Incomplete Adjuvant</i>)
GBS	Zespół Guillaina-Barrégo (ang. <i>Guillain-Barré syndrome</i>)
IL	Interleukina (ang. <i>Interleukin</i>)
IM	Domięśniowo (ang. <i>Intramuscular</i>)
ISO	Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna (ang. <i>International Organization for Standardization</i>)
IgA	Immunoglobulina A (ang. <i>Immunoglobulin A</i>)
	Immunoglobulina G (ang. <i>Immunoglobulin G</i>)
IgG	

IgY	Immunoglobulina Y (ang. <i>Immunoglobulin Y</i>)
KN	Kontrola negatywna
KP	Kontrola pozytywna
LOS	Lipooligosacharyd (ang. <i>Lipooligosaccharide</i>)
MH	Bulion Mueller-Hinton
MWCO	Punkt odcięcia masy cząsteczkowej (ang. <i>Molecular weight cut-off</i>)
McF	Jednostka MacFarlanda (ang. <i>MacFarland unit</i>)
OMP	Białko błonowe (ang. <i>Outer membrane protein</i>)
OPD	Dichlorowodorek o-fenylendiaminy
PBS	Bufor fosforanowy (ang. <i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PCR	Łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	Glikol polietylenowy (ang. <i>Polyethylene Glycol</i>)
PES	Polietersulfon
SD	Odchylenie standardowe (ang. <i>Standard deviation</i>)
SDS-PAGE	Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym z SDS (ang. <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
STEC	<i>Escherichia coli</i> produkująca toksynę Shiga (ang. <i>Shiga-toxin producing Escherichia coli</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametyloetylenodiamina
UE	Unia Europejska
UV	Promieniowanie ultrafioletowe
VBNC	Żywe, lecz nie dające się hodować (ang. <i>Viable But Not Culturable</i>)
WSF	Frakcja rozpuszczalna w wodzie (ang. <i>Water-Soluble Fraction</i>)

1 Streszczenie i Abstract

1.1 Streszczenie

Kampylobakterioza jest jedną z najczęściej diagnozowanych odzwierzęcych chorób bakteryjnych na świecie, stanowiąc istotny problem zarówno w zdrowiu publicznym, jak i w produkcji zwierzęcej. Bakterie *Campylobacter jejuni* są głównym czynnikiem etiologicznym choroby, a drób, w szczególności kurczęta brojlerów, stanowi ich najważniejszy rezerwuuar i źródło zakażeń u ludzi. Wobec ograniczeń w stosowaniu antybiotyków oraz braku skutecznych szczepionek dla drobiu, poszukiwane są alternatywne strategie ograniczania kolonizacji ptaków, w tym wykorzystanie przeciwciał IgY pozyskiwanych z żółtek jaj kur immunizowanych.

Celem niniejszej pracy było zbadanie oddziaływań pomiędzy *C. jejuni*, przeciwciałami IgY oraz elementami odpowiedzi immunologicznej, a także ocena skuteczności preparatów zawierających inaktywowane antygeny oraz IgY w ograniczaniu kolonizacji ptaków przez ten patogen. W badaniach wykorzystano izolaty terenowe *C. jejuni*, które scharakteryzowano fenotypowo (testy biochemiczne) oraz genotypowo (analiza obecności genów wirulencji). Na podstawie wyników potwierdzono zgodność cech badanych izolatów z danymi literaturowymi, co wskazuje, że są one reprezentatywne dla szczepów *C. jejuni* typowo występujących w systemach produkcji drobiarskiej.

Opracowano i zoptymalizowano metody izolacji oraz oczyszczania przeciwciał IgY z żółtek jaj kur immunizowanych mieszaniną antygenów bakteryjnych. Porównano skuteczność różnych metod oczyszczania (precypitacja PEG, chlorkiem sodu, siarczanem amonu, chromatografia powinowactwa) oraz przeprowadzono kontrolę jakości preparatów, w tym ocenę ich aktywności biologicznej w testach *in vitro*. Wykazano, że metoda oczyszczania wpływa na poziom zachowanej aktywności IgY, a najwyższe stężenia przeciwciał oznaczono w frakcjach pochodzących z pośrednich etapów izolacji (WSF), co wskazuje na możliwe straty w późniejszych etapach oczyszczania.

Badania *in vitro* obejmowały testy aglutynacji, ELISA oraz ocenę zdolności IgY do hamowania wzrostu *C. jejuni*. Wszystkie badane preparaty wykazywały aktywność wobec patogenu, przy czym najwyższa odnotowana skuteczność wynosiła 6 log, a dla porównania najłabszy uzyskany wynik odpowiadał redukcji liczby bakterii o 3 log, co oznacza zahamowanie wzrostu na poziomie ok. 99,9%.

W badaniach *in vivo* przeprowadzonych na modelu drobiu oceniono skuteczność różnych dróg podania preparatów zawierających inaktywowane antygeny oraz IgY (doustna i iniekcyjna) oraz ich wpływ na odpowiedź immunologiczną i poziom kolonizacji jelit *C. jejuni*. Stwierdzono istotne różnice pomiędzy grupami, w tym wyższy poziom przeciwciał IgY (w surowicy) i IgA (w jelicie) w grupach otrzymujących preparaty iniekcyjnie.

Wyniki uzyskane w pracy wskazują, że przeciwciała IgY pozyskiwane wobec mieszaniny antygenów *C. jejuni* mogą stanowić skuteczne narzędzie w ograniczaniu kampylobakteriozy drobiu. Dalsze badania powinny obejmować zarówno optymalizację metod izolacji i oczyszczania przeciwciał, opracowanie stabilnych formułacji do zastosowań w produkcji drobiarskiej, jak i rozszerzone badania *in vivo* w warunkach zbliżonych do środowiska hodowlanego.

1.2 Abstract

Campylobacteriosis is one of the most frequently diagnosed bacterial zoonoses worldwide, representing a significant concern in both public health and poultry production. *Campylobacter jejuni* is the primary etiological agent of the disease, with poultry, particularly broiler chickens, serving as the major reservoir and source of human infections. Given the restrictions on antibiotic use and the lack of effective poultry vaccines, alternative strategies to limit intestinal colonization are being explored, including the application of immunoglobulin Y (IgY) antibodies derived from the egg yolks of immunized hens.

The aim of this study was to investigate the interactions between *C. jejuni*, IgY antibodies, and components of the immune response, as well as to evaluate the efficacy of inactivated antigens and IgY preparations in reducing colonization of poultry by this pathogen. Field isolates of *C. jejuni* were characterized phenotypically (biochemical tests) and genotypically (virulence gene profiling). The results confirmed consistency with literature data, supporting that the isolates examined are representative of *C. jejuni* typically found in poultry production systems.

IgY antibodies were isolated from egg yolks of hens immunized with a mixture of bacterial antigens, and purification methods were developed and optimized. The performance of different purification approaches (PEG precipitation, sodium chloride, ammonium sulfate, and affinity chromatography) was compared, and the quality of preparations was assessed, including their biological activity *in vitro*. The purification method influenced the preservation of IgY activity, with the highest antibody concentrations detected in water-soluble fractions (WSF) from intermediate stages of isolation, suggesting potential losses during subsequent purification steps.

In vitro assays included agglutination, ELISA, and growth inhibition tests. All IgY preparations demonstrated activity against the pathogen, with the highest observed efficacy corresponding to a 6-log reduction in bacterial counts. Even the weakest effect recorded, a 3-log reduction, represented approximately 99.9% growth inhibition.

In vivo studies using a poultry model evaluated the efficacy of different routes of inactivated antigens and IgY administration (oral and intramuscular) and their impact on the immune response and intestinal colonization by *C. jejuni*. Significant differences between groups were observed, including higher levels of serum IgY and intestinal IgA in birds receiving intramuscular preparations.

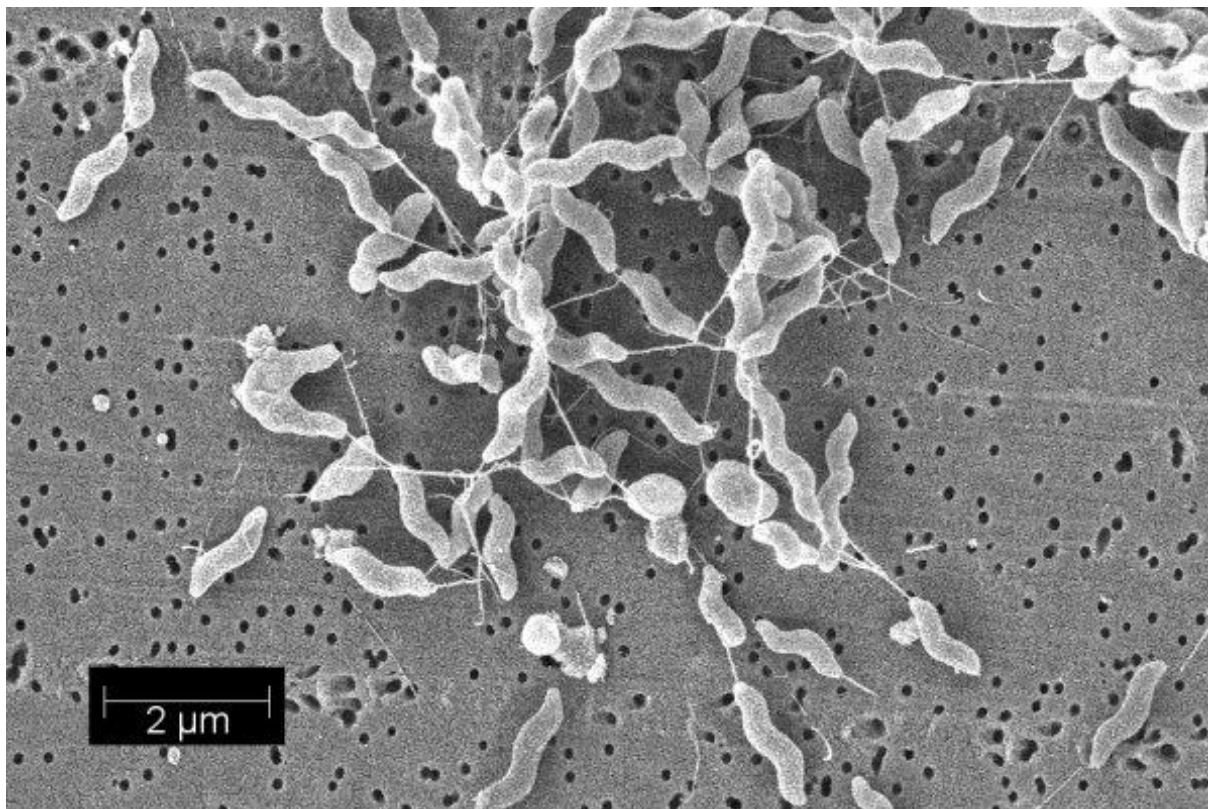
The findings indicate that IgY antibodies raised against a mixture of *C. jejuni* antigens may provide an effective tool for controlling campylobacteriosis in poultry. Further research should focus on optimizing antibody isolation and purification methods, developing stable formulations suitable for poultry production, and conducting extended *in vivo* trials under farm-like conditions.

2 Wstęp

2.1 *Campylobacter jejuni* – charakterystyka

2.1.1 Warunki wzrostu i przeżywalność

Bakterie z rodzaju *Campylobacter* to Gram-ujemne, mikroaerofilne pałeczki będące czynnikiem etiologicznym odzwierzęcej choroby zakaźnej – kampylobakteriozy (Ryc. 1). Są jednymi z najmniejszych znanych bakterii patogennych – charakteryzują się spiralnym kształtem oraz rozmiarami: długość 0,5–5 μm , średnica 0,2–0,8 μm ¹. Komórki te są bardzo ruchliwe – poruszają się dzięki pojedynczej lub biegunowo zlokalizowanej wici².



Rycina 1. Obraz uzyskany metodą skaningowej mikroskopii elektronowej przedstawiający *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*. Widoczne charakterystyczne kształty komórek oraz obecność rzęsek [Ingrid Hansson (BVF, SLU), Tapio Nikkilä (BVF, SLU) & Leif Ljung (UU), licencja: Creative Commons Uznanie autorstwa 2.5 Szwecja].

Optymalne warunki wzrostu dla pałeczek *Campylobacter jejuni* obejmują temperaturę około 42 °C oraz atmosferę mikroaerofilną, zawierającą 5% O₂, 10% CO₂ i 85% N₂³. Warunki te odzwierciedlają temperaturę ciała drobiu, który stanowi główny rezerwuuar tego patogenu. Bakterie *C. jejuni* rosną w zakresie temperatur od 37 °C do 42 °C, przy czym optymalna wynosi około 41,5 °C. Bakterie nie są w stanie przeżyć w temperaturze powyżej 55 °C, dlatego klasyfikowane są jako termotolerancyjne, a nie termofilne. Poniżej 30°C nie dochodzi u nich do namnażania. *C. jejuni* może jednak przetrwać w środowisku wilgotnym i przy obniżonej zawartości tlenu nawet 2–4 tygodnie w temperaturze 4 °C. Bakterie te wykazują również zdolność przeżycia w temperaturze –20 °C przez okres 2–5 miesięcy, natomiast w temperaturze pokojowej przeżywają jedynie kilka dni. W warunkach chłodniczych, szczególnie w przypadku próżniowo pakowanych produktów spożywczych, mogą utrzymywać się przez 1–3 tygodnie, choć w takich warunkach nie dochodzi już do ich namnażania. Wzrost jest ograniczony w warunkach tlenowych, a także przy zbyt niskim lub zbyt wysokim pH – optimum przypada na zakres 6,5–7,5^{4–6}.

C. jejuni cechuje się stosunkowo długą fazą adaptacyjną (lag), w której czas generacji komórek wynosi około 2–3 godziny⁷. W warunkach laboratoryjnych faza ta może trwać nawet do 15 godzin, po czym bakterie

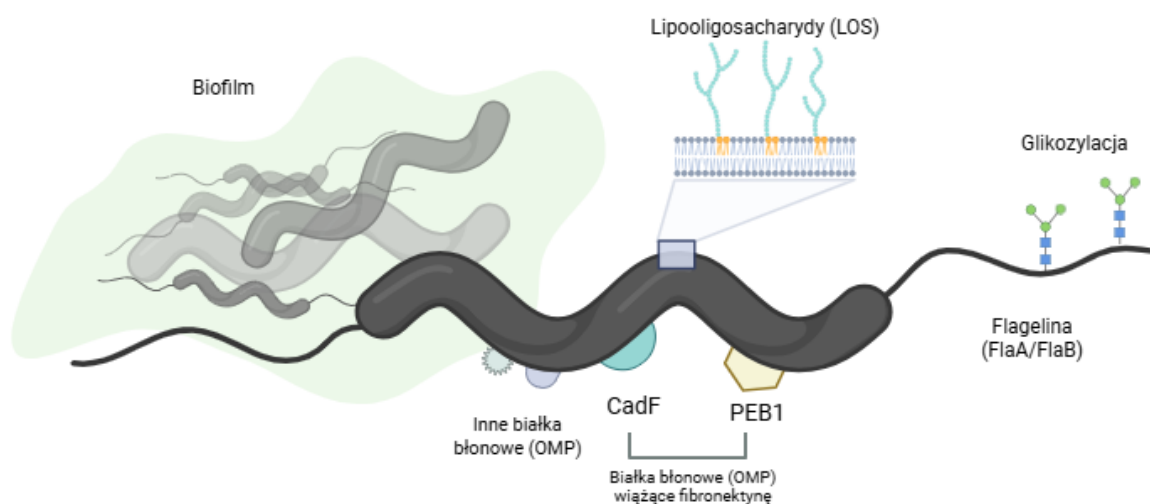
wchodzą w fazę wzrostu wykładniczego, gdzie czas generacji skraca się do poniżej 1,5 godziny^{8,9}. Szybkość wzrostu zależy od warunków środowiskowych i cech szczepu – szczepy wywołujące u ludzi biegunkę wodnistą szybciej namnażają się w 37 °C, podczas gdy szczepy związane z biegunką zapalną preferują 42 °C⁸. Bakteria może wykorzystywać alternatywne akceptory elektronów przy ograniczonej dostępności tlenu, co umożliwia zwiększenie tempa wzrostu i gęstości komórek – jednak warunki beztlenowe całkowicie hamują jej namnażanie¹⁰.

Pod względem klasyfikacji taksonomicznej *Campylobacter jejuni* należy do typu Campylobacterota, klasy Campylobacteria, rzędu Campylobacterales i rodziny Campylobacteraceae. Taksonomia ta została ustalona na podstawie filogenetycznych analiz genomowych, które wykazały odrębność tej grupy bakterii od wcześniejszych klasyfikacji opartych wyłącznie na cechach fenotypowych¹¹. Obecnie opisano 32 gatunki wraz z 9 podgatunkami należącymi do rodzaju *Campylobacter*, z czego *C. jejuni* oraz *C. coli* stanowią najczęstsze przyczyny zakażeń przewodu pokarmowego u ludzi^{12,13}. Bakterie te są szeroko rozpowszechnione w środowisku – stanowią element mikrobioty przewodu pokarmowego zwierząt gospodarskich (drób, bydło, owce, świnie), domowych, a także dziko żyjących. Dane epidemiologiczne wskazują, że *Campylobacter* jest obecnie najczęstszą przyczyną bakteryjnych zatruc pokarmowych u ludzi w Europie – przewyższając pod względem liczby przypadków m.in. *Salmonella* spp. i *Yersinia* spp.^{1,14}.

Oprócz specyficznych wymagań środowiskowych, kluczowe dla przeżywalności i patogenezy *C. jejuni* są także jej struktury powierzchniowe, które pełnią wiele funkcji związanych z adhezją, ruchem i oddziaływaniem z układem odpornościowym gospodarza.

2.1.2 Struktury powierzchniowe

Struktury powierzchniowe *Campylobacter jejuni* odgrywają kluczową rolę w procesach kolonizacji, inwazji oraz unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Do najważniejszych należą wici (ang. *flagella*), otoczki polisacharydowe, lipooligosacharydy (LOS) oraz białka błony zewnętrznej (OMP – *outer membrane protein*)^{4,15}. Struktury przedstawiono schematycznie na Ryc. 2.



Rycina 2. Struktury powierzchniowe *Campylobacter jejuni*: biofilm, wici (FlaA/FlaB), lipooligosacharydy (LOS) oraz białka błonowe (OMP, m.in. CadF, PEB1). Zaznaczono przykładowe modyfikacje powierzchniowe, w tym glikozylację [opracowanie własne przy użyciu BioRender.com].

Wici warunkują ruchliwość bakterii, umożliwiając dotarcie do miejsca kolonizacji w przewodzie pokarmowym. Ich głównym komponentem są białka flagelinowe (FlaA, FlaB), które podlegają glikozylacji wpływającej na ich właściwości immunogenne i adhezyjne¹⁶. Otoczka i LOS modulują odpowiedź

immunologiczną gospodarza, m.in. poprzez mimikrę molekularną. Zmienność struktur LOS może prowadzić do reakcji autoimmunologicznych i jest powiązana z występowaniem powikłań neurologicznych, takich jak zespół Guillain-Barrégo^{17,18}.

Białka błony zewnętrznej, takie jak CadF czy PEB1, pośredniczą w adhezji do komórek nabłonkowych¹⁹. Część z nich może również uczestniczyć w procesie inwazji lub tworzeniu biofilmu, przyczyniając się do długotrwałego przetrwania bakterii w organizmie gospodarza^{5,20}. Powierzchniowe białka *C. jejuni*, podobnie jak flagelina, podlegają glikozylacji, co również wpływa na ich rozpoznawalność przez układ odpornościowy. Zmienność glikozylacji oraz ekspresja różnych wariantów powierzchniowych antygenów umożliwia unikanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Ten mechanizm tzw. zmienności antygenowej jest jednym z głównych wyzwań w opracowywaniu skutecznych szczepionek i testów diagnostycznych²¹.

Wiele z opisanych struktur jest kodowanych przez wyspecjalizowane geny, których ekspresja i regulacja stanowią podstawę wirulencji *C. jejuni*.

2.1.3 Genom i czynniki wirulencji *Campylobacter jejuni*

W 2000 roku zsekwencjonowano genom referencyjnego szczepu *Campylobacter jejuni* NCTC 11168. Zawiera on 1 641 481 par zasad, z czego 94,3% koduje 1654 białka. Genom ten cechuje się brakiem sekwencji insercyjnych, brakiem elementów fagowych oraz bardzo ograniczoną liczbą powtórzeń (wykazano jedynie cztery powtarzające się sekwencje DNA). Charakteryzuje się również znaczną zmiennością genetyczną, co utrudnia jednoznaczne ustalenie sekwencji referencyjnej – z tego względu określany bywa jako przypominający quasi-gatunki. Autorzy sugerują, że tak wysoka zmienność może wynikać z nielicznej obecności genów odpowiedzialnych za naprawę DNA²².

W genomie *C. jejuni* zidentyfikowano również regiony hiperzmienne, obejmujące m.in. geny związane z biosyntezą lipooligosacharydu (LOS), zewnątrzkomórkowych polisacharydów (EPS) oraz modyfikacjami flageliny. Wysoka zmienność w obrębie tych struktur powierzchniowych może pełnić rolę mechanizmu umożliwiającego unikanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza oraz zwiększać przeżywalność bakterii. Genom *C. jejuni* wykazuje znaczące podobieństwo do genomu *Helicobacter pylori* – aż 55,4% białek posiada swoje ortologi u tego patogenu. Jednocześnie jednak wiele genów *C. jejuni* nie ma odpowiedników w żadnym znanym genomie bakteryjnym, co wskazuje na istnienie unikalnych mechanizmów związanych z jego biologią i patogenizacją²².

Mimo że *Campylobacter jejuni* stanowi jedną z najczęstszych przyczyn zakażeń przewodu pokarmowego u ludzi, mechanizmy jego patogenności nie zostały do końca poznane. Bolton (2015) podsumował dotychczas zidentyfikowane geny związane z wirulencją i przeżywalnością bakterii – zarówno u ludzi, jak i u drobiu. Chociaż ogólny przebieg kolonizacji jest podobny u obu gospodarzy, u ludzi zaobserwowano większą oporność na sole żółciowe oraz silniejszą ekspresję toksyny CDT²³. Geny wirulencji *C. jejuni* obejmują głównie geny związane z ruchliwością, adhezją, inwazją oraz toksycznością. W Tabeli 1. zestawiono najważniejsze z nich^{2,24}.

Czynnik wirulencji	Geny kodujące czynnik	Charakterystyka
Ruchliwość	<i>flaA</i>	Główne białko flageliny (pod kontrolą czynnika σ^{28})
	<i>flaB</i>	Główne białko flageliny (pod kontrolą czynnika σ^{54})
	<i>fliF</i>	Białka kotwiczące kompleksu wiciowego
	<i>fliM, fliY</i>	Białka motoryczne kompleksu wiciowego

Chemotaksja	<i>cheA, cheB, cheR, cheV, cheW, cheZ</i>	Dwuskładnikowy system transdukcji sygnału (zależny od kinazy histydynowej),
	<i>tlp1, tlp4, tlp10</i>	Białka chemotaktyczne (akceptory grup metylowych)
Adhezja	<i>cadF</i>	Białka błony zewnętrznej
	<i>capA</i>	Białko adhezyny
	<i>pldA</i>	Fosfolipaza A
	<i>virB11</i>	Element systemu sekrecji typu IV (T4SS)
Inwazja	<i>flaC, ciaD</i>	Białka inwazyjne transportowane przez wici wyposażoną w system T3SS
	<i>ciaB, ciaC, cial</i>	Białka inwazyjne niezbędne do kolonizacji
Produkcja toksyn	<i>cdtA, cdtB, cdtC</i>	Toksyna CDT – trzy podjednostki, działające na aktyne i blokujące cykl komórkowy w fazie G2

Tabela 1. Czynniki wirulencji *Campylobacter jejuni*. Zestawienie genów i funkcji białek związanych z ruchliwością, chemotaksją, adhezją, inwazją oraz produkcją toksyny CDT. [opracowanie własne na podstawie: Bolton, 2015; Veronese i in., 2024]

Zmienność genetyczna i występowanie mechanizmów rekombinacji wewnątrzgenomowej dodatkowo komplikują obraz wirulencji tego patogenu. W trakcie cyklu życia bakterie są narażone na działanie wielu czynników stresowych, w tym stresu oksydacyjnego i żółci, dlatego w ich genomie obecne są również liczne geny kodujące mechanizmy obronne, m.in. glutation, katalazę, dysmutazę ponadtlenkową oraz reduktazę nadktlenkową².

Jednymi z najlepiej poznanych mechanizmów wirulencji, ściśle powiązаныmi zarówno ze strukturą wici, jak i regulacją genów, są ruchliwość oraz zdolność tworzenia biofilmu odgrywające kluczową rolę w kolonizacji, inwazji oraz przetrwaniu w organizmie gospodarza.

2.1.4 Ruchliwość jako czynnik wirulencji

Ruchliwość *Campylobacter jejuni*, napędzana przez wici umieszczone na biegunach komórki, jest ściśle powiązana z jego zdolnością do kolonizacji, inwazji oraz wywoływania choroby. Liczne badania wykazały, że szczepy o wyższej ruchliwości wykazują również większą wirulencję. Ruch umożliwia przemieszczanie się bakterii przez warstwę śluzu w jelicie, co jest niezbędne do dotarcia do komórek nabłonka i skutecznego zasiedlenia gospodarza. Wici pełnią jednak więcej funkcji niż tylko lokomotoryczne – uczestniczą także w wydzielaniu czynników wirulencji, adhezji do komórek gospodarza, inwazji oraz procesie autoaglutynacji, który może wpływać na tworzenie mikrokolonii i ochronę przed układem odpornościowym. Geny odpowiedzialne za ruchliwość, takie jak *flaA* czy *flhA*, są często współregulowane z innymi genami wirulencji. Ich zaburzenie prowadzi nie tylko do zmniejszenia ruchliwości, ale również do osłabienia zdolności kolonizacyjnych i inwazyjnych bakterii^{2,24}. Zwiększona ekspresja białek flageliny i enzymów związanych z biosyntezą błony komórkowej obserwowana jest u szczepów o wyższej ruchliwości, co koreluje z większą zdolnością do przylegania do komórek i ich inwazji. Mutanty o zredukowanej ruchliwości wykazują istotnie niższą zdolność do penetracji nabłonka jelitowego i tworzenia mikrokolonii, co przekłada się na obniżoną patogenność²⁵.

W badaniach z wykorzystaniem modeli zwierzęcych, takich jak prosięta gnotobiotyczne, stwierdzono wyraźny związek między stopniem ruchliwości a częstością zakażeń. Najbardziej ruchliwe szczepy osiągały najwyższy odsetek infekcji, podczas gdy szczepy o niskiej ruchliwości rzadko prowadziły do skutecznego zakażenia²⁶. Duże badania mutagenetyki potwierdziły, że ruchliwość stanowi jeden z głównych czynników wirulencji, a wiele genów niezbędnych do poruszania się jest także kluczowych dla skutecznej infekcji²⁷.

Podsumowując, ruchliwość *C. jejuni*, realizowana głównie przez struktury wiciowe, odgrywa istotną rolę w patogenezie i stanowi jeden z najlepiej scharakteryzowanych czynników wirulencji tego gatunku.

2.1.5 Mechanizmy przetrwania: biofilm i wewnątrzkomórkowa adaptacja

Jednym z istotnych mechanizmów przetrwania i kolonizacji *C. jejuni* jest zdolność do tworzenia biofilmu – wielokomórkowej struktury adhezyjnej osadzającej się na powierzchniach biologicznych i abiotycznych. Biofilm pełni funkcję ochronną wobec bakterii, zabezpieczając je przed niekorzystnymi czynnikami środowiskowymi, takimi jak obecność tlenu, działanie antybiotyków czy zmienne pH. Struktura ta sprzyja długotrwałemu utrzymywaniu się bakterii zarówno w organizmie gospodarza, jak i poza nim – np. na powierzchniach sprzętu w zakładach przetwórstwa spożywczego. Biofilm zwiększa również zdolność bakterii do adhezji do komórek nabłonka jelit, a w warunkach środowiskowych może mieć charakter polimikrobiologiczny, zawierając np. bakterie z rodzaju *Pseudomonas*²⁸.

Tworzeniu biofilmu sprzyja ekspozycja na tlen atmosferyczny, obecność struktur flagellarnych i związanych z nimi białek (np. rodziny białek Cia), a także właściwa motoryka i spiralny kształt komórki. Wykazano również, że systemy sekrecyjne typu III (T3SS) i typu VI (T6SS) odgrywają istotną rolę w procesie kolonizacji i biofilmogenezy²⁴.

Obok biofilmu, istotnym mechanizmem przetrwania *C. jejuni* w organizmie gospodarza jest zdolność do funkcjonowania jako fakultatywny patogen wewnątrzkomórkowy. Bakteria ta może przetrwać w komórkach nabłonka jelitowego dzięki formowaniu wyspecjalizowanych struktur wewnątrzkomórkowych, tzw. *Campylobacter*-containing vacuoles (CCV). Po penetracji komórki gospodarza, wokół bakterii formowana jest wakuola, której fuzja z lizosomami zostaje zablokowana dzięki obecności białka Cia²⁹. Mechanizm ten umożliwia bakteriom uniknięcie degradacji i długotrwałe utrzymywanie się w komórkach, co może sprzyjać przewlekłemu przebiegowi infekcji oraz nawrotom choroby.

2.1.6 Metabolizm

Skuteczna kolonizacja gospodarza przez *Campylobacter jejuni* wymaga przystosowania nie tylko strukturalnego, ale również metabolicznego. Gatunek ten charakteryzuje się nietypowym i wysoce wyspecjalizowanym metabolizmem, który odróżnia go od większości bakterii jelitowych, a w diagnostyce mikrobiologicznej identyfikowany jest m.in. na podstawie dodatniego wyniku testów oksydazowego i katalazowego oraz zdolności hydrolizy hipuranu (*hippurate hydrolysis*), co odróżnia go od innych gatunków z rodzaju *Campylobacter*⁶.

Campylobacter jejuni nie fermentuje ani nie utlenia klasycznych cukrów, takich jak glukoza, a jego podstawowym źródłem energii są aminokwasy oraz wybrane metabolity cyklu kwasu cytrynowego^{30,31}. Bakteria ta preferuje warunki mikroaerofilne i posiada złożony łańcuch oddechowy, który pozwala jej wykorzystywać alternatywne donory i akceptory elektronów – w tym fumaran – w warunkach ograniczonej dostępności tlenu^{32–34}. Różnice metaboliczne między szczepami mogą wpływać na ich zdolność do kolonizacji określonych nisz – niektóre izolaty wykorzystują dodatkowe substraty, takie jak glutamin czy asparagina. W kontekście regulacji metabolizmu istotną rolę odgrywają białka regulatorowe, takie jak CsrA i LuxS, wpływające nie tylko na szlaki metaboliczne, ale także na odpowiedź na stres^{35,36}.

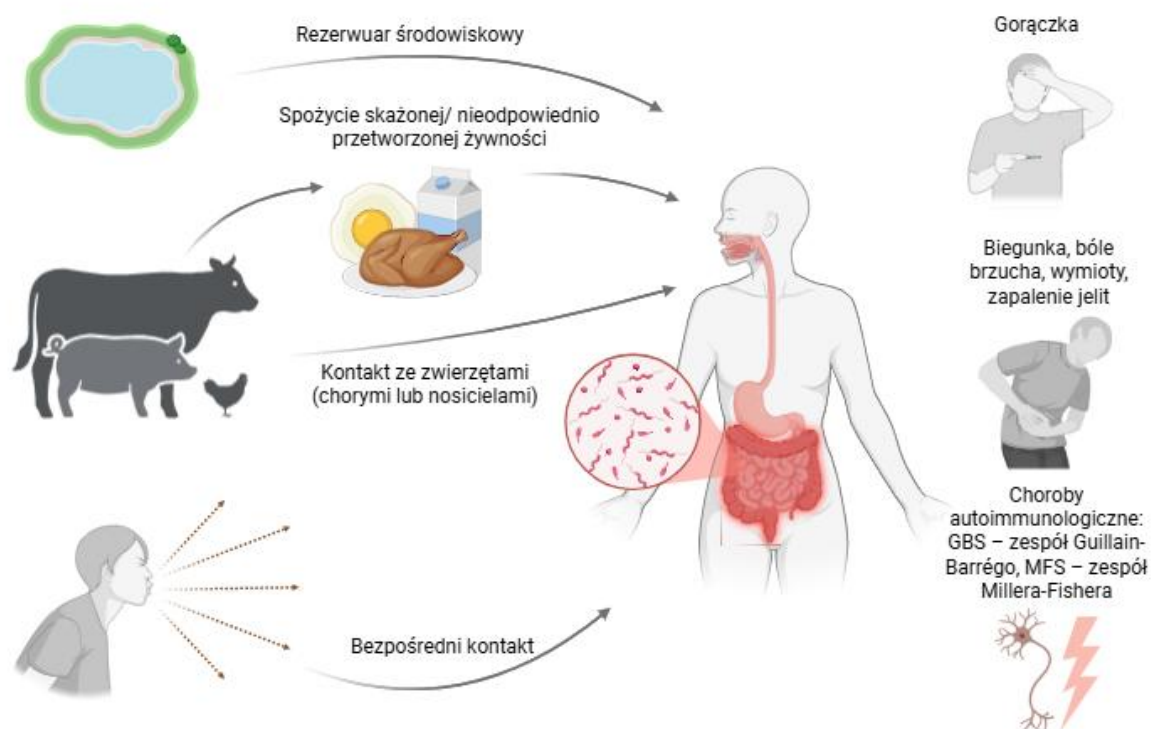
W środowisku wewnątrzkomórkowym bakteria potrafi przeprogramować swoje szlaki energetyczne, ograniczając ogólną aktywność metaboliczną i aktywując m.in. oddychanie fumarowe. Adaptacja ta może wspierać jej przetrwanie w komórkach gospodarza i utrudniać eliminację patogenu¹⁰.

2.2 Kampylobakteriozy

2.2.1 Charakterystyka ogólna

Zakażenia pałeczkami z rodzaju *Campylobacter*, określane zbiorczo jako kampylobakteriozy, należą do najczęstszych bakteryjnych chorób przewodu pokarmowego na świecie. Do infekcji dochodzi najczęściej

drogą pokarmową – głównie po spożyciu niedogotowanego lub niedopieczzonego mięsa drobiowego, rzadziej poprzez skażoną wodę lub kontakt z nosicielami (Ryc. 3).



Rycina 3. Drogi transmisji bakterii *Campylobacter jejuni* oraz główne objawy kliniczne u ludzi [opracowanie własne za pomocą BioRender.com].

Dominującą postacią kliniczną kamylobakteriozy jest ostre zapalenie jelit lub żołądka i jelit. Objawy zwykle obejmują biegunkę (często z domieszką krwi lub śluzu), nudności, wymioty, bóle brzucha zlokalizowane w okolicy pępka oraz gorączkę. Dawka zakaźna dla *Campylobacter jejuni* jest relatywnie niska i wynosi jedynie 500–10 000 komórek bakteryjnych. Objawy rozwijają się zazwyczaj w ciągu 1–7 dni od zakażenia i najczęściej ustępują samoistnie w ciągu 2–7 dni. U części pacjentów (około 30%) występują jedynie objawy grypopodobne, co może prowadzić do niedodiagnozowania zakażenia^{24,30}. Leczenie ogranicza się najczęściej do terapii objawowej – nawadniania i uzupełniania elektrolitów. W przypadkach ciężkiego przebiegu choroby, przewlekłych objawów lub u osób z obniżoną odpornością konieczne może być zastosowanie antybiotykoterapii. W grupie podwyższonego ryzyka znajdują się dzieci, kobiety w ciąży oraz osoby starsze. Najczęściej stosowanymi antybiotykami są makrolidy, takie jak erytromycyna i azytromycyna^{17,37}.

W ostatnich latach rosnącym problemem klinicznym staje się narastająca oporność szczepów *Campylobacter jejuni* na antybiotyki stosowane w leczeniu ludzi. Szczególnie niepokojące są wysokie poziomy oporności na fluorochinolony (np. cyprofloksacynę) oraz, w niektórych regionach, również na makrolidy – podstawowe leki stosowane w ciężkich przypadkach zakażeń³⁸. Zjawisko to wiąże się m.in. z niekontrolowanym stosowaniem antybiotyków w produkcji zwierzęcej oraz selekcją opornych szczepów w środowisku drobiarskim. Antybiotykooporność *C. jejuni* stanowi istotne wyzwanie dla zdrowia publicznego i wzmacnia potrzebę opracowywania alternatywnych strategii prewencji oraz ograniczania kolonizacji u zwierząt gospodarskich^{39,40}.

Pomimo zazwyczaj łagodnego przebiegu, kamylobakterioza może prowadzić do poważnych powikłań. Opisywano przypadki krwotocznych zapaleń jelit, zapalenia trzustki, pęcherzyka żółciowego, otrzewnej, a także poronień. Szczególną uwagę zwraca się na neurologiczne powikłania po zakażeniu, takie jak zespół Guillain-Barrégo (GBS) oraz zespół Millera-Fishera (MFS). Są to rzadkie, ale ciężkie schorzenia

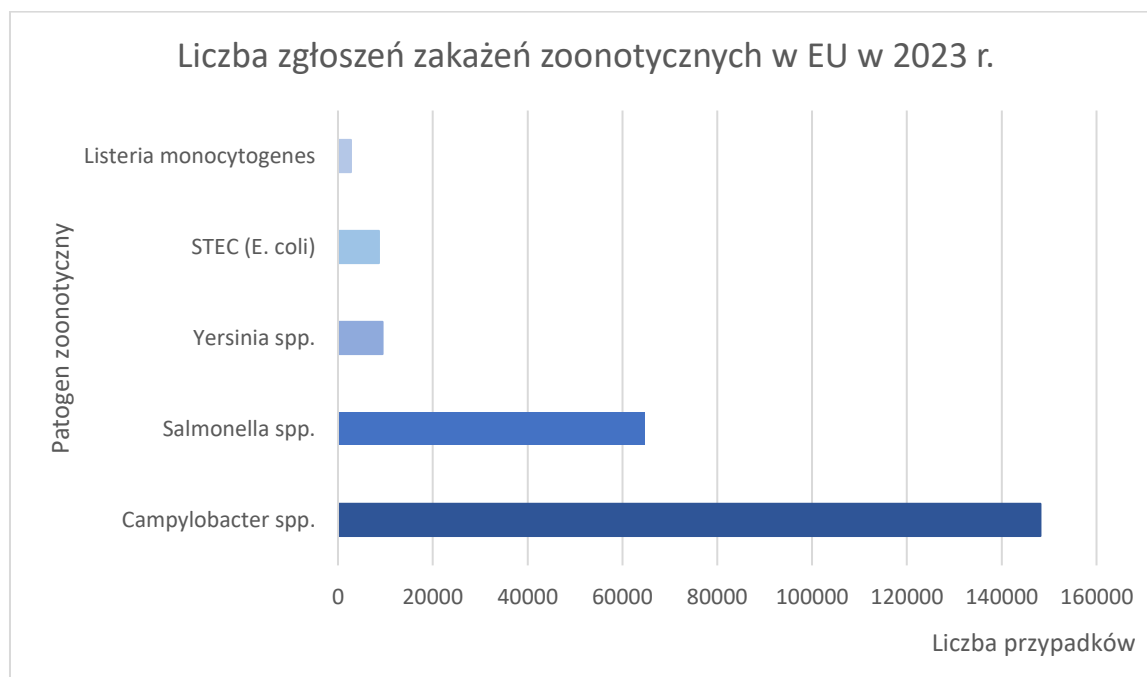
autoimmunologiczne, prowadzące do ostrego, demielinizacyjnego zapalenia nerwów obwodowych, a w konsekwencji do porażień mięśniowych. GBS występuje u około 1–2 osób na 100 000 rocznie, a przebyta kamylobakterioza odpowiada za około 30% wszystkich przypadków tego zespołu⁴¹.

W przeciwieństwie do ludzi, u drobiu – będącego głównym rezerwuarem pałeczek *Campylobacter* – zakażenie przebiega najczęściej bezobjawowo. Ptaki, zwłaszcza kurczęta brojlerów, są naturalnymi nosicielami tych bakterii^{20,42}. *Campylobacter jejuni* kolonizuje głównie końcowe odcinki przewodu pokarmowego, zwłaszcza jelito ślepe, nie wywołując przy tym żadnych zmian klinicznych ani patologicznych w obrębie nabłonka. Utrzymywanie się wysokiego poziomu bakterii w treści jelitowej nie wpływa na stan zdrowia ptaków, a brak objawów utrudnia wykrycie zakażenia w stadzie przed ubojem. Ta cecha sprawia, że drób stanowi trudny do kontrolowania, lecz istotny epidemiologicznie rezerwuuar *Campylobacter*, który może przenosić się na ludzi drogą pokarmową^{24,43}.

2.2.2 Epidemiologia – kamylobakterioza u ludzi

Kamylobakterioza pozostaje najczęściej zgłaszaną zoonozą w Unii Europejskiej od 2005 roku, kiedy po raz pierwszy liczba przypadków kamylobakterioz była większa od liczby przypadków salmonelloz⁴⁴. W 2023 roku potwierdzono 148 181 przypadków zachorowań u ludzi, co odpowiada wskaźnikowi 45,7 przypadków na 100 000 mieszkańców. Dla porównania, druga najczęściej zgłaszana zoonoza – salmonelloza – miała wskaźnik 20,0/100 000, a trzecia – yersinioza – jedynie 2,9/100 000. Tym samym, w 2023 r., kamylobakteriozy stanowiły ponad połowę wszystkich zgłoszonych przypadków zoonoz w UE¹⁴.

Ryc. 4. przedstawia liczbę zgłoszeń pięciu najczęściej raportowanych zoonoz w krajach Unii Europejskiej w 2023 roku, według liczby potwierdzonych przypadków u ludzi. Kamylobakterioza pozostaje zdecydowanie dominującą jednostką, odpowiadającą za ponad połowę wszystkich notyfikacji chorób odzwierzęcych. Dla porównania uwzględniono także salmonellozę, yersiniozę, infekcje STEC (Shiga toxin-producing *E. coli*) oraz listeriozę.



Rycina 4. Liczba zgłoszonych przypadków wybranych zoonoz w krajach Unii Europejskiej w 2023 roku. [opracowanie własne na podstawie danych z: EFSA Journal, 2024].

Najwyższe wskaźniki zachorowań w 2023 roku odnotowano w Luksemburgu (129,4/100 000), Czechach (125,2/100 000), Słowacji (104,4/100 000) i na Malcie (89,5/100 000). Polska znajduje się wśród krajów z najniższą liczbą zgłoszonych przypadków ($\leq 6,1/100\ 000$), podobnie jak Bułgaria, Grecja i Rumunia. Należy jednak zaznaczyć, że w Polsce brak jest obowiązku rutynowego raportowania i diagnozowania

kampylobakteriozy przez stacje sanitarno-epidemiologiczne, co może prowadzić do niedoszacowania faktycznej liczby zakażeń¹⁴.

2.2.3 Epidemiologia – występowanie *Campylobacter* u zwierząt i w żywności pochodzenia zwierzęcego

Drób hodowlany, w szczególności kurczęta rzeźne (brojlery), pozostaje głównym rezerwuarem *Campylobacter* i istotnym źródłem zakażeń u ludzi. Bakterie te kolonizują jelita ptaków bez wywoływania objawów chorobowych, a ich koncentracja w kryptach jelitowych może sięgać nawet 10^8 CFU/g treści jelitowej⁴⁵. Podczas uboju bakterie mogą przenosić się z jelit na inne części tuszek, a proces chłodzenia mięsa do około 4 °C sprzyja ich rozprzestrzenianiu w postaci aerozoli⁴⁶. W warunkach przechowywania przy niskim pH bakterie mogą przechodzić w stan VBNC (ang. *viable but not culturable*), co czyni je niewykrywalnymi metodami hodowlanymi – w takich przypadkach możliwa jest jedynie detekcja metodą PCR².

Zgodnie z raportem EFSA za 2023 rok, *Campylobacter* wykrywano w szerokim zakresie produktów pochodzenia zwierzęcego, w szczególności w mięsie brojlerów (21,6% próbek) i indyków (19,4%). Dla porównania, w mięsie wieprzowym odsetek próbek dodatnich wyniósł 0,37%, a w mięsie wołowym 0,11%. Co istotne, w mleku i produktach mlecznych nie odnotowano dodatnich próbek. W zakresie monitorowania zakażeń u zwierząt gospodarskich, dane z 2023 roku wskazują na bardzo wysoką częstość wykrycia *Campylobacter* u świń – aż 72,3% próbek było dodatnich, głównie dla *C. coli*. W próbkach od bydła (głównie <1 roku) wykryto *C. jejuni* w 6,8% przypadków. U brojlerów dodatnich było 4,6% próbek, a u drobnych przeżuwaczy – 7,2%. Dla porównania, u kotów i psów bakterie wykryto tylko w 1,4% próbek¹⁴.

Te dane potwierdzają, że produkty drobiowe – zarówno na etapie hodowli, jak i uboju – pozostają głównym ogniwem w łańcuchu transmisji *Campylobacter* do ludzi. Równocześnie wysoka wykrywalność tych bakterii u świń i bydła wskazuje na potencjalne ryzyko ze strony innych źródeł żywności, choć ich udział w zakażeniach ludzi jest mniejszy.

2.3 Strategie zwalczania *C. jejuni* i obniżania liczby zachorowań

Ze względu na powszechność kampylobakterioz oraz ich powiązanie z drobiem jako głównym rezerwuarem, strategie zwalczania *Campylobacter jejuni* koncentrują się zarówno na ograniczaniu kolonizacji u zwierząt, jak i na zapobieganiu zakażeniom u ludzi. Leczenie człowieka zazwyczaj opiera się na postępowaniu objawowym – nawadnianiu i uzupełnianiu elektrolitów. Antybiotyki, takie jak makrolidy czy fluorochinolony, stosuje się jedynie w ciężkich przypadkach lub u osób z grup ryzyka, jednak rosnąca oporność – zwłaszcza na fluorochinolony – ogranicza skuteczność takiej terapii^{37,47}.

W produkcji drobiarskiej kluczowe znaczenie mają działania prewencyjne, takie jak ścisła bioasekuracja, stosowanie probiotyków (np. bakterii kwasu mlekowego), terapia fagowa czy próby szczepień^{48–50}. Choć niektóre z tych metod pozostają na etapie eksperymentalnym, ich skuteczność w ograniczaniu kolonizacji jelit przez *Campylobacter* potwierdzono w licznych badaniach. Ograniczenie stosowania antybiotyków u zwierząt hodowlanych, wynikające z obaw o rozwój oporności, zwiększyło zainteresowanie alternatywnymi strategiami biologicznymi, takimi jak bakteriofagi czy bakteriocyny⁵⁰.

Dodatkowo, coraz większy nacisk kładzie się na poprawę higieny podczas uboju i przetwórstwa – stosowanie technologii takich jak dekontaminacja chemiczna, zimna plazma czy światło UV może istotnie ograniczyć liczbę bakterii na tuszkach drobiowych. Zintegrowane podejście, łączące kilka metod jednocześnie, uważane jest obecnie za najbardziej obiecujące rozwiązanie w ograniczaniu liczby zakażeń *C. jejuni* zarówno u ludzi, jak i u zwierząt^{49,51}.

2.3.1 Rola warunków higienicznych w ograniczaniu skażenia mięsa drobiowego

Do zakażenia człowieka *C. jejuni* dochodzi najczęściej poprzez spożycie niedogotowanego mięsa drobiowego, w którym bakterie przetrwały proces uboju i przetwórstwa. Tuszki brojlerów mogą zostać zanieczyszczone zawartością jelit już na etapie wypatroszenia, a następnie bakterie mogą przemieszczać

się na inne powierzchnie, w tym mięso przeznaczone do sprzedaży. Stosowanie nowoczesnych metod dekontaminacji – takich jak kąpiele w kwasie octowym, światło UV czy zimna plazma – może znacząco obniżyć liczbę żywych bakterii na powierzchni tuszki^{52,53}. Jednak żadne z tych rozwiązań nie eliminuje ryzyka całkowicie. Kluczowe znaczenie ma także kontrola temperatury i wilgotności w chłodniach oraz ograniczanie tworzenia biofilmu w urządzeniach linii produkcyjnej. Zgodnie z zasadą HACCP, tylko odpowiednia kontrola krytycznych punktów procesu może zmniejszyć ryzyko przeniesienia patogenu do żywności^{54,55}.

2.3.2 Postępy w rozwoju immunoprofilaktyki przeciwko *Campylobacter jejuni*

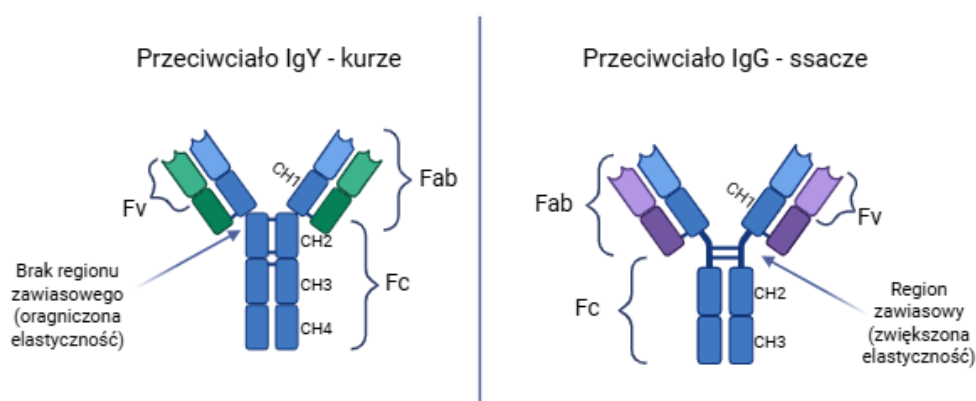
W produkcji zwierzęcej celem nie jest leczenie zakażeń wywołanych przez *C. jejuni*, lecz ograniczanie kolonizacji przewodu pokarmowego zwierząt – zwłaszcza drobiu, który stanowi główny rezerwuár tego patogenu. Jednym z bardziej obiecujących kierunków badań pozostaje immunizacja kur niosek inaktywowanymi szczepami *C. jejuni* lub oczyszczonymi antygenami powierzchniowymi, takimi jak flagelina, białka błony zewnętrznej (OMP), kapsularne wielocukry czy lipooligosacharydy (LOS). Badania przedkliniczne wykazały, że odpowiednio przygotowane preparaty mogą ograniczać kolonizację jelit i tym samym zmniejszać ryzyko transmisji bakterii do ludzi. Mimo że wyzwaniem pozostaje standaryzacja i poprawa immunogenności takich preparatów, kierunek ten uznawany jest za jeden z kluczowych w rozwoju skutecznych metod prewencji kamylobakteriozy u ludzi^{42,56,57}.

Z kolei w przypadku zakażeń ludzi podstawą leczenia pozostaje terapia objawowa. Antybiotyki – głównie makrolidy – stosuje się jedynie w cięższych przypadkach lub u osób z obniżoną odpornością. Narastający problem oporności, zwłaszcza na fluorochinolony, budzi niepokój, jednak jak dotąd nie opracowano skutecznej i szeroko stosowanej szczepionki dla ludzi³⁸. Pomimo podejmowanych prób, wysoka zmienność antygenowa oraz brak wyraźnego zapotrzebowania epidemiologicznego ograniczają tempo prac w tym obszarze. Podkreśla to jeszcze mocniej znaczenie strategii ograniczania kolonizacji u kur – jako najbardziej realnego i efektywnego sposobu na ograniczenie liczby zachorowań u ludzi^{51,58–60}.

2.4 Kurze przeciwciała IgY

2.4.1 Budowa

IgY to główna klasa immunoglobulin obecnych w osoczu ptaków, pełniąca rolę funkcjonalnego odpowiednika IgG u ssaków. Główne różnice w budowie przedstawiono na Ryc. 5.



Rycina 5. Porównanie budowy przeciwciał: IgY (kurze) i IgG (ssacze). Łańcuchy ciężkie zaznaczono na niebiesko, łańcuchy lekkie – na zielono (IgY) oraz fioletowo (IgG). Fab – fragment wiążący antygen (ang. *Fragment antigen binding*), Fc – fragment krystalizujący (ang. *Fragment crystallizable*), Fv – fragment zmienny (ang. *Variable fragment*) [opracowanie własne przy użyciu BioRender.com].

Struktura IgY obejmuje dwa łańcuchy lekkie oraz dwa łańcuchy ciężkie z czterema domenami stałymi, co nadaje cząsteczce większą masę (ok. 180 kDa) i sztywność w porównaniu do IgG. Brak regionu zawiasowego ogranicza elastyczność, ale jednocześnie zwiększa odporność na proteolizę. Żółtko jednego jaja zawiera przeciętnie około 100 mg IgY, z czego 2–10% stanowią przeciwciała swoiste względem

zastosowanego antygeny⁶¹. W porównaniu z immunoglobulinami klasy IgG, IgY wykazuje szereg korzystnych właściwości – jest bardziej hydrofobowa oraz odporna na proteolizę, zachowując około 40% aktywności po 8 godzinach inkubacji z chymotrypsyną. Przeciwciała IgY są stabilne w szerokim zakresie pH (od 4 do 9) oraz w temperaturach do 65 °C w środowisku wodnym^{62–64}.

IgY nie aktywuje klasycznej drogi układu dopełniacza i nie wiąże się z receptorami Fcγ, co zmniejsza ryzyko niespecyficznych reakcji oraz interferencji w badaniach immunologicznych i diagnostyce^{61,62}. Wykazano, że IgY może neutralizować toksyny, hamować aktywność enzymów bakteryjnych oraz blokować adhezję patogenów do komórek gospodarza, co czyni je potencjalnie użytecznymi w profilaktyce zakażeń dróg oddechowych i przewodu pokarmowego. Dzięki tym właściwościom immunizacja bierna z użyciem IgY – w formie dodatku do paszy lub wody – stanowi prostą do wdrożenia alternatywę dla stosowania antybiotyków w produkcji zwierzęcej^{62,63}.

2.4.2 Mechanizmy transferu IgY do żółtka i ich rola w odporności biernej piskląt

Synteza IgY zachodzi w śledzionie oraz szpiku kostnym kur, a następnie przeciwciała transportowane są z osocza do żółtka jaja za pośrednictwem receptora FcRY⁶⁵. Proces ten pozwala na skuteczny transfer odporności biernej do rozwijającego się zarodka. Wysoka zawartość przeciwciał w żółtku sprawia, że pozyskanie znacznych ilości przeciwciał jest możliwa bez konieczności uboju zwierząt. Wydajność produkcji sięga nawet 40 g IgY rocznie na jedną kurę⁶¹. Ta forma pozyskiwania przeciwciał jest zgodna z zasadą 3R, co czyni ją etyczną i atrakcyjną alternatywą dla wykorzystania przeciwciał ssaczych.

Literatura wskazuje, że stężenie IgY w surowicy pisklęcia zaczyna spadać już od 3.–5. dnia życia. Poziom przeciwciał odmatczyńnych znacząco obniża się do 10.–14. dnia, a w wielu badaniach całkowity zanik obserwuje się ok. 2. tygodnia życia. Wykazano, że przeciwciała IgY skierowane przeciwko bakteriom (np. *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*) są szybciej degradowane niż IgY przeciwwirusowe – te drugie mogą utrzymywać się do około 21. dnia życia pisklęcia. Różnica ta może wynikać zarówno z różnej awidności przeciwciał, jak i tempa ich metabolizmu. Krótki czas ochrony biernej wskazuje na konieczność wczesnej aktywnej immunizacji lub zastosowania doustnej suplementacji IgY w celu przedłużenia ochrony przed infekcjami^{64,66}.

2.4.3 Metody izolacji IgY z żółtek jaj

Izolacja IgY z żółtek jaj kurzych może być realizowana przy użyciu różnych technik, których wybór zależy od planowanego zastosowania przeciwciał oraz wymaganej skali i czystości produktu końcowego. Najczęściej stosowane podejścia obejmują metody chemiczne oparte na precypitacji solami (chlorek sodu, siarczan amonu) lub glikolem polietylenowym (PEG 6000), a także metody chromatograficzne (np. chromatografia powinowactwa, jonowymienna, czy na złożach tiofilnych). Techniki te różnią się stopniem skomplikowania, kosztami, wydajnością oraz uzyskiwaną czystością przeciwciał⁶⁷.

W celu ograniczenia ilości odczynników oraz zwiększenia powtarzalności izolacji w warunkach laboratoryjnych, coraz częściej stosuje się tzw. metodę wodną, polegającą na wstępnym oddzieleniu frakcji rozpuszczalnej w wodzie (WSF, ang. *water soluble fraction*), z której następnie w procesie precypitacji wytrącane są przeciwciała IgY. Choć WSF może zawierać znaczne ilości IgY, frakcje te bywają mętne, zawierają inne białka i cząsteczki lipidowe, a ich właściwości funkcjonalne mogą być trudne do jednoznacznej oceny bez dalszego oczyszczania⁶⁸.

W analizach porównawczych metod izolacji zwraca się uwagę nie tylko na stężenie i czystość otrzymanego preparatu (np. ocena absorbancji, SDS-PAGE), ale również na jego funkcjonalność, w tym zdolność do wiązania antygeny i wywoływania reakcji aglutynacyjnych. Dla zastosowań takich jak immunoprofilaktyka doustna lub badania przesiewowe w diagnostyce, najistotniejsze są metody zapewniające akceptowalną czystość przy zachowaniu wysokiej aktywności przeciwciał, niskich kosztów i prostoty wdrożenia⁶⁴.

2.4.4 Działanie IgY w immunoprofilaktyce zakażeń przewodu pokarmowego

Kurze przeciwciała IgY wykazują skuteczność w immunizacji biernej – szczególnie w zastosowaniach doustnych i miejscowych. Ze względu na brak wchłaniania z przewodu pokarmowego, działają one lokalnie, neutralizując toksyny, blokując adhezję patogenów i wspomagając naturalne mechanizmy obronne. Z powodzeniem wykorzystywano je w badaniach przeciwko patogenom takim jak *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium difficile*, rotawirusy czy *Campylobacter jejuni*^{64,69–72}. W kontekście *C. jejuni* wykazano, że IgY może ograniczać kolonizację jelit oraz zmniejszać liczbę wydalanych bakterii, co jest istotne zarówno w prewencji zakażeń, jak i w ograniczaniu transmisji w środowisku drobiarskim.

2.4.5 Zalety i ograniczenia

IgY łączy w sobie szereg cech korzystnych z punktu widzenia diagnostyki i immunoprofilaktyki. Zalicza się do nich wysoką wydajność produkcji, stabilność w zmiennych warunkach środowiskowych, brak reaktywności krzyżowej z białkami ssaków oraz zgodność z zasadami dobrostanu zwierząt. Jednocześnie, ograniczeniem pozostaje wrażliwość IgY na kwaśne pH i enzymy trawienne – co może wymagać zastosowania enkapsulacji lub specjalnych formułacji w preparatach doustnych. Konieczna jest również dalsza standaryzacja metod oczyszczania i produkcji, zwłaszcza w kontekście wykorzystania IgY w produktach terapeutycznych dopuszczanych do obrotu^{64,67}.

2.5 Przeciwciała IgY jako element strategii ograniczania kampylobakterioz – założenia pracy

2.5.1 Znaczenie badań nad alternatywnymi strategiami immunizacji u zwierząt

Wzrost antybiotykooporności u bakterii z rodzaju *Campylobacter*, zwłaszcza *C. jejuni*, stanowi istotne zagrożenie zarówno dla zdrowia ludzi, jak i bezpieczeństwa produkcji zwierzęcej. Z uwagi na ograniczoną skuteczność klasycznych metod terapii i brak dostępnych szczepionek dopuszczonych do stosowania w produkcji drobiu, konieczne jest opracowanie alternatywnych strategii prewencyjnych, możliwych do wdrożenia na poziomie hodowli^{38,40}.

Szczególną uwagę zwraca się na rozwiązania biologiczne – takie jak probiotyki, fagoterapia czy właśnie immunizacja bierna – które mogą ograniczać kolonizację jelit przez patogeny bez ryzyka rozwoju oporności krzyżowej. Immunoprofilaktyka bierna wykorzystująca przeciwciała IgY uzyskiwane od kur immunizowanych wybranymi antygenami *C. jejuni* może stanowić realną alternatywę dla antybiotyków – zwłaszcza w pierwszych tygodniach życia piskląt, gdy układ odpornościowy jest jeszcze niedojrzały, a przeciwciała matczyne ulegają degradacji^{50,63,66}.

Badania nad skutecznością tego podejścia nabierają szczególnego znaczenia w kontekście potrzeby ograniczenia nosicielstwa jelitowego u drobiu – jako kluczowego źródła zakażeń ludzi – oraz w świetle obowiązujących przepisów ograniczających stosowanie antybiotyków w chowie zwierząt.

2.5.2 Potencjał zastosowania IgY w zwalczaniu *C. jejuni*

W ramach niniejszej pracy skupiono się na analizie interakcji pomiędzy układem odpornościowym brojlerów a bakteriami *Campylobacter jejuni*, ich antygenami oraz swoistymi przeciwciałami IgY. Głównym celem było lepsze zrozumienie mechanizmów kolonizacji przewodu pokarmowego i odpowiedzi immunologicznej kur w różnych warunkach ekspozycji na patogen – zarówno w kontekście obecności żywych bakterii, jak i podania inaktywowanych antygenów lub przeciwciał.

Badania objęły ocenę odpowiedzi humoralnej (IgY i IgA), dynamiki kolonizacji oraz cytokin związanych z odpowiedzią immunologiczną. Uwzględniono także porównanie różnych dróg podania (doustna vs. iniekcyjna) i form zastosowanych preparatów. Choć jednym z elementów pracy była ocena potencjalnego działania ograniczającego kolonizację jelit przez *C. jejuni*, główny nacisk położono na poznawcze aspekty tych interakcji oraz ich znaczenie dla modelu zakażenia drobiu.

Istotnym elementem badań było również opracowanie praktycznej metody pozyskiwania swoistych przeciwciał IgY. Zastosowano zoptymalizowany schemat immunizacji niosek oraz prostą i powtarzalną metodę izolacji przeciwciał z żółtek jaj, opartą na wykorzystaniu tanich i łatwo dostępnych odczynników (np. chlorku sodu, PEG). Metody te dostosowano do realiów produkcyjnych z uwzględnieniem efektywności, powtarzalności oraz zgodności z wymaganiami jakościowymi i etycznymi. W rezultacie opracowano sposób uzyskiwania IgY, który może znaleźć zastosowanie w dalszych badaniach aplikacyjnych oraz jako narzędzie w opracowywaniu produktów immunoprofilaktycznych.

2.5.3 Wymiar wdrożeniowy pracy

Niniejsza praca została zrealizowana w ramach doktoratu wdrożeniowego i od samego początku zakładała połączenie badań podstawowych z praktycznym celem technologicznym, zgodnie z założeniami koncepcji One Health, która zakłada ściśle powiązanie zdrowia ludzi, zwierząt i środowiska⁷³. Przyjęta perspektywa obejmuje zarówno ochronę zdrowia ludzi, jak i poprawę zdrowia oraz warunków utrzymania zwierząt gospodarskich, co w przypadku patogenów zoonotycznych, takich jak *Campylobacter jejuni*, ma kluczowe znaczenie dla bezpieczeństwa żywności i zdrowia publicznego.

Kluczowym aspektem projektu była nie tylko analiza oddziaływań między przeciwciałami IgY, antygenami i bakteriami *C. jejuni*, ale również opracowanie metod umożliwiających efektywną i ekonomiczną produkcję swoistych przeciwciał IgY, możliwą do wdrożenia w warunkach przemysłowych. Wypracowana strategia immunizacji kur niosek oraz zoptymalizowany schemat izolacji i oczyszczania przeciwciał IgY były analizowane z myślą o ich zastosowaniu w skali produkcyjnej – przy zachowaniu zgodności z wymogami norm jakości (ISO 9001 oraz ISO 13485) oraz zasadami dobrostanu zwierząt.

Zastosowane rozwiązania umożliwiają ekonomiczne pozyskiwanie dużych ilości przeciwciał IgY o wysokiej swoistości, z potencjałem do wykorzystania zarówno w produktach immunoprofilaktycznych, jak i w diagnostyce mikrobiologicznej. Praca wnosi zatem nie tylko nową wiedzę o biologii zakażeń *C. jejuni* i odpowiedzi immunologicznej drobiu, ale stanowi także podstawę do dalszych działań wdrożeniowych, w tym opracowania produktów oraz walidacji technologii w warunkach przemysłowych, z bezpośrednim przełożeniem na poprawę zdrowia publicznego w myśl zasady „zdrowie zwierząt to zdrowie ludzi”.

3 Cele pracy

Punktem wyjścia dla niniejszej rozprawy była hipoteza, że swoiste przeciwciała IgY, otrzymane po immunizacji kur inaktywowanymi antygenami *Campylobacter jejuni*, wchodzi w istotne interakcje z bakteriami i układem odpornościowym brojlerów, wpływając na dynamikę zakażenia oraz mogące potencjalnie ograniczać kolonizację jelit przez *C. jejuni*. Założono ponadto, że proces ich produkcji może zostać zoptymalizowany w sposób umożliwiający praktyczne wykorzystanie.

W związku z tym sformułowano cztery główne cele pracy:

1. Charakterystyka izolatów terenowych bakterii *Campylobacter jejuni* – obejmująca analizę genetyczną, biochemiczną i fenotypową.
2. Opracowanie i optymalizacja metody izolacji specyficznych przeciwciał IgY, umożliwiającej ich ekonomiczne pozyskiwanie w warunkach możliwych do wdrożenia w skali przemysłowej.
3. Ocena wpływu swoistych przeciwciał IgY na wzrost i przeżywalność bakterii *C. jejuni* w warunkach *in vitro*.
4. Analiza odpowiedzi immunologicznej brojlerów na kontakt z bakteriami *C. jejuni* (inaktywowanymi i żywymi) oraz przeciwciałami IgY w modelu *in vivo*, z uwzględnieniem porównania dwóch schematów podania preparatu (doustnego oraz łączonego: doustnego i iniekcyjnego).

4 Materiały

Jeśli nie zaznaczono inaczej, wszystkie tabele i ryciny zawarte w niniejszej rozprawie zostały opracowane samodzielnie na podstawie uzyskanych wyników.

4.1 Szczepy bakteryjne

Szczep	Opis
ATCC 33560	Szczep wzorcowy
ATCC 29428	Szczep wzorcowy
CJ5	Izolat terenowy
CJ6	Izolat terenowy
CJ8	Izolat terenowy
CJ9	Izolat terenowy
CJ10	Izolat terenowy

Tabela 2. Szczepy *Campylobacter jejuni* wykorzystane w badaniu. Zestawienie szczepów referencyjnych oraz izolatów terenowych.

4.2 Podłoża hodowlane

4.2.1 Podłoże transportowe Amiesa z wymazówką, Deltalab

4.2.2 Brain Heart Infusion Broth, Biomaxima

Przygotowywano zgodnie z instrukcją producenta, sterylizowano w autoklawie (121 °C, 15 min).

4.2.3 Blood Free Campylobacter CCDA LAB AGAR, Biomaxima

Blood Free Campylobacter CCDA LAB Agar (Biomaxima) przygotowywano zgodnie z instrukcją producenta. Pożywkę sterylizowano w autoklawie (121 °C, 15 min), następnie chłodzono do 50 °C, dodawano Campylobacter CCDA Selective Supplement (Biomaxima) i rozlewano na płytki.

4.2.4 Brilliance CampyCount, Oxoid

4.2.5 Columbia LAB-AGAR™ + 5% SB, Biomaxima

Podłoże agarowe Columbia z dodatkiem 5 % odwłóknionej krwi baraniej.

4.2.6 Mueller Hinton Broth, Biomaxima

Przygotowywano zgodnie z instrukcją producenta, sterylizowano w autoklawie (121 °C, 15 min).

4.2.7 Mueller Hinton LAB-AGAR, Biomaxima

Przygotowywano zgodnie z instrukcją producenta, sterylizowano w autoklawie (121 °C, 15 min) i rozlewano na płytki.

4.2.8 Trypticasein Soy Broth, Biomaxima

Przygotowywano zgodnie z instrukcją producenta, sterylizowano w autoklawie (121 °C, 15 min).

4.2.9 Trypticasein Soy LAB-AGAR, Biomaxima

Przygotowywano zgodnie z instrukcją producenta, sterylizowano w autoklawie (121 °C, 15 min) i rozlewano na płytki.

4.2.10 CHROMagar Campylobacter, CHROMagar

CHROMagar Campylobacter (CHROMagar) przygotowywano zgodnie z instrukcją producenta. Pożywkę sterylizowano w autoklawie (121 °C, 15 min), następnie chłodzono do 50°C, dodawano suplement zawarty w zestawie i rozlewano na płytki.

4.2.11 Podłoże do mrożenia

Podłoże do mrożenia przygotowywano samodzielnie na bazie Mueller Hinton Broth (Biomaxima) z dodatkiem 15% glicerolu (Alchem, cz.d.a.). Mieszaninę sterylizowano w autoklawie (121 °C, 15 min).

4.2.12 Enrichment Broth, Biomaxima

Przygotowywano zgodnie z instrukcją producenta, sterylizowano w autoklawie (121 °C, 15 min).

4.3 Roztwory i bufony

4.3.1 Bufor do liofilizacji

Trypticasein Soy Broth (TSB, Biomaxima) z dodatkiem 10% trehalozy (Alchem) i 5% albuminy surowicy bydlęcej (Bovine Serum Albumin, BSA; VWR). Pożywkę z trehalozą sterylizowano w autoklawie (121 °C, 15 min), a po schłodzeniu dodawano przefiltrowany przez filtr o średnicy porów 0,22 µm roztwór BSA, do końcowego stężenia 5%.

4.3.2 Woda do PCR, A&A Biotechnology

4.3.3 Formaldehyd (formalina buforowana r-r 10% formaliny), Chempur

4.3.4 Roztwór soli fizjologicznej

Roztwór soli fizjologicznej (0,85% NaCl; Chempur) przygotowywano w wodzie dejonizowanej i sterylizowano w autoklawie (121 °C, 15 min).

4.3.5 Roztwór soli fizjologicznej z formaldehydem

Roztwór soli fizjologicznej (0,85% NaCl) z dodatkiem 10% buforowanej formaliny (Chempur) przygotowywano w wodzie dejonizowanej i sterylizowano przez filtrację przez membranę PES o średnicy porów 0,22 µm.

4.3.6 Bufor fosforanowo-solny (PBS)

Bufor PBS przygotowywano w postaci 10× stężonego roztworu ze składników w jakości cz.d.a (NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄; Chempur) w wodzie dejonizowanej. Skład końcowy buforu 10×: 1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄, 18 mM KH₂PO₄. Roztwór sterylizowano przez filtrację przez membranę celulozową o średnicy porów 0,22 µm, a następnie przechowywano w warunkach chłodniczych. Przed użyciem rozcieńczano do stężenia roboczego (1×), pH 7,4.

4.3.7 Tiomersal

Roztwór tiomersalu (1%) przygotowywano z odczynnika w proszku (Pol-Aura) w wodzie dejonizowanej. Gotowy roztwór sterylizowano przez filtrację przez membranę celulozową o średnicy porów 0,22 µm.

4.3.8 Bufor saponinowy

Bufor saponinowy przygotowywano bezpośrednio przed użyciem w buforze PBS (4.3.6), z dodatkiem 2% saponiny (Pol-Aura), 0,1% albuminy surowicy bydlęcej (Bovine Serum Albumin, BSA; VWR) oraz inhibitora proteaz (1× PIC, Sigma-Aldrich). Roztwór sterylizowano przez filtrację przez membranę PES o średnicy porów 0,22 µm.

4.4 Gotowe zestawy odczynników

- 4.4.1 API Campy (bioMérieux)
- 4.4.2 Genomic Mini AX Bacteria Kit (A&A Biotechnology)
- 4.4.3 PCR Mix Plus Green 2× (A&A Biotechnology)
- 4.4.4 Chicken IL-1 β ELISA Kit (Genorise)
- 4.4.5 Chicken IL-10 ELISA Kit (Genorise)
- 4.4.6 Chicken IL-8 ELISA Kit (Genorise)

4.5 Adjuwanty do immunizacji

- 4.5.1 Imject Freund's Incomplete Adjuvant (FIA) (Thermo Scientific)
- 4.5.2 Imject Freund's Complete Adjuvant (FCA) (Thermo Scientific)
- 4.5.3 Montanide ISA 71 VG (Seppic)

4.6 Odczynniki i materiały do izolacji przeciwciał IgY z żółtek jaj kurzych

- 4.6.1 Węgiel aktywny (Chempur)
- 4.6.2 Bibuła filtracyjna (Whatman)
- 4.6.3 Chlorek sodu cz.d.a. (Chempur)
- 4.6.4 Siarczan amonu cz.d.a. (Chempur)
- 4.6.5 Filtry strzykawkowe 0,22 μ m (Puradisc, Whatman)
- 4.6.6 PEG 6000 (Pol-Aura)
- 4.6.7 Rury dializacyjne Membra-Cel (Viskase, MWCO 14 000 Da)
- 4.6.8 Filtry strzykawkowe PES 0,45 μ m (Puradisc, Whatman)
- 4.6.9 Złoże tiofilowe – kolumna HiTrap IgY Purification HP (Cytiva)
- 4.6.10 Bufor wiążący

Bufor wiążący przygotowano bezpośrednio przed użyciem w wodzie dejonizowanej. Zawierał 0,5 M siarczanu amonu (Chempur) i 20 mM Tris-HCl (Chempur), pH 7,5. Roztwór sterylizowano przez filtrację przez membranę PES o średnicy porów 0,22 μ m.

4.6.11 Bufor elucyjny

Bufor elucyjny przygotowano bezpośrednio przed użyciem w wodzie dejonizowanej, zawierał 20 mM Tris-HCl (Chempur), pH 7,5. Sterylizowano przez filtrację przez membranę PES o średnicy porów 0,22 μ m.

4.6.12 Roztwór do regeneracji kolumny

Roztwór do regeneracji kolumny przygotowano bezpośrednio przed użyciem jako 0,1 M roztwór NaOH (Chempur) w wodzie dejonizowanej. Sterylizowano przez filtrację przez membranę PES o średnicy porów 0,22 μ m.

4.7 Odczynniki do SDS-PAGE

4.7.1 Żel poliakrylamidowy 12%

Żele rozdzielające (12%) oraz zagęszczające (4%) przygotowano każdorazowo bezpośrednio przed elektroforezą, bez przechowywania. Składniki wykorzystywane do przygotowania żeli obejmowały:

- 30% roztwór akrylamidu/bisakrylamidu (29:1) – Pol-Aura

- Tris-HCl, pH 8,8 i pH 6,8 – roztwory przygotowywano samodzielnie z odczynnika (Chempur), doprowadzając do pożądanego pH (4.9.11, 4.9.12), sterylizowano przez filtrację przez membranę celulozową (0,22 µm)
- SDS 10% – roztwór przygotowywano samodzielnie z odczynnika (Pol-Aura), sterylizowano przez filtrację przez membranę celulozową (0,22 µm)
- APS 10% (ang. ammonium persulfate) – przygotowywano z siarczanu amonu (Chempur), sterylizowano przez filtrację przez membranę celulozową (0,22 µm), przechowywano w alikwotach w -20 °C i rozmrażano bezpośrednio przed użyciem
- TEMED – Thermo Scientific
- Woda dejonizowana

4.7.2 Bufor elektroforetyczny (Tris–Glicyna–SDS)

Bufor do elektroforezy białek przygotowywano w stężeniu 10× ze składników w jakości cz.d.a (Tris, glicyna; Chempur, SDS; Pol-Aura) w wodzie dejonizowanej. Skład końcowy buforu 10×: 250 mM Tris, 1,92 M glicyna, 1% SDS. Przed użyciem rozcieńczano do stężenia roboczego (1×).

4.7.3 Bufor obciążający Laemmli (Sigma-Aldrich)

4.7.4 Marker masowy Protein Ladder EXTENDED 5–245 kDa (Geneon)

4.7.5 Wzorzec IgY Gallus 20 mg/ml (Gallus Immunotech)

4.8 Odczynniki do testów ELISA

4.8.1 Roztwór opłaszczający

Roztwór buforu węglanowego (pH 9,6) przygotowywano bezpośrednio przed użyciem. W tym celu łączono wcześniej przygotowane i przefiltrowane przez membranę celulozową (0,22 µm) roztwory: 0,05 M węglanu sodu (Na₂CO₃; Chempur) i 0,05 M wodorowęglanu sodu (NaHCO₃; Chempur), w proporcji 16 ml do 34 ml na każde 50 ml końcowego buforu. pH roztworu kontrolowano (4.9.11) i w razie potrzeby korygowano do wartości 9,6. Roztwór przechowywano w temperaturze pokojowej do momentu użycia.

4.8.2 Roztwór płuczący

Roztwór płuczący przygotowywano przez rozcieńczenie buforu PBS 10× (4.3.6) do stężenia roboczego (1×), a następnie dodanie Tween-20 (Sigma-Aldrich) do końcowego stężenia 0,05%.

4.8.3 Roztwór blokujący

Bufor blokujący przygotowywano przez rozpuszczenie 5% odtłuszczonego mleka spożywczego w roztworze PBST (1× PBS z 0,1% Tween-20). Używano mleka w proszku ogólnodostępnego (marka spożywcza), sprawdzonego do tego typu zastosowań laboratoryjnych.

4.8.4 Koniugat

Koniugat przeciwciał anti-IgY sprzężonych z peroksydazą chrzanową (HRP) (Jackson ImmunoResearch) przygotowywano zgodnie z zaleceniami producenta, rozcieńczając w buforze blokującym (5% mleko, 0,1% Tween-20 w PBS).

4.8.5 Roztwór wywołujący

Do detekcji używano tabletek OPD (Sigma-Aldrich), przygotowywanych zgodnie z protokołem producenta bezpośrednio przed użyciem.

4.8.6 Roztwór hamujący

Roztwór 3 M kwasu siarkowego przygotowywano bezpośrednio przed użyciem poprzez rozcieńczenie stężonego kwasu siarkowego (≥95%, Chempur) wodą dejonizowaną.

4.9 Urządzenia

- 4.9.1 Komora z laminarnym przepływem powietrza (SafeFast Premium 215, SafeFast)
- 4.9.2 Inkubator CO₂/N₂ (MCO-170MUV, PHCbi)
- 4.9.3 Mieszadło typu kołyska (DRS-12, Elmi)
- 4.9.4 Mikroskop z kontrastem fazowym (Primo Star, Zeiss)
- 4.9.5 Densytometr (DEN-1B, Biosan)
- 4.9.6 Liofilizator (Alpha 1-2 LDplus, Martin Christ)
- 4.9.7 Termocykler (Labcycler, Sensoquest)
- 4.9.8 Bioreaktor szklany 2L z kontrolerem parametrów EzControl (Applikon Bio)
Wyposażony w sondę pH, sondę rozpuszczonego tlenu (DO), kontrolę gazów (CO₂ i N₂) oraz system automatycznej regulacji temperatury i mieszania.
- 4.9.9 Wirówka (model 6-16KS, Sigma)
- 4.9.10 Vortex (ZX3, Fisherbrand)
- 4.9.11 pH-metr (Edge, Hanna Instruments)
- 4.9.12 Mieszadło magnetyczne (C-MAG MS 4, IKA)
- 4.9.13 System ultrafiltracji z kasetą PES 100 kDa (Sartoflow Advanced, Sartorius Stedim Systems GmbH)
- 4.9.14 Mieszadło rolkowe (Roller Mixer, Thermo Fisher)
- 4.9.15 System chromatograficzny (BioLogic LP z kolektorem frakcji Model 2110, Bio-Rad)
- 4.9.16 Aparat do elektroforezy pionowej (Biokom)
- 4.9.17 Termomikser (Thermomixer, Eppendorf)
- 4.9.18 Automatyczny aparat do posiewów powierzchniowych (EasySpiral Pro, Interscience)
- 4.9.19 Licznik kolonii (Scan500, Interscience)
- 4.9.20 Automatyczna płuczka do płytek 96-dołkowych (LT-3500 Microplate Washer, Labtech)
- 4.9.21 Spektrofotometr z czytnikiem mikropłytek (Multiskan SkyHigh, Thermo Fisher)
- 4.9.22 Wirówka (Rotina 380R, Hettich)
- 4.9.23 Zamrażarka niskotemperaturowa do -80 °C (Innova U101, New Brunswick)
- 4.9.24 Mikrowirówka (MIKRO 185, Hettich)
- 4.9.25 Homogenizator Ultra-Turrax T25 z końcówką S25N-18G (IKA)

5 Metody

5.1 Metody prac ze szczepami *C. jejuni*

5.1.1 Warunki hodowli

Hodowlę bakterii *Campylobacter jejuni* prowadzono w warunkach mikroaerofilnych, z zastosowaniem standardowych procedur zgodnych z zaleceniami ISO 10272-1:2017, obejmujących użycie wybiórczych podłoży (CCDA, CHROMagar) oraz inkubację w 42 °C przez 48 h⁷⁴.

Wszystkie posiewy szczepów *Campylobacter jejuni* oraz próby środowiskowe potencjalnie zawierające te bakterie wykonywano w komorze z laminarnym przepływem powietrza (**Błąd! Nie można odnaleźć źródła odwołania.**) oraz inkubowano w trójgazowym inkubatorze (4.9.1) zapewniającym warunki mikroaerofilne, tj. 85% N₂, 10% CO₂, 5% O₂. Posiewy inkubowano przez 48 h ± 2 h w 42 °C ± 0,5 °C, a dodatkowo posiewy w podłożach płynnych umieszczano na mieszadle typu kołyska (4.9.2) umieszczonym w inkubatorze w celu stałego mieszania hodowli.

Jeśli nie zaznaczono inaczej, określenie „inkubowano” oznacza warunki opisane w niniejszym akapicie.

5.1.2 Izolacja bakterii *C. jejuni* z prób środowiskowych

Izolację szczepów *Campylobacter jejuni* prowadzono przy użyciu standardowych procedur hodowli mikroaerofilnej na podłożach wybiórczych, zgodnie z zaleceniami zawartymi w metaanalizie porównującej metody izolacji *C. jejuni* w próbkach pochodzących od kurcząt^{74,75}.

Szczepy terenowe oznaczone jako CJ5, CJ6, CJ8, CJ9 oraz CJ10 wyizolowano z materiału pobranego na fermach drobiu zlokalizowanych w okolicach Kępna (CJ5), Ostrzeszowa (CJ6 i CJ8), Szczecina (CJ10 – od kur z objawami biegunki) oraz z partii brojlerów importowanych z Niemiec (CJ9). Pobrano łącznie 87 wymazów z kloaki za pomocą jałowych wymazówek. Każdą wymazówkę umieszczono w podłożu transportowym Amiesa (4.2.1) i przetransportowano do laboratorium w temp. 2-8 °C. Nie później niż 5 h od pobrania wymazówki z materiałem zostały umieszczone w pożywce BHI (4.2.2) i inkubowane. Z uzyskanych hodowli wykonano posiew redukcyjny na podłoże różnicujące CCDA (4.2.3) i ponownie inkubowano. Pojedyncze kolonie przesiewano na podłoże Brilliance Campy (4.2.4) i chromAGAR *Campylobacter* (4.2.10) w celach diagnostycznych oraz na CCDA (4.2.3) w celu wytworzenia odpowiedniej ilości masy bakteryjnej do dalszych analiz i inkubowano.

5.1.3 Obserwacje mikroskopowe

W celu potwierdzenia morfologii materiał bakteryjny z podłoży stałych oraz płynnych obserwowano w mikroskopie świetlnym z kontrastem fazowym (4.9.4). Obserwacje prowadzono w powiększeniu 1000× oraz z użyciem przesłony kontrastu fazowego. Kontrolowano wizualnie każdą prowadzoną hodowlę płynną bakterii *C. jejuni*. Obserwacje prowadzono zgodnie z zaleceniami dla podstawowej mikroskopii fazowo-kontrastowej w diagnostyce mikrobiologicznej.

5.1.4 Przechowywanie szczepów

Przechowywanie próbek odbywało się zgodnie z rutynową praktyką diagnostyczną oraz wewnętrznymi procedurami obowiązującymi w laboratorium firmy Immunolab. Procedury te są powszechnie stosowane w mikrobiologii klinicznej i badaniach nad drobnoustrojami chorobotwórczymi, w szczególności w odniesieniu do patogenów klasy BSL-2, takich jak *Campylobacter jejuni*⁷⁶.

Szczepy *C. jejuni* przechowywano w formie zamrożonej w -80 °C oraz liofilizowanej w 2-8 °C. Materiał zbierano z powierzchni płytki CCDA za pomocą jałowej wymazówki i zawieszano odpowiednio w podłożu do mrożenia zawierającym glicerol (4.2.11) lub buforze do liofilizacji (4.3.1) do uzyskania gęstości 6 McFarlanda mierzonej za pomocą densytometru (4.9.5). Przygotowaną zawiesinę porcjowano odpowiednio do krioprobówek i mrożono w -80 °C, lub do naczyń do liofilizacji i liofilizowano (4.9.6), naczynia zamykano próżniowo po zakończeniu procesu.

5.1.5 Analiza serologiczna

Metoda aglutynacji lateksowej jest powszechnie stosowana jako rutynowe narzędzie diagnostyczne do potwierdzania obecności bakterii z rodzaju *Campylobacter*, w tym *C. jejuni*⁷⁷.

Badanie przeprowadzono zestawem komercyjnym (Microgen *Campylobacter*) zawierającym test lateksowy do identyfikacji bakterii z rodzaju *Campylobacter*. Test wykonano zgodnie z instrukcją producenta zestawu, zawierającego zarówno test kontrolny negatywny, jak i pozytywny. Każdy szczep badano w dwóch powtórzeniach biologicznych.

5.1.6 Analiza genetyczna – reakcje PCR z wykazem starterów

Do identyfikacji molekularnej szczepów zastosowano reakcje PCR, wykorzystując zestawy starterów i warunki reakcji opisane w literaturze, zalecane w rutynowej diagnostyce i badaniach mikrobiologicznych (odnośniki w Tabeli 3.)

DNA izolowano za pomocą zestawu komercyjnego (4.4.2), zgodnie z instrukcją producenta wykorzystując zawieszinę namnożoną w bulionie MH (4.2.6) w warunkach mikroaerofilnych przez 24h. Mieszaninę reakcyjną przygotowano przy użyciu komercyjnie dostępnej mieszaniny (4.4.3), zawierającej polimerazę Taq (0,1 U/μl), MgCl₂ (4 mM), dNTP (0,5 mM każdy), niebieski i żółty barwnik oraz bufor obciążający. Do reakcji dodawano 0,4 μM starterów sensownych (forward) i antysensownych (reverse), 0,1 μg wyizolowanego DNA oraz uzupełniano do objętości 25 μl sterylną wodą do PCR (4.3.2). Reakcję PCR przeprowadzano w aparacie do reakcji PCR (4.9.7) zgodnie z warunkami przedstawionymi w Tabeli 3.

Gen	Sekwencja 5'-3' (F – forward, R – reverse)	Wielkość amplikonu	Liczba cykli	Denaturacja	Przyłączanie	Elongacja	Lit.
16S rRNA	F: ATCTAATGGCTTAACCATTAAAC R: GGACGGTAAGTAGTTAGTATT	857 bp	35	30 s, 95 °C	1 m 30 s, 59 °C	1 m, 72 °C	39
<i>flaA</i>	F: GGATTTCTGATTAACACAAATGGTGC R: CTGTAGTAATCTTAAACATTTTG	1728 bp	35	30 s, 92 °C	1 m 30 s	2 m 30 s, 72 °C	78
<i>flaA/flaB</i>	F: CTTGAGGGATGGCGATAGCAGATA R: TTGATCTCTTCAGCCAAAGCTCCAAGT	533 bp	40	1 m, 94 °C	1 m, 60 °C	2 m, 72 °C	79
<i>flaC</i>	F: TAATACGACTCACTATAGGGAT GATGATCTCTGATGCAACTATGA R: AAAGCAGCAGCATTTTCTTTAGAT	712 bp	35	30 s, 95 °C	1 m, 50 °C	1 m, 72 °C	80
<i>cdtA</i>	F: CCTTGTGATGCAAGCAATC R: AACTCCATTGCTTTCTG	370 bp	30	1 m, 94 °C	1 m, 49 °C	1 m, 72 °C	81
<i>cdtB</i>	F: CAGAAAGCAAATGGAGTGTT R: AGCTAAAAGCGGTGGAGTAT	620 bp	30	1 m, 94 °C	1 m, 51 °C	1 m, 72 °C	81
<i>cdtC</i>	F: CGATGAGTTAAACAAAAGATA R: TTGGCATTATAGAAAATACAGTT	182 bp	30	1 m, 94 °C	1 m, 47 °C	1 m, 72 °C	81
<i>cadF</i>	F: TTGAAGGTAATTTAGATATG R: CTAATACCTAAAGTTGAAAC	400 bp	35	30 s, 95 °C	1 m, 45 °C	1 m, 72 °C	81
<i>ciaB</i>	F: TTTCCAAATTTAGATGATGC R: GTTCTTTAAATTTTTCATAATGC	1165 bp	35	30 s, 95 °C	1 m, 45 °C	1 m, 72 °C	82
<i>flgR</i>	F: GAGCGTTTAGAATGGGTGTG R: GCCAGGAATTGATGGCATAG	390 bp	35	30 s, 94 °C	30 s, 60 °C	30 s, 68 °C	83

Tabela 3. Sekwencje starterów, produkty PCR oraz warunki reakcji dla wybranych genów *Campylobacter jejuni*.

5.1.7 Analiza biochemiczna

Materiał bakteryjny poddano analizie za pomocą zestawu komercyjnego (4.4.1). Test przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta. Przeprowadzono dwa powtórzenia biologiczne dla każdego badanego szczepu.

5.1.8 Testy ruchliwości

Do oceny ruchliwości szczepów *C. jejuni* wybrano test z użyciem półpłynnego agaru, który pozwala na różnicowanie szczepów na podstawie ich aktywności ruchowej i jest szeroko stosowany w mikrobiologii eksperymentalnej⁸⁴.

Ruchliwość szczepów *C. jejuni* oceniano na podłożu MH o zredukowanym stężeniu agaru (0,8%) umożliwiającym ruch. Inokulacji dokonywano punktowo poprzez naniesienie zawiesiny z hodowli płynnej na środek powierzchni płytki. Płytki inkubowano przez 48 h w 42 °C, w warunkach mikroaerofilnych. Dla każdego szczepu przeprowadzono trzy powtórzenia techniczne.

Po inkubacji oceniano zdolność migracji bakterii na powierzchni półstałego agaru. Ocenę prowadzono wizualnie, w sposób półilościowy, przypisując jeden z czterech stopni ruchliwości:

- „brak” – brak widocznej migracji bakterii poza miejsce inokulacji,
- „+” – niska ruchliwość (wzrost obejmujący do 1/3 powierzchni płytki),
- „++” – umiarkowana ruchliwość (od 1/3 do 2/3 średnicy płytki),
- „+++” – wysoka ruchliwość (wzrost obejmujący ponad 2/3 płytki).

5.1.9 Określenie krzywej wzorcowej i miareczkowanie (zależność McF/CFU)

W celu określenia liczby żywych komórek bakteryjnych w przeliczeniu na jednostki McFarlanda, zastosowano podejście oparte na posiewach ilościowych i analizie wzrostu kolonii, zgodnie z zaleceniami dotyczącymi standaryzacji inokulum⁸⁵. Metodę zmodyfikowano poprzez zastosowanie spiralnych posiewów przy użyciu urządzenia EasySpiral Pro (4.9.18), co pozwoliło na precyzyjne nanoszenie próbki i uzyskanie danych ilościowych przy mniejszym nakładzie pracy⁸⁶.

Zamrożony materiał bakteryjny wysiewano na podłożu CCDA i inkubowano w warunkach mikroaerofilnych. Po inkubacji materiał z powierzchni agaru zbierano przy użyciu sterylnej wymazówki i zawieszano w 600 ml bulionu MH (4.2.6), po czym hodowle dalej inkubowano.

Pomiary zmętnienia prowadzono po 4, 8, 24, 30 oraz 48 h inkubacji. Z każdej hodowli pobierano 2 ml zawiesiny (po uprzednim dokładnym wymieszaniu) i dokonywano pomiaru jednostek McFarlanda przy użyciu densytometru (pkt 4.9.5).

Dodatkowo, po 24, 30 oraz 48 h hodowli, pobierano po 40 ml zawiesiny w celu oznaczenia liczby jednostek tworzących kolonie (CFU). Próbkę odwirowywano (5200 × g, 15 min, temp. pokojowa) w wirówce laboratoryjnej (pkt 4.9.9). Uzyskany osad ważono, a następnie zawieszano w 0,85% roztworze NaCl w stosunku 1:9 w celu uzyskania rozcieńczenia 10^{-1} . Prowadzono dalsze seryjne rozcieńczenia, 200 µl każdej zawiesiny przenoszono do 1,8 ml 0,85% NaCl, po czym każdą próbkę dokładnie mieszano za pomocą mieszadła wstrząsowego typu vortex (4.9.10). Proces powtarzano do uzyskania rozcieńczenia 10^{-10} .

Z rozcieńczeń 10^{-6} do 10^{-10} wykonywano posiewy po 100 µl w trzech powtórzeniach technicznych na podłożu chromogenne dedykowane *Campylobacter* (4.2.10). Posiewy wykonywano metodą rozproszania zawiesiny po całej powierzchni podłoża przy użyciu urządzenia do posiewu spiralnego (4.9.18). Płytki inkubowano w warunkach mikroaerofilnych, a następnie liczono kolonie przy użyciu automatycznego licznika kolonii Scan 500 (4.9.19).

5.1.10 Przygotowanie antygenów oraz preparatów do immunizacji kur

Schemat doświadczenia *in vivo* opracowano we współpracy z jednostką prowadzącą badania doświadczalne na drobiu, w oparciu o dostępne dane literaturowe oraz wcześniejsze doświadczenia w pracy z *Campylobacter jejuni*^{15,87,88}.

Zamrożony szczep *C. jejuni* CJ5 oraz CJ6 wysiewano na podłożu CCDA i inkubowano. Materiał zbierano z powierzchni płytek za pomocą sterylnej wymazówki i zawieszono w bulionie MH (4.2.6). Bioreaktor szklany (4.9.8) wypełniony bulionem MH zaszczerpiano zawiesiną w stosunku 1:100 i hodowano przez 24 h w 42 °C, przy 250 obr/min w warunkach mikroaerofilnych. Bakterie inaktywowano za pomocą

buforowanego formaldehydu (4.3.3) o pH 8,0 w końcowym stężeniu 0,5%. Zawiesiny przenoszono do sterylnych kolb, dodawano formaldehyd, a następnie kolby szczelnie zamykano gumowymi korkami i inkubowano przez 24 h w 37 °C przy 150 obr/min. Bakterie odzyskiwano przez odwirowanie w wirówce (4.9.9) przez 20 min, 5000 × g, po czym uzyskany osad zawieszano w sterylnym roztworze zawierającym chlorek sodu oraz formaldehyd (4.3.5). Skuteczność inaktywacji potwierdzano poprzez posiew zawiesiny do bulionu wzbogaconego (4.2.12) oraz TSB (4.2.8), a następnie inkubację przez 14 dni w 37 °C. Liczbę bakterii określano na podstawie pomiaru mętności przy użyciu densytometru (4.9.5). Przeliczenia mętności (wg skali McFarlanda) na liczbę CFU dokonano na podstawie eksperymentalnie wyznaczonej krzywej wzrostu (5.1.9).

Pierwszą dawkę immunizacyjną przygotowywano poprzez zmieszanie 3×10^9 CFU mieszaniny antygenów CJ5 i CJ6 (1:1) z adjuwantem kompletnym Freund (FCA; 4.5.1), natomiast kolejne dawki – z adjuwantem niekompletnym Freund (FIA; 4.5.2) w ilości 6×10^9 CFU. Objętość wszystkich dawek wynosiła 1 ml, w razie potrzeby objętość uzupełniano roztworem soli fizjologicznej (4.2.4). Emulsyfikację prowadzono w komorze laminarnej (4.9.1), zgodnie z wytycznymi producenta adjuwantu, z wykorzystaniem zalecanych strzykawek i igieł o odpowiedniej średnicy. Gotowe preparaty poddano testom sterylności poprzez posiew zawiesiny do bulionu wzbogaconego (4.2.12) oraz TSB (4.2.8), a następnie inkubację przez 14 dni w 37 °C.

5.1.11 Immunizacja kur

Procedurę immunizacji kur przeprowadzono zgodnie z rutynowo stosowanymi schematami opracowanymi na potrzeby pozyskiwania przeciwciał IgY o wysokim mianie. Protokół bazował na wielokrotnych iniekcjach antygeny zawieszonych w adjuwancie, z zastosowaniem iniekcji domięśniowych w odstępach dwutygodniowych, typowych dla procedur immunizacji ptaków^{64,89,90}.

25 kur rasy Leghorn (w wieku 4–6 tygodni) immunizowano mieszaniną inaktywowanych antygenów bakteryjnych szczepów CJ5 oraz CJ6 (stosunek mieszaniny 1:1). Immunizację prowadzono drogą iniekcji domięśniowej w odstępach dwutygodniowych. Podano cztery dawki po 1 ml każda: pierwsza dawka zawierała 3×10^9 CFU wraz z adjuwantem kompletnym Freund (4.5.1), natomiast kolejne trzy dawki zawierały 6×10^9 CFU z adjuwantem niekompletnym Freund (4.5.2). Jaja zbierano codziennie przez sześć tygodni po podaniu ostatniej dawki i przechowywano w temperaturze 4 °C do momentu izolacji przeciwciał. Izolację prowadzono nie później niż 2 tygodnie po zebraniu partii jaj.

Stan zdrowia wszystkich kur monitorowano przez cały okres trwania eksperymentu oraz po zakończeniu zbioru jaj. Kury, które nie zostały poddane eutanazji po zakończeniu badań, przekazano do lokalnego gospodarstwa w celu dalszej hodowli. Eksperymenty zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie na mocy uchwały nr 38/2021 z dnia 19 maja 2021 roku. Wszystkie procedury były zgodne z obowiązującymi wytycznymi i regulacjami etycznymi.

5.1.12 Przygotowanie szczepu do zakażenia w badaniu *in vivo*

Dawkę inokulum dobrano na podstawie danych literaturowych oraz wcześniejszych doświadczeń jednostki wykonującej badanie *in vivo*. Założono ilość 10^8 CFU na ptaka, co mieści się w zakresie stosowanym w podobnych modelach zakażenia *Campylobacter jejuni*^{15,91,92}.

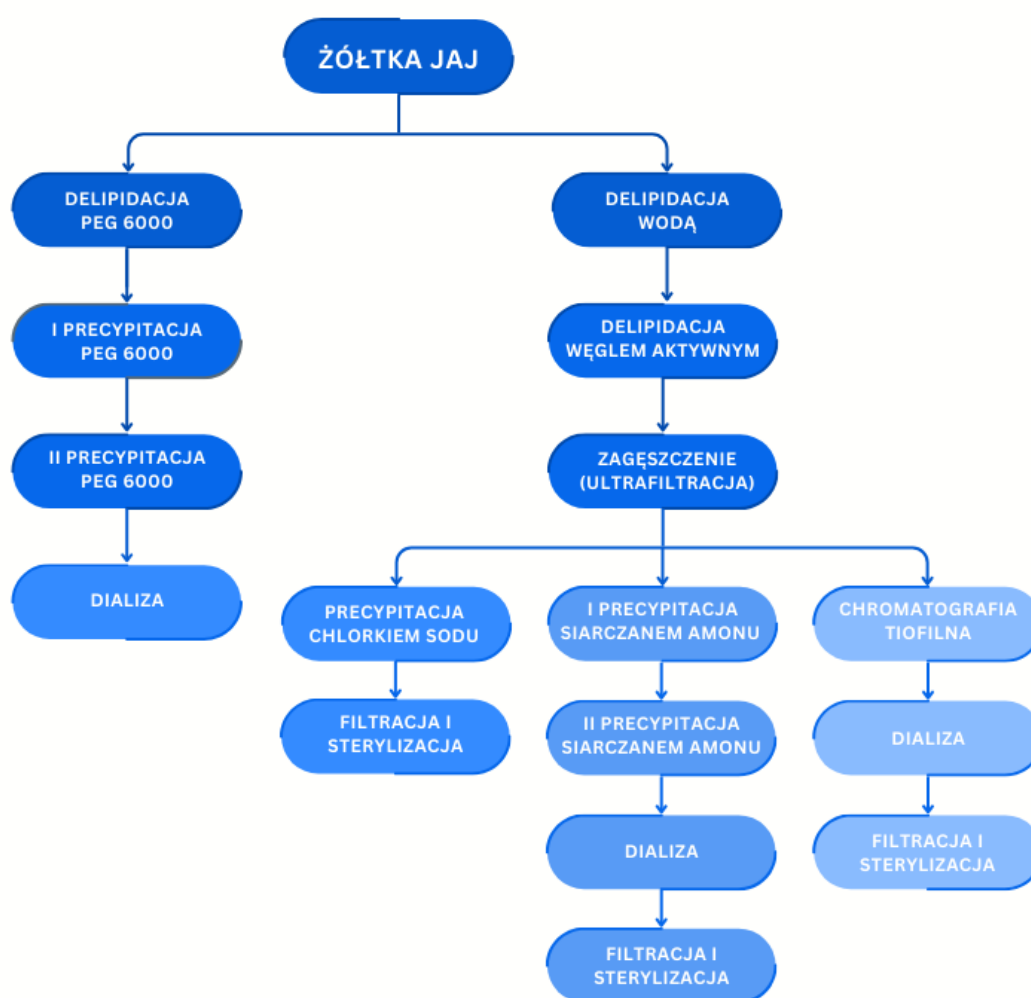
Do przygotowania materiału zakaźnego wykorzystano szczep *Campylobacter jejuni* CJ10. Wykonano posiew na murawę wykorzystując 15 płytek z podłożem selektywnym CCDA (4.2.3). Płytki umieszczono w inkubatorze (4.9.2) i hodowano przez 48 h w 42 °C. Po zakończonej inkubacji materiał bakteryjny zebrano za pomocą jałowych wymazówek. Zebrany materiał zawieszono w 10 ml buforu do liofilizacji (4.3.1). Zawiesinę rozdzielono po 1 ml do jałowych buteleczek przeznaczonych do liofilizacji. Próbkę poddano zamrożeniu w temperaturze –80 °C (4.9.24) przez 20 min, a następnie liofilizowano zgodnie z ustalonym programem (4.9.6). Po zakończeniu procesu próbki zamknięto próżniowo i przechowywano w temperaturze chłodniczej, do momentu użycia.

W celu weryfikacji przeżywalności i jakości przygotowanego inokulum, z dwóch buteleczek wykonano test ilościowy. Każdy liofilizat zawieszono w 1 ml jałowej wody, a następnie wykonano dziesięciokrotne seryjne rozcieńczenia w roztworze soli fizjologicznej (4.3.4). Z każdego rozcieńczenia posiewano po 0,1 ml zawiesiny na płytki CCDA w trzech powtórzeniach technicznych, wykorzystując urządzenie do posiewu spiralnego (4.9.18). Płytki inkubowano przez 48 h w warunkach mikroaerofilnych (42 °C), a następnie zliczano kolonie za pomocą automatycznego licznika kolonii (4.9.19).

Liofilizowane bakterie zostały uwodnione bezpośrednio przed podaniem zwierzętom, a następnie rozcieńczone do odpowiedniego stężenia zakażającego na podstawie uzyskanych wyników przeżywalności po liofilizacji.

5.2 Metody związane z izolacją przeciwciał IgY z żółtek jaj

Zestawienie głównych etapów metod izolacji przeciwciał IgY zastosowanych w badaniu przedstawiono na Ryc. 6.



Rycina 6. Schemat ogólny izolacji przeciwciał IgY z żółtek jaj immunizowanych kur.

5.2.1 Metoda wodna z precypitacją chlorkiem sodu lub siarczanem amonu

Przeciwciała IgY izolowano z żółtek jaj przy użyciu zmodyfikowanej metody rozcieńczania wodą z precypitacją chlorkiem sodu^{67,68,93} lub siarczanem amonu opracowanym na podstawie danych literaturowych^{94,95}.

Żółtka jaj rozcieńczano (1:10) wodą destylowaną, następnie dostosowywano pH do wartości 5,0 za pomocą pH-metru (4.9.11) i przechowywano przez noc w 4 °C na mieszadle magnetycznym (4.9.12). Po odwirowaniu

na wirówce (4.9.9), $11\ 000 \times g$ przez 30 min w 4 °C, pobierano frakcję WSF a osad odrzucano. WSF mieszano z węglem aktywnym (4.6.1) do uzyskania końcowego stężenia 0,01%, inkubowano przez 30 min w temp. pokojowej, a następnie wirowano ($11\ 000 \times g$, 30 min, 4 °C). WSF filtrowano przez bibułę filtracyjną (4.6.2) a osad odrzucono. Frakcję WSF zagęszczano przy użyciu automatycznego systemu ultrafiltracji (4.9.13) wyposażonego w dedykowaną kasetę o porowatości 100 kDa.

W celu precypitacji przeciwciał IgY do uzyskanej frakcji dodawano: chlorek sodu (4.6.3) lub siarczan amonu (4.6.4) do uzyskania końcowego stężenia odpowiednio 1,5M (dla NaCl) lub 35% (w/v) dla $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$. Zawiesinę inkubowano przez 2 h w temp. pokojowej z mieszaniem na mieszadle magnetycznym. Mieszanie odwirowywano ($14\ 000 \times g$, 20 min, 4 °C), a następnie osad zawieszano w soli fizjologicznej (4.3.4) w połowie wyjściowej objętości żółtka, z którego prowadzono izolację.

Preparaty przeciwciał, uzyskane w wyniku precypitacji siarczanem amonu, poddawano dializie wobec roztworu soli fizjologicznej (0,85% NaCl) z wykorzystaniem membrany o progu odcięcia 14 kDa (4.6.7), po czym korygowano pH do wartości 7,4. Uzyskane 2× stężone względem żółtka przeciwciała IgY filtrowano dwukrotnie przez filtry strzykawkowe (4.6.5) o wielkości porów 0,22 μm , dodawano tiomersal (4.3.7) do uzyskania końcowego stężenia 0,01% i przechowywano w 4 °C.

5.2.2 Metoda z glikolem polietylenowym PEG 6000

Izolację przeciwciał IgY z wykorzystaniem ekstrakcji glikolem polietylenowym przeprowadzono według metody opublikowanej przez Polson i wsp. (1985), z modyfikacjami zgodnymi z późniejszymi opracowaniami^{93,96–98}.

Żółtko jaja rozcieńczano w stosunku 1:2 w buforze PBS (4.3.6), a następnie dodawano sproszkowany PEG 6000 (4.6.6) do końcowego stężenia 3,5% (w/v). Po mieszaniu 20 min w temp. pokojowej z użyciem mieszadła obrotowo-rolkowego (4.9.14) próbki poddawano wirowaniu ($13\ 000 \times g$, 20 min, 4 °C). Uzyskaną frakcję rozpuszczalną w wodzie zbierano i filtrowano przy użyciu bibuły filtracyjnej (4.6.2) a osad odrzucano. Do frakcji WSF dodawano PEG 6000 do uzyskania końcowego stężenia 12% (w/v), a następnie prowadzono inkubację z mieszaniem 20 min w temp. pokojowej. Strącony osad oddzielano poprzez wirowanie ($10\ 000 \times g$, 20 min, 4 °C), a następnie zawieszano w buforze PBS w objętości odpowiadającej początkowej objętości żółtka. Dla lepszej czystości i koncentracji precypitację powtórzono dwukrotnie. Uzyskany osad zawieszano w soli fizjologicznej (4.3.4). Oczyszczone przeciwciała poddawano dializie wobec 0,85% NaCl przy użyciu membrany o porowatości 14 kDa (4.6.7), a następnie dostosowywano pH do wartości 7,4. Uzyskane przeciwciała IgY filtrowano dwukrotnie przez filtry strzykawkowe (4.6.5) o wielkości porów 0,22 μm , dodawano tiomersal (4.3.7) do uzyskania końcowego stężenia 0,01% i przechowywano w 4 °C.

5.2.3 Oczyszczanie chromatograficzne (Tgel)

Oczyszczanie immunoglobulin IgY przeprowadzono z wykorzystaniem kolumny HiTrap IgY Purification HP (4.6.9), opierając się na procedurze opracowanej przez producenta z zastosowaniem żywicy selektywnie wiążącej frakcję IgY⁹⁹.

Oczyszczanie chromatograficzne prowadzono dla części prób dla których przeprowadzono delipidację metodą wodną z użyciem węgla aktywnego (5.2.1) do momentu precypitacji. Do przeprowadzenia metody używano chromatografu (4.9.15), a właściwą separację IgY przeprowadzano na kolumnie chromatograficznej ze złożem tiofilowym (4.6.9). Złoże kondycjonowano przez przepłukanie pięcioma objętościami buforu wiążącego (4.6.10) z przepływem 4 ml/min. Następnie nanoszono próbkę (2 ml/min) i przemywano kolumnę ponownie pięcioma objętościami buforu wiążącego. IgY eluowano za pomocą buforu elucyjnego (4.6.11), przy czym objętość frakcji eluatu odpowiadała pierwotnej objętości żółtka. Po zakończeniu procedury kolumnę regenerowano odpowiednim roztworem (4.6.12).

Oczyszczone przeciwciała poddawano dializie wobec 0,85% NaCl przy użyciu membrany o porowatości 14 kDa (4.6.7), a następnie dostosowywano pH do wartości 7,4. Uzyskane przeciwciała IgY filtrowano

dwukrotnie przez filtry strzykawkowe (4.6.5) o wielkości porów 0,22 μm , dodawano tiomersal (4.3.7) do uzyskania końcowego stężenia 0,01% i przechowywano w 4 °C.

5.3 Metody analizy izolowanych przeciwciał

5.3.1 SDS-PAGE

Rozdział białek metodą SDS-PAGE przeprowadzano zgodnie z powszechnie stosowaną procedurą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym z dodecylosiarczanem sodu (SDS-PAGE), szeroko wykorzystywaną do analizy białek, w tym immunoglobulin IgY¹⁰⁰.

Oczyszczone przeciwciała IgY analizowano metodą elektroforezy w 12% żelu poliakryloamidowym (4.7.1) w warunkach redukujących za pomocą zestawu z zasilaczem (4.9.16). Elektroforezę przeprowadzano dwuetapowo w buforze (4.7.2): w pierwszym etapie napięcie wynosiło 100 V przez 20 min, a następnie zwiększano je do 160 V i prowadzono elektroforezę przez kolejne 60 min. Przed elektroforezą próbki rozcieńczano w buforze obciążającym (4.7.3) i ogrzewano w termomikserze (4.9.17) w 100 °C przez 5 min. Następnie do studzienek żelu nanoszono po 25 μl próbki oraz 5 μl markera mas cząsteczkowych (4.7.4). Jako pozytywną kontrolę stosowano oczyszczony metodą chromatograficzną standard przeciwciał IgY kurzych (4.7.5) o stężeniu 20 mg/ml.

5.3.2 Aglutynacja próbkowa

Aglutynację próbkową przeprowadzono zgodnie z wewnętrzną procedurą stosowaną przez Immunolab od ponad 25 lat. Metoda ta opiera się na ugruntowanych zasadach klasycznej aglutynacji płynnej i znajduje zastosowanie w diagnostyce mikrobiologicznej, gdzie aglutynacja próbkowa przedstawiana jest jako jedna z podstawowych technik serologicznych stosowanych w laboratorium klinicznym¹⁰¹.

Analizę wykonywano w celu określenia miana izolowanych przeciwciał i prowadzono w probówkach szklanych z zaokrąglonym dnem. Izolowane IgY poddawano dwukrotnym rozcieńczeniom seryjnym (od 1:10 do 1:1280), a następnie mieszano je z inaktywowanym antygenem (mieszanina CJ5 i CJ6 w stosunku 1:1) w końcowym stężeniu odpowiadającym gęstości optycznej 2 w skali McFarlanda, określonym za pomocą densytometru (4.9.5). Mieszaniny po zamieszaniu inkubowano przez noc w 37 °C. Miano przeciwciał definiowano jako największe rozcieńczenie, przy którym obserwowano widoczną gołym okiem aglutynację. Aglutynację określano w 6 stopniowej skali (0-5), która uwzględnia zarówno przejrzystość supernatantu, jak i charakter osadu po wstrząśnięciu próbki – od całkowitego braku aglutynacji (0) po silne reakcje z wyraźnym, grudkowatym osadem unoszącym się w klarownym supernatancie (5).

5.3.3 Pomiar stężenia przeciwciał IgY metodą spektrofotometryczną.

Stężenie przeciwciał IgY oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali 280 nm, zgodnie z metodą powszechnie stosowaną do szacowania stężenia białek osocza, w tym immunoglobulin, opisaną w literaturze¹⁰².

Stężenie IgY określano na podstawie pomiaru absorbancji przy długości fali 280 nm, z wykorzystaniem czytnika spektrofotometrycznego (4.9.21). Obliczeń dokonano przy założeniu współczynnika ekstynkcji równego 1,33 ml/mg·cm, charakterystycznego dla IgY. W przypadku uprzedniego rozcieńczenia próbki, wartość stężenia korygowano zgodnie z zastosowanym współczynnikiem rozcieńczenia. Każdą próbkę analizowano w trzech powtórzeniach technicznych w celu oceny precyzji oznaczenia.

5.3.4 Test immunoenzymatyczny ELISA

Oznaczenie jakościowe przeciwciał IgY specyficznych wobec antygenów bakteryjnych przeprowadzono z wykorzystaniem testu ELISA z bezpośrednim adsorbowaniem antygenu na powierzchni studzienek, zgodnie z podejściem opisanym w literaturze¹⁰³.

Za pomocą testu oznaczono swoistość izolowanych przeciwciał IgY wobec mieszaniny antygenów *Campylobacter jejuni* (szczoney CJ5 i CJ6, stosunek 1:1). Oznaczenia przeprowadzono w układzie płytkowym

96-dołkowym, wykonując trzy powtórzenia techniczne dla każdej próbki oraz kontroli. Procedurę przeprowadzono zgodnie z krokami opisanymi w Tabeli 4.

Etap	Opis
Opłaszczanie antygenem	150 µl/dołek mieszaniny inaktywowanych antygenów CJ5 i CJ6 (stosunek mieszania 1:1), 2 McF, w buforze węglanowym (4.8.1); 4 °C, noc. KN1: 6 dołków opłaszczonych antygenem, KN2: 6 dołków opłaszczonych buforem węglanowym.
Płukanie I	Bufor płuczący (4.8.2), 300 µl/dołek, płuczka automatyczna (4.9.20)
Blokowanie	Bufor blokujący (4.8.3), 1,5 h, 37 °C
Płukanie II	Jak wyżej
Dodanie IgY	100 µl/dołek przeciwciał IgY izolowanych różnymi metodami w buforze blokującym; rozcieńczenia 1:1000, 1:2000, 1:4000; 1 h, 37 °C
Kontrole IgY	a) KP: antygen + IgY anty-CJ 1:100; b) KN1: antygen + bufor; c) KN2: bufor + bufor
Płukanie III	Jak wyżej
Dodanie koniugatu	100 µl/dołek, koniugat (4.8.4) w rozc. 1:30 000; 1 h, 37 °C
Płukanie IV	Jak wyżej
Reakcja barwna	200 µl substratu (4.8.4), 20 min, temp. pokojowa, ciemność
Zatrzymanie reakcji	50 µl roztworu hamującego (4.8.4)
Odczyt	492 nm, niezwłocznie po zatrzymaniu reakcji, za pomocą czytnika (4.9.21)

Tabela 4. Etapy testu ELISA wykorzystywanego w celu oznaczenia swoistości izolowanych przeciwciał IgY. KP – kontrola pozytywna, KN1 – kontrola negatywna 1, KN2 – kontrola negatywna 2.

5.3.5 Przechowywanie

Po zakończeniu każdej z procedur izolacji lub oczyszczania, przeciwciała IgY przechowywano w roztworze 0,85% NaCl, z dodatkiem 1% tiomersalu jako środka konserwującego. Wszystkie próbki były uprzednio filtrowane przez membrany PES o porowatości 0,22 µm, a następnie przechowywane w warunkach chłodniczych (4 °C) do czasu dalszych analiz⁹⁵. Każda seria preparatów została poddana testowi jakości poprzez posiew do bulionu wzbogaconego (4.2.12; inkubacja przez 7 dni w 37 °C) oraz TSB (4.2.8; inkubacja przez 7 dni w temp. pokojowej), w celu potwierdzenia braku obecności drobnoustrojów.

5.4 Badania *in vitro*

5.4.1 Badanie wpływu przeciwciał IgY na przeżywalność bakterii *C. jejuni*

Badanie efektu działania przeciwciał IgY na wzrost bakteryjny w warunkach *in vitro* przeprowadzono na podstawie opisów dostępnych w literaturze, z modyfikacjami dostosowanymi do charakterystyki szczepów *C. jejuni*^{90,104,105}.

Bakterie nanoszono na podłoże CCDA (4.2.3) i inkubowano przez 48 h w 42 °C w warunkach mikroaerofilnych. Następnie materiał bakteryjny zbierano z powierzchni agaru i zawieszano w bulionie MH (4.2.6). Otrzymaną zawiesinę przenoszono do kolb, i dodawano bulion MH do uzyskania 10⁶ CFU/ml. Do zawiesin dodawano pojedynczą dawkę przeciwciał IgY w celu uzyskania końcowych stężeń odpowiednio: 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml lub 0,05 mg/ml, przy czym IgY dodawano w czasie 0, 8 lub 24 h po inokulacji. Kolby inkubowano przez 48 h w 42 °C w warunkach mikroaerofilnych, umieszczone na kołysce (4.9.3). Liczbę komórek bakteryjnych (CFU – colony forming units) określano poprzez posiewy seryjnych rozcieńczeń

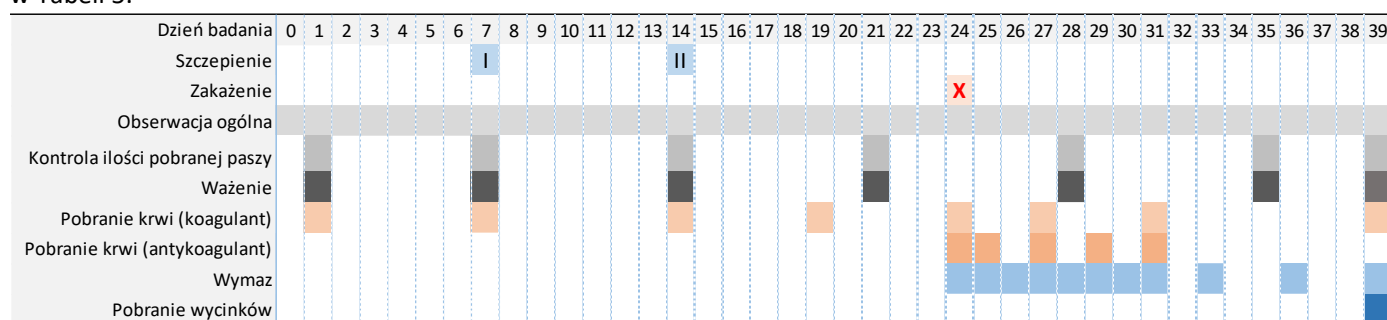
na podłoże CCDA przy użyciu automatycznego urządzenia do posiewów spiralnych (4.9.18) wykonując trzy powtórzenia dla każdego rozcieńczenia. Płytki inkubowano w tych samych warunkach (42 °C, 48 h), a następnie kolonie liczono za pomocą automatycznego licznika kolonii (4.9.19).

5.5 Badania *in vivo*

5.5.1 Protokół postępowania

Schemat badania *in vivo* opracowano na podstawie dostępnych danych literaturowych oraz konsultacji z jednostką doświadczoną w prowadzeniu eksperymentalnych badań na drobiu, w tym z zastosowaniem *C. jejuni*^{90,106,107}. Ostateczny protokół stanowił autorską koncepcję badawczą dostosowaną do założeń projektu.

Doświadczenie przeprowadzono na 210 jednodniowych pisklętach rasy Leghorn, które podzielono losowo na sześć grup po 35 osobników każda. Badanie miało na celu ocenę odpowiedzi immunologicznej kur na podanie antygenów *Campylobacter jejuni* różnymi drogami oraz opracowanie wdrożeniowych wariantów preparatu immunizacyjnego. Niniejsza praca przedstawia wyniki dotyczące czterech grup: B, D, KAB oraz KCD. Dwie pozostałe grupy (oznaczone jako A i C), obejmujące warianty zawierające podanie mieszaniny antygenów oraz izolowanych przeciwciał IgY, zostały wyłączone z przedstawionej analizy. Dane te mają charakter wewnętrzny i zostały objęte ochroną przedsiębiorstwa realizującego projekt, zgodnie z założeniami wdrożeniowymi rozprawy doktorskiej. W analizie uwzględniono zatem 140 osobników. Szczegóły dotyczące przebiegu czasowego przedstawiono na Ryc. 7., a skład dawek oraz drogi podania w Tabeli 5.



Rycina 7. Graficzny schemat czasowy badania *in vivo*.

Pisklęta badano w 3 dniu życia na obecność bakterii *Campylobacter spp.*, *Salmonella Enteritidis* i *Salmonella Typhimurium* – wyniki były ujemne (badanie wykonane przez zewnętrzne laboratorium diagnostyczne na zlecenie jednostki prowadzącej badanie). Immunizację prowadzono w dniach 7 i 14, a zakażenie żywym szczepem *C. jejuni* CJ10 w dawce 10^9 CFU (5.1.13) przeprowadzono w dniu 24. W dniu 39 wszystkie zwierzęta poddano eutanazji i pobrano próbki oraz wycinki jelit do dalszych analiz.

W trakcie badania:

- prowadzono obserwację kliniczną i kontrolę pobierania paszy,
- ważono zwierzęta w dniach: 1, 7, 14, 21, 28, 35, 39,
- pobierano wymazy (na podłoże transportowe Amiesa) w dniach: 24–31, 33, 36, 39,
- pobierano próbki krwi do probówki z koagulantem w dniach: 1, 7, 14, 19, 24, 27, 31, 39
- pobierano próbki krwi do probówki z antykoagulantem: 4 h, 8 h, 20 h, 74 h, 116 h oraz 163 h od przeprowadzenia zakażenia
- w dniach 1 i 7, ze względu na małą masę ciała, po jednym zwierzęciu z każdej grupy było poddane eutanazji w celu uzyskania pełnej próbki krwi,
- po eutanazji wszystkich zwierząt w dniu 39 pobierano wymazy z przewodu pokarmowego i narządów mięsnych oraz wycinki jelit.

Badanie zostało przeprowadzone zgodnie z Uchwałą nr 49/2020 z dnia 23.09.2020 r. Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie.

Nazwa grupy	Numer dawki	Dzień podania	Skład preparatu	Droga podania	Wielkość grupy
B	I	7	5×10 ⁸ CFU (1:1 CJ5 i CJ6)	<i>per os</i>	35
	II	14	1×10 ⁹ CFU (1:1 CJ5 i CJ6)	<i>per os</i>	35
KAB	I	7	0,85% NaCl	<i>per os</i>	35
	II	14	0,85% NaCl	<i>per os</i>	35
D	I	7	5×10 ⁸ CFU (1:1 CJ5 i CJ6)	<i>per os</i>	35
	II	14	1×10 ⁹ CFU, 70% Montanide (1:1 CJ5 i CJ6)	IM	35
KCD	I	7	0,85% NaCl	<i>per os</i>	35
	II	14	0,85% NaCl, 70% Montanide	IM	35

Tabela 5. Szczegóły badania *in vivo* - oznaczenia, wielkości grup oraz skład preparatów i dawkowanie (*per os* – doustnie, IM – domięśniowo).

5.5.2 Przygotowanie preparatów do badań *in vivo*

Preparaty podawane *per os* przygotowywano poprzez zmieszanie jałowych mieszanin antygenów szczepów *C. jejuni* CJ5 i CJ6 (stosunek 1:1), w dawkach odpowiednio 5×10⁸ CFU (pierwsza dawka, objętość 1 ml) oraz 1×10⁹ CFU (druga dawka, objętość 2 ml). Objętość dopełniano jałową solą fizjologiczną (4.3.4). Jałowość składowych potwierdzano przed użyciem poprzez posiew do bulionu wzbogaconego (4.2.12; inkubacja przez 7 dni w 37 °C) oraz TSB (4.2.8; inkubacja przez 7 dni w temp. pokojowej), w celu potwierdzenia braku obecności drobnoustrojów.

W przypadku grup, w których druga dawka była podawana domięśniowo (IM, *intra musculum*), mieszaninę antygenów (lub roztwór 0,85% NaCl dla grupy kontrolnej) łączono z adjuwantem (4.5.3), jałowionym przez filtrację (0,22 µm, membrana PES) zgodnie z wytycznymi producenta. Proces emulsyfikacji prowadzono zgodnie z protokołem producenta adjuwantu, z użyciem homogenizatora (4.9.25). Fazę wodną dodawano do adjuwantu podczas mieszania przy 7000 rpm, a następnie prowadzono etap wysokich obrotów przez 3 min przy 15600 rpm.

5.5.3 Przygotowanie prób do analiz serologicznych i cytokinowych

W trakcie trwania doświadczenia *in vivo* pobierano próbki krwi w dwóch wariantach: do próbek zawierających koagulant (dla uzyskania surowicy) oraz do próbek z antykoagulantem (dla uzyskania osocza), zgodnie z harmonogramem czasowym analiz. Probki krwi do oznaczeń poziomu IgY oraz IgA pozyskiwano od 10–15 osobników z każdej grupy. W przypadku grup, w których pobierano większą liczbę próbek, część analiz wykonano na próbkach pulowanych. Z uwagi na obciążenie organizmu częstymi pobraniami oraz ważeniami, większość upadków w czasie trwania badania (19 z 22 – 86,4%) dotyczyła właśnie tych osobników, co finalnie wpłynęło na liczebność analizowanych prób w poszczególnych punktach czasowych.

- a) Probki z koagulantem (dni pobrań: 1, 7, 14, 19, 24, 27, 31, 39) - po pobraniu krew pozostawiano do pełnej koagulacji, a następnie oddzielano surowicę od skrzepu. Surowicę przenoszono do jałowych próbek typu Eppendorf i poddawano dodatkowo odwirowaniu (4.9.25) przez 5 min, 2000 × g w celu usunięcia resztek komórek. Supernatanty przeniesiono do nowych próbek, a uzyskane próbki przechowywano w –20 °C do czasu przeprowadzenia oznaczeń przeciwciał IgY metodą ELISA (sekcja 5.5.5).

Zgodnie z literaturą, surowica uzyskana z krwi pobranej na koagulant stanowi materiał zalecany do analizy poziomu przeciwciał metodą ELISA, m.in. ze względu na brak obecności czynników krzepnięcia mogących interferować z oznaczeniem¹⁰⁸.

- b) Próbkę z antykoagulantem (godziny pobrania: 4 h, 8 h, 20 h, 74 h, 116 h, 163 h) - po pobraniu, próbki krwi poddawano dwukrotnemu wirowaniu przez 10 min, 1000 × g, (4.9.25), każdorazowo przenosząc osocze do czystych probówek. Uzyskane próbki osocza przechowywano w –20 °C do czasu analiz poziomu cytokin (5.5.6).

Osocze uzyskane z krwi pobranej na antykoagulant wykorzystywane jest rutynowo w analizach poziomu cytokin, zarówno w testach ELISA, jak i w metodach wieloparametrowych. Dobór osocza jako materiału do oznaczeń poziomu cytokin oparto na zaleceniach producenta zastosowanych zestawów ELISA (4.4.4-4.4.6), który rekomenduje użycie próbek izolowanych na antykoagulancie.

5.5.4 Przygotowanie próbek z wycinków jelit do analiz mikrobiologicznych i immunologicznych

Wycinki jelit (ok. 4 cm długości), pobrane w dniu eutanazji od zwierząt uczestniczących w badaniu *in vivo*, rozmrażano bezpośrednio przed dalszym przetwarzaniem. Z każdego wycinka odcinano około 1 cm fragment, który rozdrabniano jałowymi nożyczkami i umieszczano w probówce z 3 ml bulionu MH (4.2.6). Probki te przeznaczone były do dalszych analiz mikrobiologicznych (5.5.4).

Pozostałą część wycinka również rozdrabniano i przenoszono do probówki, do której dodawano 1 ml buforu saponinowego (4.3.8). Zawiesiny inkubowano przez około 24 h w 4 °C z łagodnym wytrząsaniem. W kolejnym etapie próbki wirowano dwukrotnie przy 8000 × g, 10 min (4.9.23), każdorazowo przenosząc supernatant do nowej probówki i odrzucając osad. Supernatanty przechowywano w –80 °C (4.9.24) do czasu dalszych analiz.

Izolację przeciwciał IgA z tkanek jelitowych przeprowadzono przy użyciu buforu saponinowego, zgodnie z uprzednio stosowaną w badaniach metodą opisaną w literaturze¹⁰⁹.

5.5.5 Analizy mikrobiologiczne

W celu oznaczenia obecności bakterii z rodzaju *Campylobacter*, u zwierząt uczestniczących w badaniu *in vivo* prowadzono analizę próbek biologicznych pochodzących z dwóch źródeł: wymazów z przewodu pokarmowego oraz zawiesin przygotowanych z wycinków jelit. Analizy tych próbek przeprowadzono metodą spiralnego posiewu ilościowego, zgodnie z wcześniej opisaną metodyką⁸⁶.

a) Analiza wymazów – wymazy z kloaki pobierano od zwierząt w dniach: 24–31, 33, 36 oraz 39. Probki umieszczano w jałowych probówkach zawierających podłoże transportowe Amiesa. Czas od pobrania do rozpoczęcia badania mikrobiologicznego nie przekraczał 5 h (czas transportu). Po dostarczeniu próbek do laboratorium, każdą wymazówkę umieszczano w 1 ml roztworu soli fizjologicznej (4.3.4) na około 5 min, kilkakrotnie mieszając w celu uwolnienia materiału biologicznego.

b) Analiza wycinków jelit – dodatkowo, od zwierząt poddanych eutanazji w 39 dniu życia pobierano wycinki jelit, które przetwarzano zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 5.5.3.

c) Procedura posiewów i identyfikacji bakterii – z każdej przygotowanej zawiesiny (zarówno z wymazów, jak i wycinków jelit) nanoszono po 0,1 ml na dwa typy podłoża: selektywne – CCDA (4.2.3) oraz chromogeniczne – chromAGAR™ *Campylobacter* (4.2.10), w dwóch powtórzeniach technicznych. Posiewy wykonywano przy użyciu urządzenia do posiewów spiralnych (4.9.18), zapewniającego równomierną dystrybucję materiału na powierzchni podłoża. Płytki inkubowano przez 48 h w temperaturze 42 °C w warunkach mikroaerofilnych (4.9.2). Po zakończonej inkubacji analizowano obecność wzrostu kolonii charakterystycznych dla *Campylobacter* spp. Kolonie poddawano dalszej identyfikacji z wykorzystaniem testów lateksowych, zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 5.1.5.

5.5.6 Test ELISA – poziom IgY i IgA

Za pomocą testu ELISA oznaczono obecność oraz poziom przeciwciał IgY i IgA swoistych względem mieszaniny antygenów *Campylobacter jejuni* (szczepki CJ5 i CJ6) w próbkach pobranych od zwierząt uczestniczących w badaniach *in vivo*. Oznaczenie jakościowe przeprowadzono z wykorzystaniem testu ELISA z bezpośrednim adsorbowaniem antygeny na powierzchni studzienek, zgodnie z podejściem opisanym

w literaturze¹⁰³. Analizy przeprowadzono w układzie 96-dołkowym, z zastosowaniem krzywej wzorcowej dla oznaczeń IgY (nie stosowanej przy analizie IgA), wykonując trzy powtórzenia techniczne dla każdej próbki oraz kontroli. Szczegółowy przebieg procedury przedstawiono w Tabeli 6. Ze względu na brak komercyjnie dostępnych przeciwciał wzorcowych IgA pochodzenia kurzego, analiza ELISA poziomu IgA w próbkach opierała się na porównaniu względnych wartości absorbancji pomiędzy grupami. Nie przeprowadzono oznaczenia absolutnego stężenia przeciwciał.

Etap	Opis
Przygotowanie krzywej wzorcowej	Wykonanie seryjnych rozcieńczeń wzorcowych przeciwciał IgY Gallus (4.7.5) o znanym stęż.: 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 oraz 0,0625 µg/ml
Opłaszczanie antygenem	100 µl/dołek standardu lub mieszaniny inaktywowanych antygenów CJ5 i CJ6 (stosunek mieszania 1:1), 2 McF, w buforze węglanowym (4.8.1); 4 °C, noc. KN1: 3 dołki opłaskane antygenem, KN2: 3 dołki opłaskane buforem węglanowym.
Płukanie I	Bufor płuczący (4.8.2), 300 µl/dołek, płuczka automatyczna (4.9.20)
Blokowanie	Bufor blokujący (4.8.3), 1,5 h, 37 °C
Płukanie II	Jak wyżej
Dodanie surowic	100 µl/dołek, surowice rozcieńczone w buforze do blokowania w stosunku 1:10, dołki ze standardem oraz KN1 i KN2 – dodanie buforu blokującego (4.8.3), 1 h, 37 °C
Płukanie III	Jak wyżej
Dodanie koniugatu	100 µl/dołek, koniugat (4.8.4) w rozc. 1:30 000; 1 h, 37 °C
Płukanie IV	Jak wyżej
Reakcja barwna	200 µl substratu (4.8.4), 20 min, temp. pokojowa, ciemność
Zatrzymanie reakcji	50 µl roztworu hamującego (4.8.4)
Odczyt	492 nm, niezwłocznie po zatrzymaniu reakcji, za pomocą czytnika (4.9.21)

Tabela 6. Etapy metody ELISA używanej do testów *in vivo*. KN1 – kontrola negatywna 1, KN2 – kontrola negatywna 2.

5.5.7 Test ELISA – analiza obecności cytokin

Poziomy wybranych cytokin (IL-1β, IL-8 oraz IL-10) w próbkach osocza uzyskanych od zwierząt uczestniczących w doświadczeniu *in vivo* oznaczano za pomocą komercyjnych zestawów (4.4.4-4.4.6), zgodnie z instrukcją producenta. Analizy przeprowadzono w 96-dołkowym układzie mikropłytkowym, zgodnie z protokołem zawartym w dokumentacji zestawu. Odczytu absorbancji dokonano przy długości fali 450 nm przy użyciu czytnika mikropłytek (4.9.21).

Próbki osocza do oznaczeń cytokin pochodziły z krwi pobieranej na antykoagulant, a ich kolekcjonowanie zaplanowano względem momentu zakażenia – odpowiednio po 4, 8, 20, 74, 116 oraz 163 h od zakażenia ptaków.

5.6 Analizy statystyczne

Analiza statystyczna została przeprowadzona z wykorzystaniem oprogramowania STATISTICA w wersji 13.3 (StatSoft, Inc., USA). Wszystkie dane liczbowe przedstawiono jako wartości mediany wraz z zakresem od wartości minimalnej do maksymalnej. Przed przystąpieniem do analizy danych oceniano rozkład zmiennych za pomocą testu normalności Shapiro-Wilka oraz homogeniczność wariancji (test Levene'a). Dla danych spełniających założenia normalności oraz jednorodności wariancji zastosowano parametryczne testy analizy wariancji (ANOVA) oraz analizę wariancji dla pomiarów powtarzanych (repeated measures

ANOVA). W przypadku wykrycia istotnych różnic pomiędzy grupami przeprowadzono test Tukeya (Tukey's HSD) jako test post-hoc, celem identyfikacji różnic między poszczególnymi parami grup.

Dane, które nie spełniały założeń testów parametrycznych, poddano analizom nieparametrycznym. Do porównania wielu niezależnych grup zastosowano test Kruskala-Wallisa wraz z testem Dunn'a z korektą Bonferroniego mającą na celu kontrolę ryzyka błędu typu I, jako test post-hoc. Natomiast do analizy powtarzanych pomiarów zastosowano test Friedmana z testem post-hoc (test Wilcoxona z korektą Bonferroniego). Przy porównaniu dwóch grup wykorzystywano w zależności od charakteru danych test Wilcoxona lub test Manna-Whitneya. Wszystkie testy przeprowadzono przy poziomie istotności statystycznej $p = 0,05$.

6 Wyniki

6.1 Analiza porównawcza szczepów terenowych oraz wzorcowych szczepów *C. jejuni*

6.1.1 Izolacja i identyfikacja szczepów terenowych *Campylobacter jejuni*

Pierwszym etapem prowadzonych badań była izolacja szczepów bakteryjnych z prób środowiskowych, przeprowadzona zgodnie z opisem zawartym w części Metody 5.1.2. Przed rozpoczęciem analizy materiału terenowego, w celu optymalizacji warunków hodowli, doboru odpowiednich podłoży oraz sposobu przechowywania, wykonano serię badań wstępnych z wykorzystaniem szczepów wzorcowych *C. jejuni* ATCC 29428 oraz ATCC 33560 (5.1.1 i 5.1.4).

Z 87 próbek pobranych od drobiu wykazującego objawy biegunki, pochodzących z różnych regionów Polski, wyizolowano pięć szczepów o potwierdzonej przynależności do gatunku *C. jejuni*. Identyfikację prowadzono z wykorzystaniem metod molekularnych (reakcje PCR, 5.1.6) oraz biochemicznych (5.1.5), porównując uzyskane wyniki ze szczepami referencyjnymi ATCC 29428 i ATCC 33560. Wyizolowane szczepy oznaczono symbolem CJ oraz numerami porządkowymi: CJ5, CJ6, CJ8, CJ9 i CJ10.

6.1.2 Wyniki oznaczeń serologicznych

Wyniki oznaczeń serologicznych przedstawiono w Tabeli 7. Badanie wykonywano dla dwóch kolonii każdego badanego szczepu. Dla wszystkich przeprowadzonych oznaczeń wykonano próbę kontrolną dodatnią oraz ujemną. Wszystkie badane szczepy wykazały reakcję pozytywną z lateksem testowym oraz brak reakcji z lateksem kontrolnym.

Szczep	Kolonia	Lateks testowy	Lateks kontrolny
ATCC33560	1	+	-
	2	+	-
ATCC29428	1	+	-
	2	+	-
CJ5	1	+	-
	2	+	-
CJ6	1	+	-
	2	+	-
CJ8	1	+	-
	2	+	-
CJ9	1	+	-
	2	+	-
CJ10	1	+	-
	2	+	-
Próba pozytywna		+	-

Tabela 7. Wyniki oznaczeń serologicznych wykonane testem lateksowym Microgen *Campylobacter*. + reakcja dodatnia, - reakcja ujemna.

6.1.3 Wyniki oznaczeń genetycznych

Wyniki testów PCR przedstawiono w Tabeli 8. Wszystkie badane izolaty terenowe oraz szczepy wzorcowe poza CJ8 posiadały kompletny zestaw analizowanych genów związanych z wirulencją. Szczep CJ8 nie posiadał genów *flaC*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*.

Gen	ATCC 33560	ATCC 29428	CJ5	CJ6	CJ8	CJ9	CJ10
16S rRNA	+	+	+	+	+	+	+
<i>flaA</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>flaA/flaB</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>flaC</i>	+	+	+	+	-	+	+

<i>cdtA</i>	+	+	+	+	-	+	+
<i>cdtB</i>	+	+	+	+	-	+	+
<i>cdtC</i>	+	+	+	+	-	+	+
<i>cadF</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>ciaB</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>flgR</i>	+	+	+	+	+	+	+

Tabela 8. Obecność poszczególnych genów oznaczonych reakcją PCR.+ reakcja dodatnia (obecność genu), - brak amplifikacji (brak genu).

6.1.4 Wyniki badań biochemicznych

Wyniki oznaczeń biochemicznych przedstawiono w Tabeli 9. Analiza biochemiczna szczepów przeprowadzona została przy użyciu komercyjnego zestawu API CAMPY (4.4.1), zgodnie z instrukcją producenta. Ocenie poddano aktywność enzymatyczną i zdolność metabolizmu wybranych substratów, które są charakterystyczne dla rodzaju *Campylobacter*.

Zdecydowana większość izolatów terenowych oraz badane szczepy wzorcowe wykazywała zgodny, typowy profil dla *C. jejuni*. Wszystkie szczepy były dodatnie w testach na obecność katalazy (CAT) oraz hydrolizę hippuranu (HIP). Również aktywność γ -glutamylotransferazy (GGT), zdolność do redukcji soli tetrazolowych (TTC), wykorzystania L-mleczanu (MLT), fermentacji sacharozy (SUT), redukcji fumaranu z udziałem cytochromu *c* (CFZ), a także dodatnie reakcje na cytrynian (CIT) oraz erytrytol (ERO) występowały powszechnie wśród badanych szczepów.

Zróżnicowanie wyników biochemicznych dotyczyło kilku parametrów:

- Szczep CJ8 jako jedyny nie wykazał aktywności oksydazy oraz esterazy (EST), co stanowi odstępstwo od wzorca obserwowanego u większości analizowanych szczepów.
- Szczepy CJ6 i CJ8 wykazały ujemny wynik testu redukcja soli tetrazolowych (TTC), podczas gdy pozostałe szczepy dały reakcję dodatnią.
- ATCC 29428, CJ8 oraz CJ10 wykazały ujemny wynik w teście na aktywność aryloamidazy pirolidonylowej (PyrA).
- Szczep CJ9 uzyskał wynik ujemny w teście aktywności fosfatazy alkalicznej (PAL), jako jedyny spośród analizowanych szczepów.

Badana cecha	ATCC 33560		ATCC 29428		CJ5		CJ6		CJ8		CJ9		CJ10	
	Kol. 1	Kol. 2	Kol. 1	Kol. 2	Kol. 1	Kol. 2	Kol. 1	Kol. 2	Kol. 1	Kol. 2	Kol. 1	Kol. 2	Kol. 1	Kol. 2
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NIT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EST	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
HIP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GGT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TTC	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
PyrA	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
ArgA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AspA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SUT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CFZ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ACE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PROP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

MLT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ERO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CAT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksydaza	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+

Tabela 9. Wyniki oznaczeń biochemicznych wykonanych testem API Campy (BioMérieux). Kol. 1, Kol. 2 – kolonia 1, kolonia 2 badanego szczepu.

6.1.5 Wyniki testów ruchliwości

Ruchliwość szczepów oceniano na podłożu MH z obniżoną zawartością agaru (0,8%) po 48 h inkubacji w warunkach mikroaerofilnych (pełen opis w sekcji Metody 5.1.7). W celu zwiększenia wiarygodności oceny dla każdego szczepu wykonano trzy powtórzenia techniczne. Uzyskane wyniki przedstawiono w Tabeli 10. Szczepy CJ5 oraz CJ6 wykazały najwyższą i najbardziej powtarzalną ruchliwość. CJ10 również cechował się znaczną ruchliwością, natomiast CJ9 wykazał niższą zdolność do migracji. Dla porównania, oba szczepy referencyjne (*C. jejuni* ATCC 29428 oraz ATCC 33560) wykazały niższą ruchliwość w stosunku do szczepów terenowych. Na szczególną uwagę zasługuje szczep CJ8, który jako jedyny spośród szczepów terenowych wykazał bardzo niską ruchliwość i jednocześnie w większości przeprowadzonych analiz odbiegał od wyników pozostałych szczepów.

Powtórzenie	ATCC 33560	ATCC 29428	CJ5	CJ6	CJ8	CJ9	CJ10
1	+	+	+++	++	+	++	+++
2	++	+	+++	+++	Brak	++	++
3	+	Brak	++	+++	+	++	++

Tabela 10. Wyniki testów ruchliwości ('+'-wzrost na mniej niż 1/3 powierzchni płytki; '++' – wzrost na 1/3-2/3 powierzchni płytki; '+++ – wzrost na więcej niż 2/3 powierzchni płytki)

6.1.6 Podsumowanie analizy porównawczej szczepów terenowych oraz wzorcowych *C. jejuni*
Wszystkie wyizolowane szczepy posiadały komplet badanych genów związanych z wirulencją, z wyjątkiem szczepu CJ8, który wykazywał również odmienne cechy biochemiczne (m.in. brak obecności oksydazy) oraz bardzo niską ruchliwość – ze względu na te różnice został wykluczony z dalszych etapów badań.

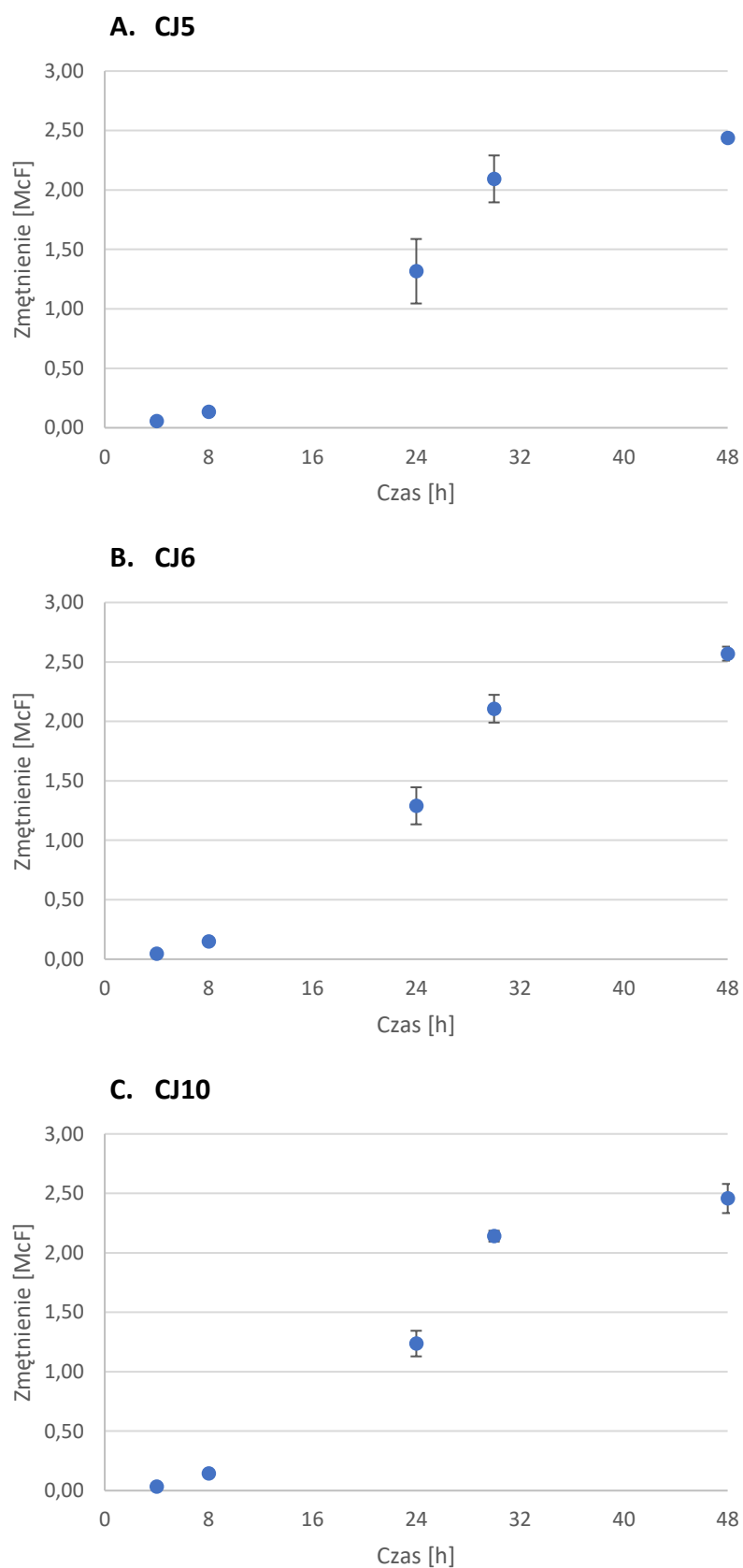
Analizy genetyczna i biochemiczna wykazały wysoce jednorodne profile wśród wszystkich badanych szczepów – włącznie z badanymi szczepami referencyjnymi – poza szczepem CJ8, który był mocno odmienny. Największe zróżnicowanie zaobserwowano natomiast w testach ruchliwości, które w literaturze uznawane są za jeden z potencjalnych wskaźników wirulencji *Campylobacter jejuni*^{24,110}.

Na podstawie pełnej analizy a szczególnie wyników testów ruchliwości, do dalszych badań wytypowano:

- Szczepy CJ5 i CJ6 – do przygotowania mieszaniny inaktywowanych antygenów wykorzystywanych w immunizacji kur w celu pozyskania swoistych przeciwciał IgY,
- Szczep CJ10 – jako materiał zakaźny w badaniach *in vivo*.

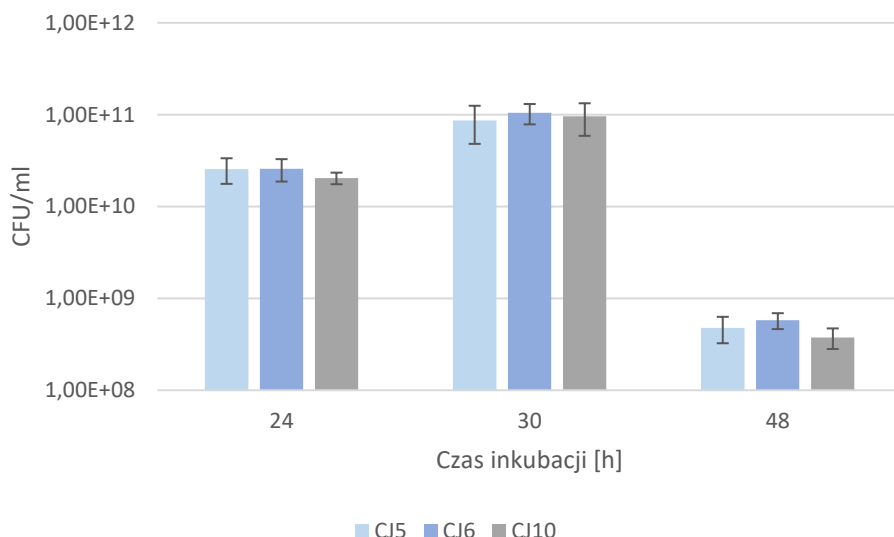
6.2 Określenie współczynnika konwersji McF–CFU dla *C. jejuni* (kalibracja względem skali McFarlanda w kontekście przygotowania inokulum do badań *in vitro* i *in vivo*)

W ramach przeprowadzonych badań (pełen opis w sekcji Metody 5.1.9), określono dynamikę wzrostu trzech szczepów terenowych *Campylobacter jejuni* (CJ5, CJ6 oraz CJ10) na podstawie pomiaru zmętnienia hodowli w czasie w skali McFarlanda. Dla każdego szczepu sporządzono krzywą wzrostu, w oparciu o odczyty zmętnienia wykonywane co kilka godzin inkubacji, obejmującą fazę stacjonarną, wzrostu wykładniczego oraz spoczynku. Największą dynamikę wzrostu obserwowano pomiędzy 24 a 30 h inkubacji. Krzywe dla każdego badanego szczepu przedstawiono na wykresach (Ryc. 8).



Rycina 8. Krzywe wzrostu szczepów *C. jejuni* CJ5 (panel A), CJ6 (panel B) oraz CJ10 (panel C) na podstawie pomiaru zmętnienia hodowli w skali McFarlanda (McF) w kolejnych punktach czasowych (0–48 h). Wyniki przedstawione jako średnia wartość pomiaru zmętnienia $\pm$ SD.

Równolegle z pomiarem zmętnienia prowadzono miareczkowanie liczby żywych komórek (CFU/ml), co umożliwiło określenie zależności między wartościami McFarlanda a rzeczywistą liczbą bakterii w hodowli. Zebrane dane dla wszystkich szczepów i trzech punktów czasowych (24 h, 30 h oraz 48 h) wykazały względną spójność wartości McF oraz odpowiadających im wartości CFU/ml, co umożliwiło ich porównanie i opracowanie orientacyjnego przelicznika do dalszych badań. Wyniki dla trzech badanych szczepów zbiorczo przedstawia wykres (Ryc. 9).



Rycina 9. Liczba komórek (CFU/ml) szczepów *C. jejuni* CJ5, CJ6 oraz CJ10 w różnych punktach czasowych inkubacji. Słupki przedstawiają średnią liczbę komórek (CFU/ml) ± SD.

Na podstawie uzyskanych wyników wybrano 30-godzinną hodowlę jako najbardziej stabilny i powtarzalny punkt czasowy, reprezentujący fazę wykładniczego wzrostu komórek. Dla zawiesiny o zmętnieniu 2 jednostek McFarlanda wyliczono orientacyjną liczbę bakterii wynoszącą 9×10^{10} CFU/ml. Przyjęta wartość została zastosowana do dalszych etapów pracy – zarówno przy przygotowywaniu dawek do immunizacji kur w celu wytworzenia przeciwciał IgY, jak i przy ustalaniu dawek doświadczalnych w badaniach *in vivo*.

6.3 Oczyszczanie IgY metodą wodną z precypitacją NaCl najbardziej ekonomiczną z porównywanych metod

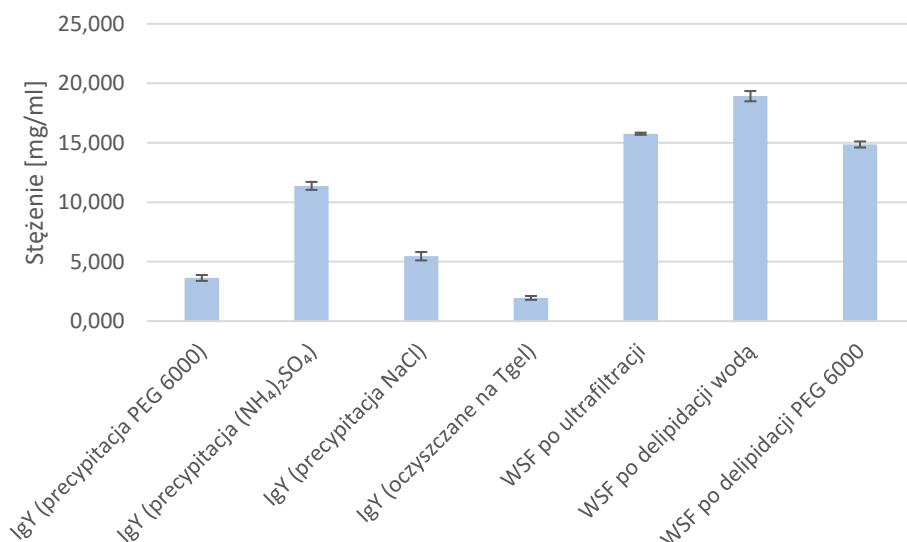
W celu porównania efektywności różnych metod izolacji przeciwciał IgY przeanalizowano próbki uzyskane za pomocą różnych podejść, obejmujących precypitację chlorkiem sodu, siarczanem amonu, glikolem polietylenowym (PEG 6000), ultrafiltrację oraz oczyszczanie chromatograficzne na Tgel. Ocenie poddano: efektywność izolacji (stężenie), czystość preparatu (SDS-PAGE), aktywność immunologiczną (test aglutynacji próbowkowej) oraz swoistość (ELISA).

6.3.1 Stężenie przeciwciał

Stężenie przeciwciał IgY w badanych próbkach oceniano metodą spektrofotometryczną na podstawie pomiaru absorbancji przy długości fali 280 nm. Do przeliczenia wartości absorbancji na stężenie zastosowano współczynnik ekstynkcji 1,33 ml/mg·cm, właściwy dla immunoglobulin typu Y. W przypadku rozcieńczeń próbek, wartości były odpowiednio korygowane. Pomiarom poddano zarówno preparaty uzyskane w wyniku czterech głównych metod izolacji (precypitacja chlorkiem sodu, siarczanem amonu, PEG 6000, oczyszczanie chromatograficzne na Tgel), jak i frakcje wodno-rozpuszczalne, czyli supernatanty z etapów pośrednich izolacji.

Szczegóły wyników przedstawiono na Ryc. 10. Najwyższe stężenia IgY uzyskano metodą precypitacji z zastosowaniem siarczanem amonu (~11,4 mg/ml) oraz chlorkiem sodu (~5,5 mg/ml) – w obu przypadkach wartości te przekraczały poziom uzyskiwany przy użyciu innych metod. Dla metody delipidacji i precypitacji

glikolem polietylenowym (PEG 6000) oraz oczyszczania chromatograficznego na złożu tiofilnym (Tgel) uzyskano stężenia nieco niższe (<5 mg/ml). Wysokie stężenia otrzymano również dla próbek WSF, które pochodziły z pośrednich etapów izolacji – to z nich prowadzono następnie precypitację lub oczyszczanie chromatograficzne. Warto zauważyć, że poziomy IgY w próbkach WSF były wyższe niż w materiałach po przeprowadzeniu precypitacji, co wskazuje na straty białka w trakcie dalszych etapów oczyszczania. Należy jednak zaznaczyć, że frakcje WSF po delipidacji wodą oraz glikolem PEG 6000 były wysoce mętne i zawierały liczne zawiesiny białkowe, co uniemożliwiało jednoznaczną ocenę stężenia, nawet po zastosowanym rozcieńczeniu. Z tego względu w tych próbach oznaczenia należy traktować jako szacunkowe.

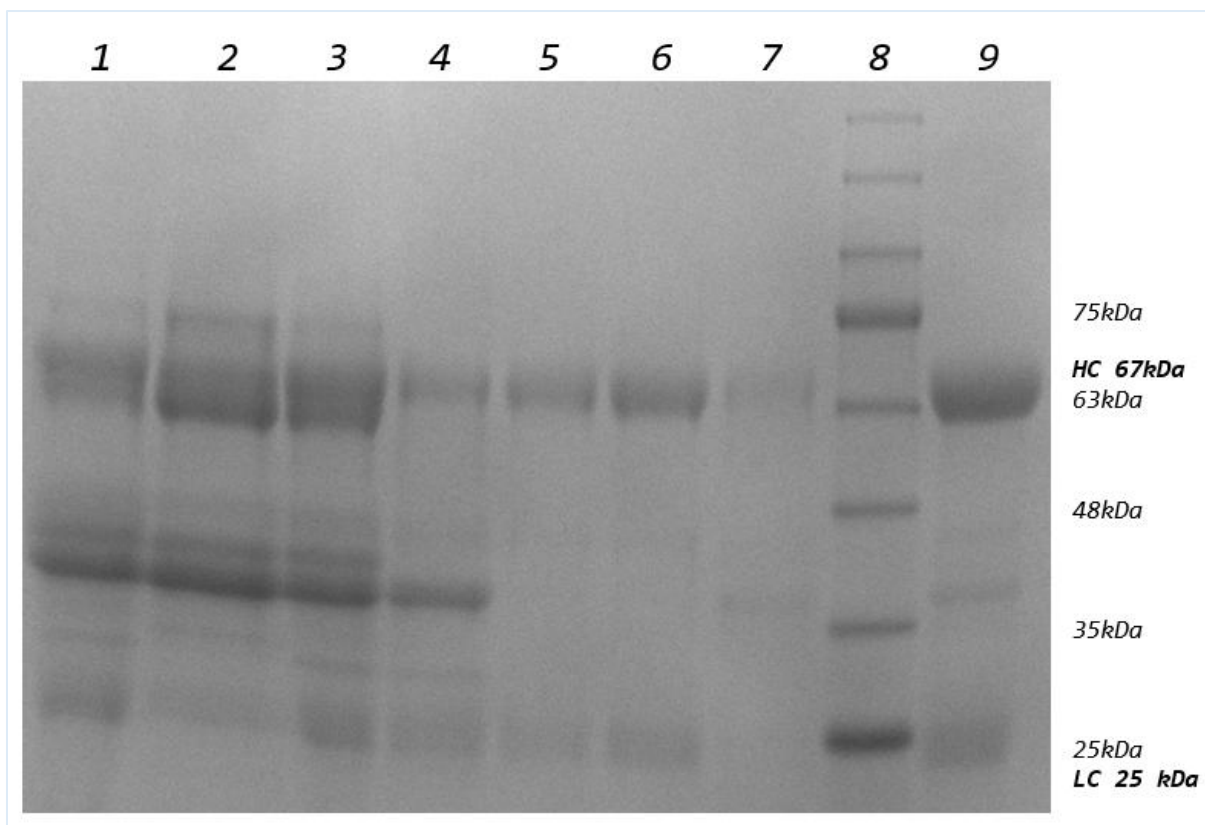


Rycina 10. Stężenie przeciwciał IgY (mg/ml) uzyskanych różnymi metodami izolacji, obejmującymi precypitację (PEG 6000, (NH₄)₂SO₄, NaCl), oczyszczanie na żelu T-gel oraz frakcji wodno-rozpuszczalnych (WSF) po zastosowaniu ultrafiltracji, delipidacji wodą lub PEG 6000. Słupki przedstawiają średnią wartość stężenia wyznaczonego w oparciu o krzywą wzorcową ± SD.

6.3.2 Czystość preparatów

Czystość uzyskanych frakcji IgY oceniano metodą elektroforezy SDS-PAGE w warunkach redukujących. Analizie poddano zarówno frakcje końcowe uzyskane w wyniku czterech głównych metod izolacji (precypitacja NaCl, siarczanem amonu, PEG 6000 oraz chromatografia na Tgel), jak i frakcje supernatantów powstałych na pośrednich etapach procedur – WSF. Wyniki przedstawia Ryc. 11.

W preparatach uzyskanych metodami precypitacji glikolem polietylenowym, chlorkiem sodu, siarczanem amonu (ścieżki 1-3) zaobserwowano bardzo wyraźne pasma białkowe odpowiadające łańcuchowi ciężkiemu (~67 kDa) i lekkiemu (~25 kDa) przeciwciał IgY. Ich intensywność oraz ograniczona obecność pasm niespecyficznych wskazywały na skuteczne wyizolowanie immunoglobulin z względnie wysoką czystością. Preparat oczyszczony chromatograficznie (ścieżka 4) charakteryzował się najwyższą czystością i stanowił najbliższy odpowiednik komercyjnego wzorca IgY (20 mg/ml) analizowanego jako kontrola dodatnia. W przeciwieństwie do tego, w próbkach WSF (ścieżki 5-7), czyli frakcjach supernatantów w etapach pośrednich izolacji, obserwowano obecność pasm charakterystycznych dla IgY, szczególnie dla łańcucha ciężkiego, co świadczy o tym, że nie wszystkie przeciwciała zostały wyizolowane w procesie oczyszczania. Zjawisko to dotyczyło w różnym stopniu każdej z metod, co sugeruje częściową stratę IgY na etapie izolacji, niezależnie od zastosowanego protokołu.



Rycina 11. Badanie czystości przeciwciał IgY izolowanych różnymi metodami za pomocą elektroforezy SDS-PAGE. (1 – IgY precypitowane PEG 6000; 2 – IgY precypitowane $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 3 – IgY precypitowane NaCl; 4 – IgY oczyszczane chromatograficznie na Tgel; 5 – WSF po ultrafiltracji; 6 – WSF po delipidacji wodą; 7 – WSF po delipidacji PEG 6000; 8 – marker masowy; 9 – przeciwciała IgY wzorcowe)

6.3.3 Określenie miana – test aglutynacji probówkowej

W ramach systemu zarządzania jakością zgodnego z normą ISO 13485, ocena aktywności funkcjonalnej przeciwciał IgY była prowadzona zgodnie z wewnętrzną procedurą firmy Immunolab, rutynowo stosowaną do oceny siły aglutynacji przeciwciał. W odróżnieniu od ilościowych metod immunoenzymatycznych (np. ELISA), test aglutynacji probówkowej okazał się bardziej odpowiedni do oceny aktywności biologicznej IgY, z uwagi na wyższą powtarzalność w analizowanym modelu oraz lepszą korelację z efektem biologicznym (aglutynacja komórek bakteryjnych).

Aktywność funkcjonalna izolowanych przeciwciał IgY została oceniona za pomocą testu aglutynacji probówkowej z wykorzystaniem inaktywowanych antygenów *Campylobacter jejuni*. Siłę reakcji oceniano półilościowo na podstawie opracowanej sześciostopniowej skali aglutynacji (0–5), uwzględniającej przejrzystość supernatantu, obecność i strukturę osadu oraz zachowanie zawiesiny po wstrząśnięciu (5.3.2). Miano próbki określono jako najwyższe rozcieńczenie, dla którego obserwowano widoczną gołym okiem aglutynację (ocena 5 lub 4 w przyjętej skali). Wyniki przedstawiono w Tabeli 11.

Najwyższą aktywność do aglutynacji wykazała frakcja uzyskana po precypitacji chlorkiem sodu – obserwowano silną aglutynację (widoczną gołym okiem), a miano oceniono na 1/64. Nieco niższe miano wykazała metoda precypitacji siarczanem amonu oraz glikolem polietylenowym, gdzie miano oceniono na 1/32 a aglutynację odpowiednio na 5 oraz 4. Z kolei dla frakcji oczyszczonej chromatograficznie na złożu tiofilnym uzyskano najniższe wyniki (ocena 4, miano 1/8).

W przypadku WSF z etapów pośrednich izolacji (po delipidacji i ultrafiltracji), aktywność do aglutynacji była również obserwowana. Dla wszystkich prób odnotowano niższe miano niż dla głównych metod izolacji, aglutynację oceniano na 3-4, miano 1/16. Należy jednak zaznaczyć, że frakcje WSF po delipidacji wodą oraz glikolem PEG 6000 były wysoce mętne i zawierały liczne zawiesiny białkowe (w Tabeli oznaczono *),

co uniemożliwiało jednoznaczną ocenę siły aglutynacji bez wcześniejszego rozcieńczenia. Z tego względu w tych próbach oznaczenia należy traktować jako szacunkowe.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że główne metody doprowadziły do izolacji oraz zachowania funkcjonalności antygenowo specyficznych przeciwciał IgY. We frakcjach WSF wykazano obecność znacznych ilości specyficznych antygenowo przeciwciał IgY, których aktywność była trudna do jednoznacznej oceny przez wysokie zmętnienie prób.

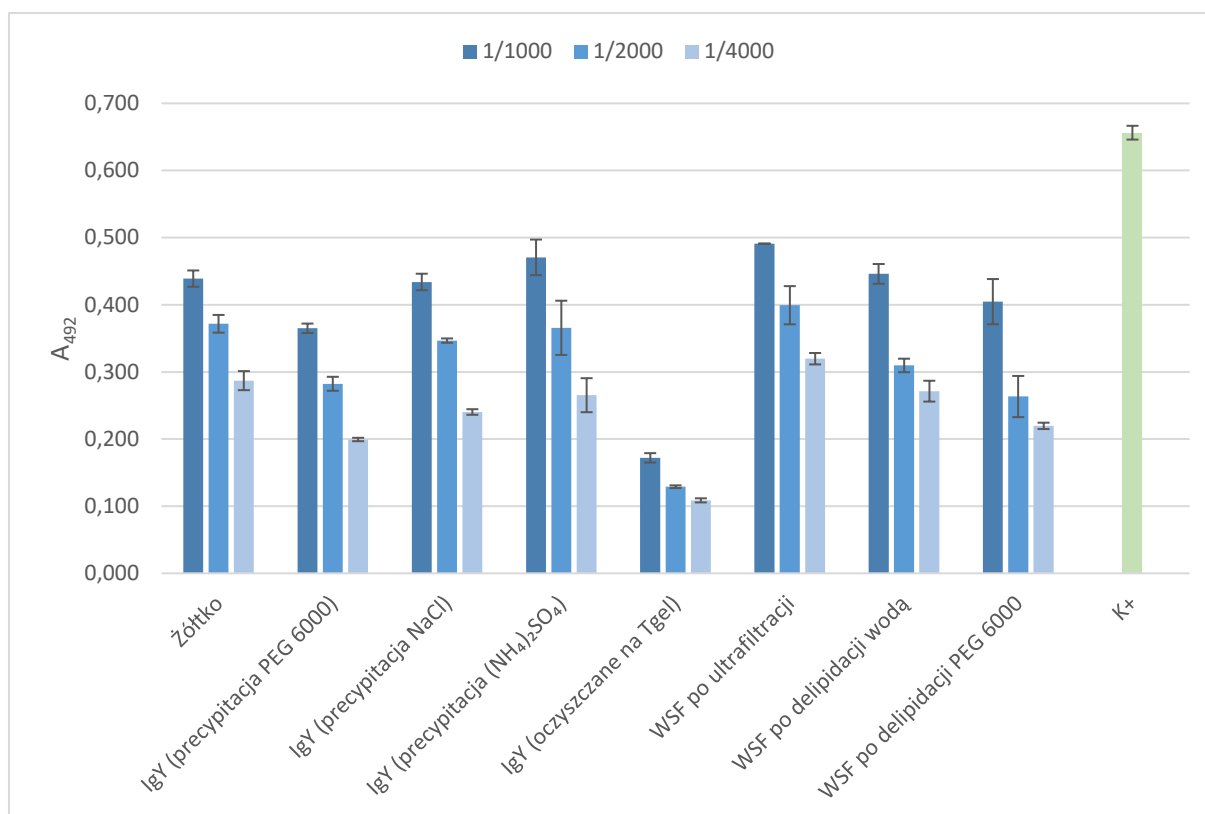
Oznaczenie próbki	Rozcieńczenie próbki									
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
IgY (precypitacja PEG 6000)	5	5	5	5	4	4	3	-	-	-
IgY (precypitacja (NH ₄) ₂ SO ₄)	5	5	5	5	5	5	3	-		-
IgY (precypitacja NaCl)	5	5	5	5	5	5	4	3	3	-
IgY (oczyszczane na Tgel)	5	5	5	4	3	-	-	-	-	-
WSF po ultrafiltracji	5	5	5	5	4	3	3	-	-	-
WSF po delipidacji wodą	*	*	*	5	4	3	3	-	-	-
WSF po delipidacji PEG 6000	*	5	5	5	4	3	-	-	-	-

Tabela 11. Wyniki oznaczeń testu aglutynacji probówkowej dla przeciwciał IgY izolowanych różnymi metodami.
* – mętność próbki uniemożliwiająca ocenę aglutynacji.

Uwaga metodologiczna: test aglutynacji probówkowej wykonano w celu porównania miana przeciwciał IgY w próbkach uzyskanych różnymi metodami izolacji. Oznaczenia wykonano bez powtórzeń technicznych ani biologicznych, ponieważ celem nie była analiza statystyczna, lecz przeglądowa ocena funkcjonalności preparatów. Każda seria przeciwciał była monitorowana przez okres dwóch lat pod kątem stabilności, a dane te stanowią element wewnętrznych analiz trwałości prowadzonych przez firmę i nie zostały uwzględnione w niniejszej pracy.

6.3.4 Test immunoenzymatyczny ELISA

Swoistość izolowanych przeciwciał IgY wobec antygenów *Campylobacter jejuni* oceniano za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA, wykorzystując mieszaninę antygenów inaktywowanych szczepów CJ5 i CJ6 jako czynnik opłaszczający. Analizie poddano frakcje przeciwciał uzyskane za pomocą głównych metod izolacji (precypitacja chlorkiem sodu, siarczanem amonu, glikolem PEG 6000 oraz oczyszczanie chromatograficzne na Tgel), a także frakcje wodno-rozpuszczalne pozostałe po ultrafiltracji oraz delipidacji wodą i PEG 6000. Wyniki przedstawione zostały na Ryc. 12.



Rycina 12. Wyniki pomiarów absorbancji w teście ELISA dla różnych rozcieńczeń próbek izolowanych różnymi metodami. K+ – kontrola pozytywna. Słupki przedstawiają średnią wartość absorbancji (A_{492}) $\pm$ SD.

Najwyższe wartości absorbancji, świadczące o silnym wiązaniu antygeny przez izolowane IgY, uzyskano dla frakcji wyizolowanych poprzez precypitację chlorkiem sodu oraz siarczanem amonu. Absorbancje przy rozcieńczeniu 1:1000 dla tych próbek były porównywalne z poziomem obserwowanym w żółtku przed izolacją, a ich spadek wraz ze wzrostem rozcieńczenia był stopniowy i przewidywalny. Dla frakcji wyizolowanych za pomocą PEG 6000 również uzyskano wysokie wartości absorbancji, choć nieco niższe w porównaniu z wspomnianymi wcześniej metodami. Odmienne wyniki zaobserwowano dla frakcji oczyszczonej chromatograficznie na Tgel – mimo wysokiej czystości preparatu (potwierdzonej analizą SDS-PAGE), wartości absorbancji były zauważalnie niższe, co może świadczyć o utracie części funkcjonalnych, specyficznych antygenowo przeciwciał IgY podczas oczyszczania tą metodą.

Wszystkie badane frakcje WSF z etapów pośrednich izolacji, czyli supernatanty po pierwszych etapach oczyszczania, z których następnie prowadzono precypitację lub oczyszczanie chromatograficzne, również wykazywały wyraźną reaktywność wobec antygenów *C. jejuni*. Co istotne, w niektórych przypadkach wartości absorbancji były wyższe lub porównywalne do próbek poddanych głównym metodom izolacji. Może to wskazywać, że część funkcjonalnych przeciwciał IgY pozostawała w WSF i nie została odzyskana w późniejszych etapach izolacji (precypitacja, oczyszczanie chromatograficzne co sugeruje straty w końcowych etapach procesu oczyszczania). Wynik ten należy interpretować ostrożnie — obecność innych białek i związków w surowych frakcjach WSF (np. lipoprotein, zanieczyszczeń organicznych) może wpływać na zwiększone wiązanie niespecyficzne lub wzmacnianie sygnału absorbancji. Niemniej jednak, dane te sugerują, że część swoistych IgY mogła pozostawać w supernatantach i nie zostać w pełni wytrącona w trakcie izolacji. Wynik ten jest zgodny z obserwacjami SDS-PAGE, gdzie w WSF widoczne były pasma odpowiadające łańcuchom IgY, oraz z wynikami aglutynacji probówkowych, w których frakcje WSF wykazywały reakcje swoiste z antygenem *C. jejuni*.

Podsumowując, test ELISA potwierdził swoistość IgY izolowanych z żółtek kurzych wobec antygenów *C. jejuni*. Najlepsze parametry funkcjonalne wykazywały preparaty uzyskane metodami precypitacji solami

(NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) oraz PEG 6000, co koresponduje z wynikami testu aglutynacji. Preparat oczyszczony chromatograficznie wykazał najmniejszą reaktywność.

6.3.5 Podsumowanie metod izolacji przeciwciał IgY

Przeprowadzone analizy wykazały, że wszystkie porównywane metody izolacji IgY – z zastosowaniem chlorku sodu, siarczanu amonu, PEG 6000 oraz chromatografii – umożliwiały pozyskanie aktywnych przeciwciał o swoistości względem *Campylobacter jejuni*. Spośród nich metoda precypitacji chlorkiem sodu została ostatecznie wybrana do dalszych badań, ponieważ łączyła wysoką efektywność izolacji z prostotą wykonania oraz niskimi kosztami. Zarówno stężenia białka, jak i wyniki testów funkcjonalnych (aglutynacja, ELISA) dla tej metody były jednymi z najwyższych i porównywalne z wynikami uzyskanymi po precypitacji siarczanem amonu. Choć metoda siarczanu amonu wykazała nieco wyższe stężenia białka oraz lepsze wyniki w teście ELISA, w teście aglutynacji próbka ta wypadła gorzej niż preparat izolowany za pomocą NaCl.

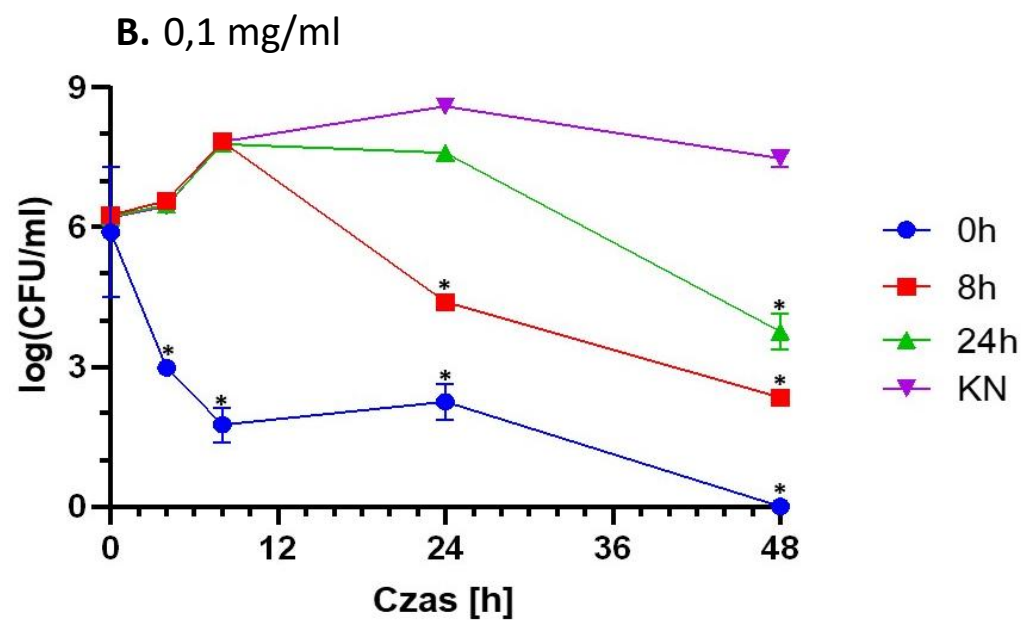
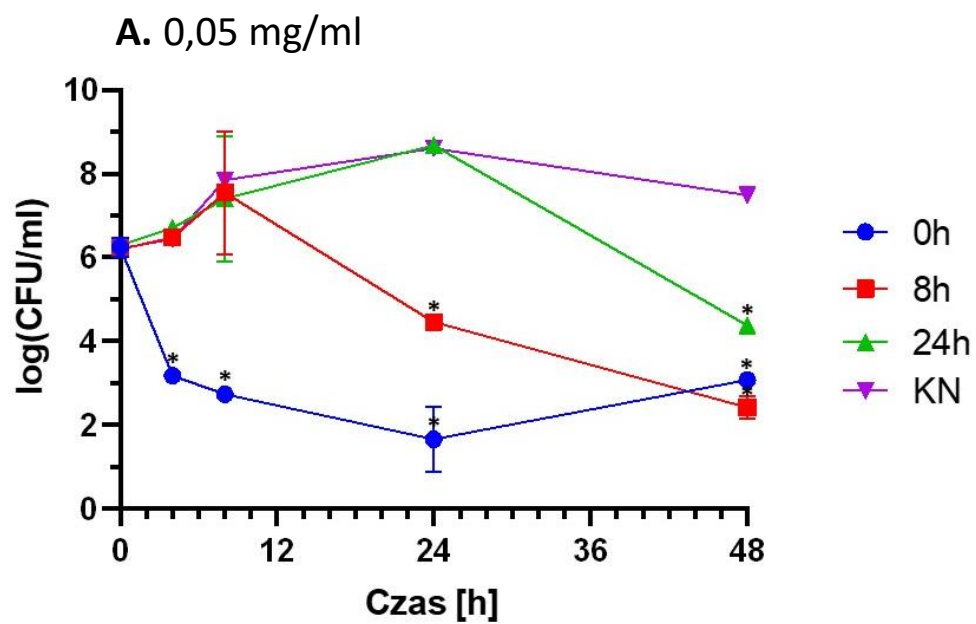
Biorąc pod uwagę aspekt wdrożeniowy pracy, kluczowa okazała się także ekonomia procesu – chlorek sodu jest znacznie tańszy i łatwiejszy w użyciu niż siarczan amonu, co czyni tę metodę bardziej atrakcyjną do dalszego stosowania w skali przemysłowej. Potencjalnym ograniczeniem metody precypitacji NaCl jest obecność większej ilości zanieczyszczeń białkowych w końcowym preparacie, co może mieć znaczenie w zastosowaniach wymagających wysokiej czystości przeciwciał, np. w analizach ilościowych lub dalszym oczyszczaniu. W kontekście niniejszych badań, których celem było opracowanie potencjalnego preparatu immunologicznego dla zwierząt, taki poziom oczyszczenia był jednak wystarczający.

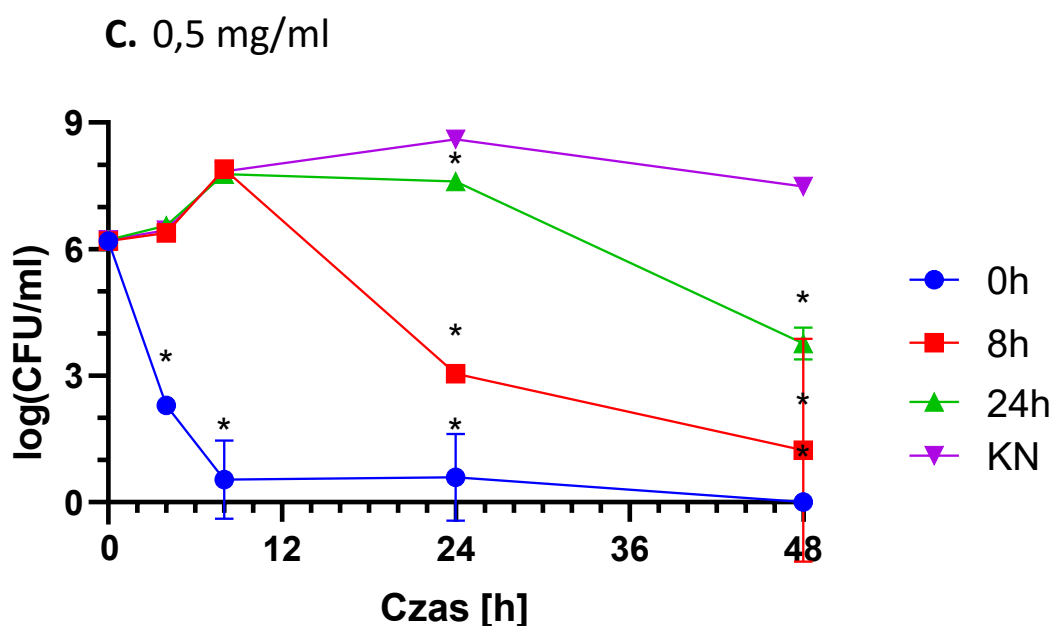
6.4 Hamowanie wzrostu bakterii *C. jejuni* przez przeciwciała IgY

Wpływ wyizolowanych przeciwciał IgY na wzrost bakterii *C. jejuni* oceniano w warunkach *in vitro*, prowadząc hodowlę szczepu CJ6 w obecności pojedynczej dawki przeciwciał w trzech różnych stężeniach: 0,5 mg/ml, 0,1 mg/ml oraz 0,05 mg/ml. Przeciwciała dodawano w trzech punktach czasowych: bezpośrednio po inokulacji (0 h), po 8 h oraz po 24 h inkubacji. Liczbę żywych komórek bakterii oznaczano metodą posiewu ilościowego i przedstawiono w przeliczeniu na $\log(\text{CFU/ml})$. Wyniki przedstawiono na Ryc. 13. Prezentowane dane stanowią część wyników wcześniej opublikowanej pracy autorstwa własnego¹¹¹.

Największą skuteczność wykazywało podanie IgY w czasie inokulacji, natomiast opóźnione dodanie (po 8 lub 24 godzinach) skutkowało mniejszą, choć wciąż zauważalną redukcją. Dla każdego z badanych stężeń zaobserwowano spadek liczby żywych bakterii w porównaniu z kontrolą negatywną, niezależnie od momentu dodania przeciwciał. W przeprowadzonych badaniach dla prób kontrolnych (bez dodatku przeciwciał) liczba komórek bakteryjnych wzrosła w ciągu 48 h o około 2 log. W przypadku najniższego zastosowanego stężenia przeciwciał IgY (0,05 mg/ml, Ryc. 13A) efekt był najsłabszy – redukcja liczby żywych komórek wynosiła 3–4 log niezależnie od czasu dodania przeciwciał. Dla stężenia 0,1 mg/ml (Ryc. 13B) odnotowano silniejszy efekt: redukcja wynosiła 6 log przy dodaniu w momencie inokulacji, 5 log przy dodaniu po 8 godzinach oraz 4 log po 24 godzinach. Największą skuteczność wykazano dla stężenia 0,5 mg/ml (Ryc. 13C), gdzie redukcja wynosiła 6 log po dodaniu w momencie inokulacji oraz po 8 godzinach, natomiast po 24 godzinach osiągała 3 log. Wszystkie różnice były istotne statystycznie ($p < 0,05$).

Uzyskane wyniki potwierdzają skuteczność działania przeciwciał IgY przeciwko *C. jejuni in vitro*, zależną zarówno od zastosowanego stężenia, jak i czasu podania. Największy efekt hamujący obserwowano przy wyższych stężeniach (0,5 mg/ml i 0,1 mg/ml) oraz przy dodaniu przeciwciał w początkowych etapach hodowli (0–8 h). Warto zaznaczyć, że nawet najsłabszy efekt, obserwowany dla stężenia 0,05 mg/ml, odpowiadał redukcji liczby żywych komórek bakteryjnych o około 99,9% w stosunku do kontroli. W każdej analizowanej konfiguracji liczba żywych komórek bakteryjnych była istotnie niższa niż w próbie kontrolnej, co jednoznacznie potwierdza potencjał IgY w ograniczaniu wzrostu bakterii z rodzaju *Campylobacter*.





Rycina 13. Wpływ różnych stężeń przeciwciał IgY (0,05–0,5 mg/ml) na przeżywalność *C. jejuni* w warunkach *in vitro*. Panel A – stężenie 0,05 mg/ml; Panel B – stężenie 0,1 mg/ml; Panel C – stężenie 0,5 mg/ml. Przeciwciała dodawano do hodowli w trzech punktach czasowych: w momencie inokulacji (0 h), po 8 h oraz po 24 h inkubacji. Oznaczenia na wykresach przedstawiają średnią wartość liczby komórek (CFU/ml) $\pm$ SD. KN – kontrola negatywna (dodatek 0,85% NaCl). * – różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$) względem KN.

6.5 Badanie *in vivo* wpływu inaktywowanych bakterii *C. jejuni* na układ odpornościowy kur

6.5.1 Charakterystyka badania *in vivo*

Celem badania *in vivo* była ocena odpowiedzi humoralnej kur po podaniu antygenów *Campylobacter jejuni* (mieszanina szczepów CJ5 i CJ6) różnymi drogami (doustnie – gr B; doustnie + iniekcyjnie – gr D), w warunkach możliwie zbliżonych do wdrożeniowych. Ze względu na ograniczenia techniczne i budżetowe, warianty obejmujące jednoczesne podanie antygenów i przeciwciał IgY zostały wyłączone z przedstawionej w niniejszej rozprawie analizie końcowej – zostały one objęte ochroną danych przedsiębiorstwa realizującego projekt (Immunolab). W niniejszej analizie uwzględniono wyniki dla grup B i D oraz odpowiadających im grup kontrolnych (odpowiednio KAB oraz KCD). W badaniu oceniano dynamikę odpowiedzi immunologicznej, analizując poziomy swoistych przeciwciał IgY i IgA, poziomy cytokin zapalnych oraz obecność bakterii *Campylobacter jejuni* w przewodzie pokarmowym. W trakcie doświadczenia monitorowano również pobranie paszy oraz masę ciała ptaków, jednak nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupami, dlatego szczegółowe wyniki nie zostały przedstawione.

6.5.2 Przebieg badania i obserwacje kliniczne

Badanie trwało 39 dni, punktem odniesienia był dzień wyklucia piskląt (dzień 0). W dniach 7 i 14 podawano kolejne dawki preparatów. W 24 dniu przeprowadzono zakażenie szczepem *C. jejuni* CJ10, natomiast dzień 39 był dniem eutanazji i pobrania próbek do analiz końcowych.

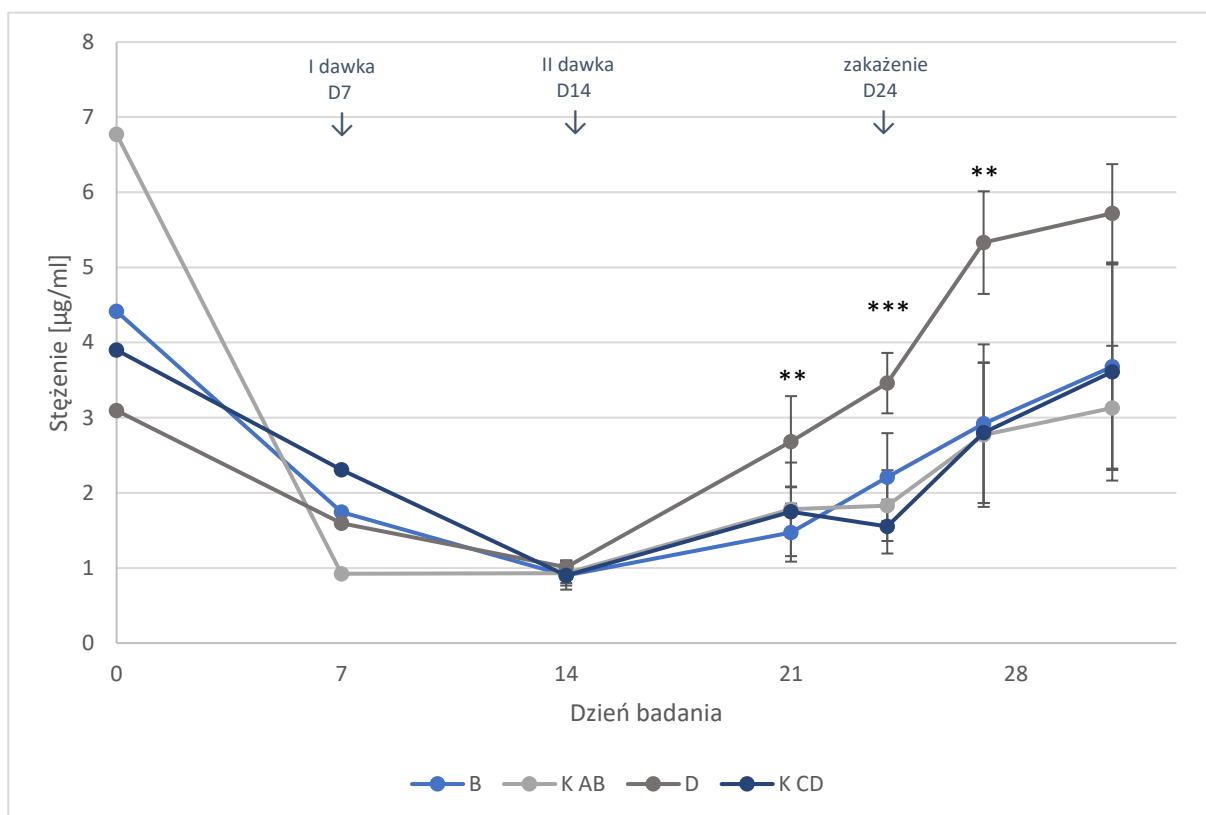
W trakcie badania odnotowano upadek 22 z 210 ptaków (10,5%). W 40,9% przypadków upadki wystąpiły przed zakażeniem (do dnia 24). Trzy przypadki dotyczyły uboju z konieczności ze względu na problemy z poruszaniem się i brakiem pobierania paszy. Pozostałe przypadki najprawdopodobniej wynikały ze stresu związanego z procedurami badawczymi (ważeniem, częstym pobieraniem krwi) oraz intensywnym wzrostem. W jednym przypadku stwierdzono zawał serca. Z uwagi na obciążenie organizmu częstymi pobraniami oraz ważeniami, większość upadków w czasie trwania badania (86,4%) dotyczyła właśnie tych osobników, co finalnie wpłynęło na liczebność analizowanych prób w poszczególnych punktach czasowych.

6.5.3 Posiewy wymazów oraz próbek jelitowych

W dniach od 24–31, 33, 36 oraz 39 badania pobierano wymazy z kloaki, a 39 dnia po eutanazji zwierząt również wycinki jelit, które poddano posiewom na podłoża selektywne. W żadnej z badanych próbek nie stwierdzono wzrostu *Campylobacter jejuni*, co uniemożliwiło ocenę efektu ochronnego preparatu. Możliwym powodem braku zakażenia była niewystarczająca kolonizacja lub pobranie próbek z odcinków jelita mniej preferowanych przez bakterie (np. jelito cienkie zamiast kątnicy), a także niska liczebność bakterii w kloace przy bezobjawowym przebiegu infekcji^{112,113}. Z tego względu dalsza analiza skupia się na odpowiedzi humoralnej ptaków.

6.5.4 Poziomy przeciwciał IgY w surowicy

W celu zobrazowania odpowiedzi humoralnej na podanie antygenów *C. jejuni*, dokonano analizy zmian stężenia swoistych przeciwciał IgY w trakcie badania. Na Ryc. 14. przedstawiono średnie wartości stężenia ($\mu\text{g/ml}$) dla każdej z badanych grup w kolejnych punktach czasowych, od momentu wylęgu (dzień 0).



Rycina 14. Zmiany stężenia przeciwciał IgY w surowicy piskląt ($\mu\text{g/ml}$) w kolejnych punktach czasowych w różnych grupach badawczych. Strzałkami zaznaczono momenty podania preparatów (dzień 7 oraz 14) oraz zakażenia (dzień 24). Wyniki przedstawione jako średnia wartość stężenia wyznaczonego w oparciu o krzywą wzorcową $\pm$ SD. Oznaczenia statystyczne: $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) względem grupy kontrolnej.

W grupie D, otrzymującej preparat zarówno doustnie, jak i iniekcyjnie, zaobserwowano wyraźny i systematyczny wzrost poziomu IgY, szczególnie po drugim szczepieniu (D14), osiągający najwyższe wartości tuż przed zakończeniem eksperymentu. W grupie B (podanie wyłącznie doustne) odpowiedź była słabsza i mniej stabilna w czasie – mimo wzrostu po pierwszym podaniu, nie odnotowano dalszej istotnej amplifikacji odpowiedzi po kolejnych etapach immunizacji.

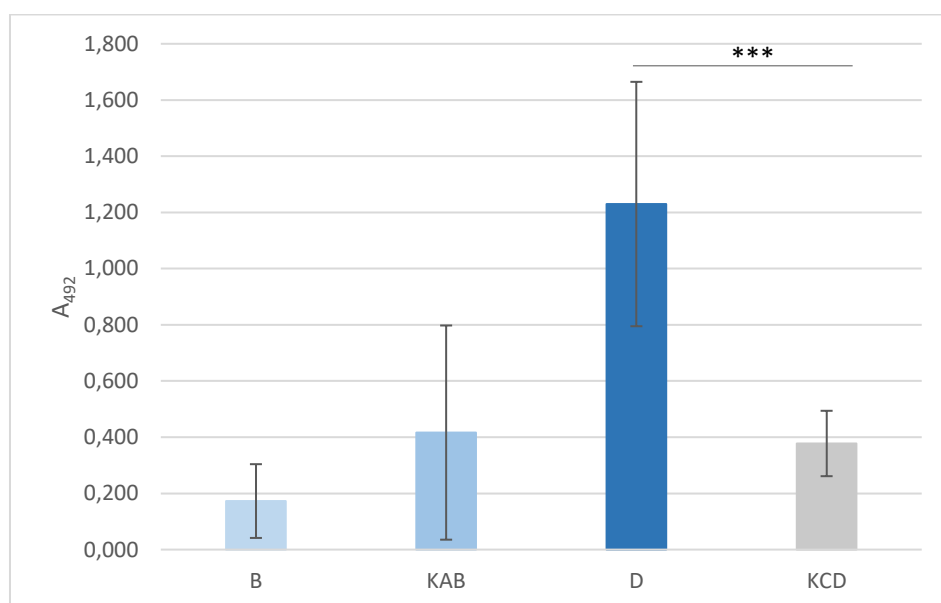
Grupy kontrolne (KAB, KCD) wykazywały jedynie śladowe poziomy IgY, które początkowo utrzymywały się dzięki obecności przeciwciał matczynych, a następnie uległy stopniowemu obniżeniu. Różnice między grupami były najbardziej widoczne w dniach 27 i 31, co koreluje z momentami spodziewanego szczytu odpowiedzi po szczepieniach.

Uzyskane wyniki potwierdzają skuteczność iniekcyjnego podania antygenów jako metody intensyfikującej odpowiedź humoralną, co ma szczególne znaczenie w kontekście dalszego projektowania preparatów immunoprofilaktycznych.

6.5.5 Poziomy IgA w wycinkach jelit

Wyniki oznaczeń poziomu przeciwciał IgA przedstawione na Ryc. 15. należy traktować jako porównawcze pomiędzy grupami. Brak wzorca uniemożliwił przeliczenie wartości absorbancji na jednostki stężenia, jednak analiza względna pozwala ocenić różnice odpowiedzi immunologicznej w odpowiedzi na zastosowane warianty preparatu i drogi podania.

Najwyższy poziom przeciwciał IgA w wycinkach jelit uzyskano w grupie D ($p = 0,0001$) w której preparat podawano w formie iniekcji. W grupach B i KAB (podanie doustne), a także w grupie kontrolnej KCD, poziomy IgA były istotnie niższe. Pomimo znacznego zróżnicowania międzyosobniczego w każdej z grup, wyniki sugerują silniejszą odpowiedź immunologiczną w przypadku zastosowania preparatu w formie iniekcji.

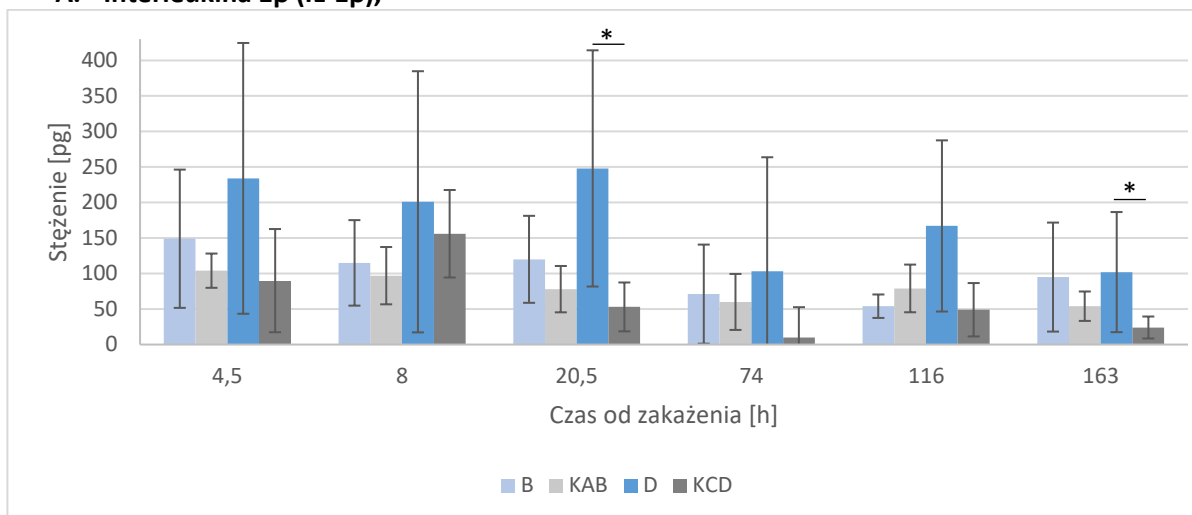


Rycina 15. Poziom przeciwciał IgA w jelitach piskląt po eutanazji (39. dzień badania). W grupie D (*per os* + iniekcja) zaobserwowano najwyższy poziom IgA. Słupki przedstawiają średnią wartość absorbancji (A_{492}) $\pm$ SD. Oznaczenia statystyczne: $p < 0,001$ (***) względem grupy kontrolnej.

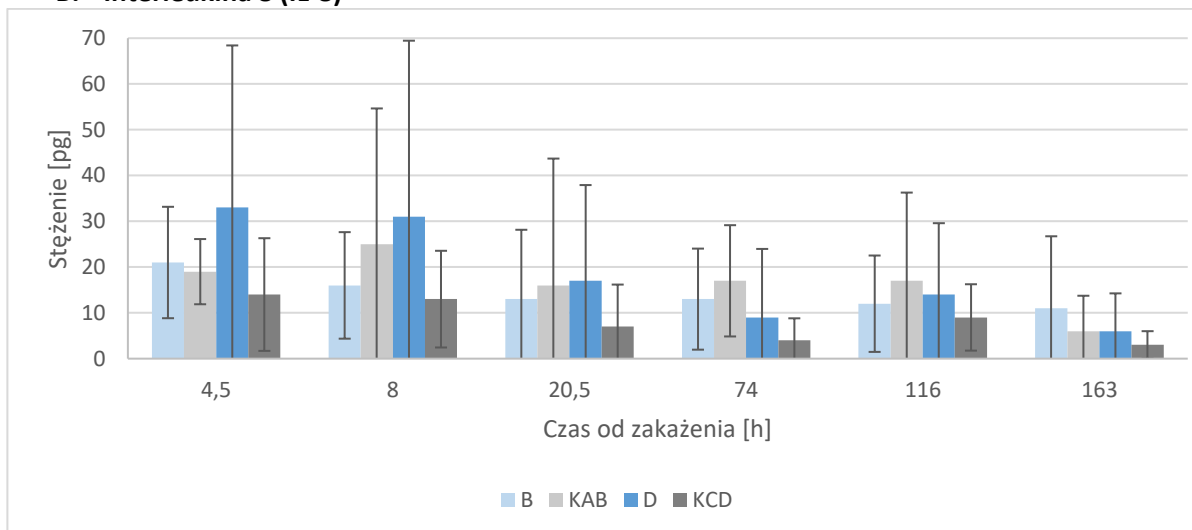
6.5.6 Poziomy cytokin w osoczu

W ramach uzupełniającej analizy odpowiedzi immunologicznej ptaków, oznaczono poziomy wybranych cytokin w osoczu krwi pobieranym w godzinach: 4, 8, 20, 74, 116 oraz 163 po zakażeniu (Ryc. 16). Oznaczenia wykonano za pomocą komercyjnych zestawów ELISA Genorise® (USA) zgodnie z instrukcją producenta, dla interleukiny 1 β (IL-1 β), interleukiny 8 (IL-8) oraz interleukiny 10 (IL-10). Do analizy zastosowano osocze z próbek krwi pobranych na antykoagulant, w dwóch powtórzeniach technicznych dla każdej próbki.

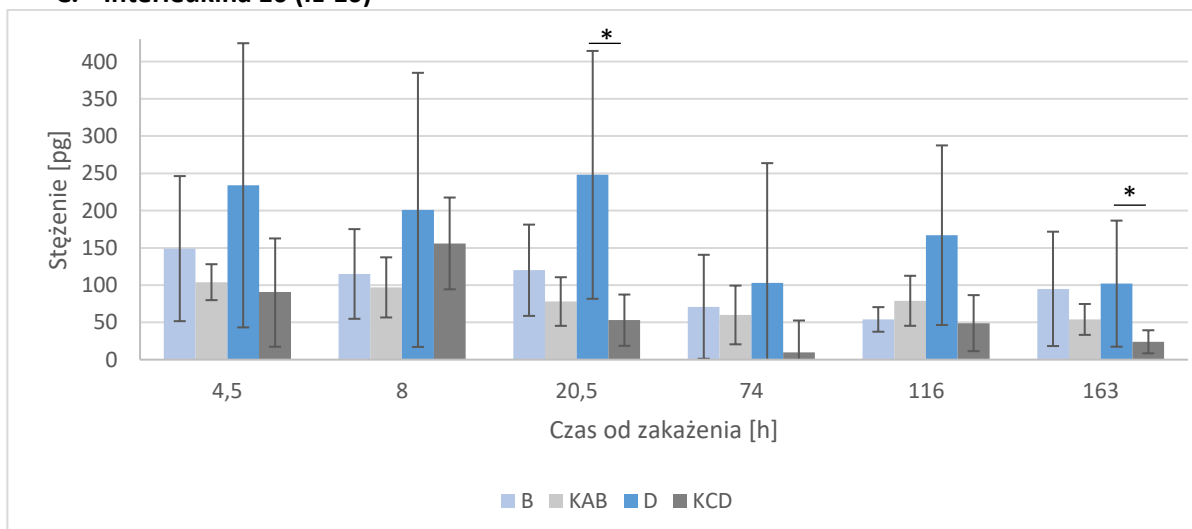
A. Interleukina 1 β (IL-1 β),



B. Interleukina 8 (IL-8)



C. Interleukina 10 (IL-10)



Rycina 16. Stężenia interleukin w treści jelit piskląt w różnych punktach czasowych po zakażeniu *C. jejuni*. Panel A – interleukina 1 β (IL-1 β), Panel B – interleukina 8 (IL-8), Panel C – interleukina 10 (IL-10). Słupki przedstawiają średnie stężenie [pg] wyznaczone w oparciu o krzywą wzorcową $\pm$ SD. Oznaczenia statystyczne: $p < 0,05$ (*) względem grupy kontrolnej.

Uzyskane wyniki wykazały istotną zmienność osobniczą w poziomach cytokin w obrębie poszczególnych grup badawczych. Zaobserwowano duże odchylenia standardowe, które znacząco ograniczają możliwość jednoznacznej interpretacji trendów w czasie. W przypadku IL-1 β i IL-10 można zauważyć tendencję wzrostową po zakażeniu w grupie D, wykazano statystycznie istotne wyniki w czasie 20,5 h oraz 163 h po zakażeniu względem grupy kontrolnej KCD. Poziomy IL-10, cytokiny o działaniu przeciwzapalnym, również ulegały zmianom, jednak bez wyraźnego schematu zależnego od zastosowanego wariantu szczepienia.

Na uzyskany rozrzut wyników mogły wpłynąć naturalne różnice osobnicze w odpowiedzi immunologicznej oraz ograniczona liczba zwierząt w analizie. Wyniki należy traktować jako obserwacyjne – wskazujące potencjalne zmiany w lokalnym i ogólnoustrojowym środowisku zapalnym, wymagające dalszych badań w szerszej grupie oraz w modelach zoptymalizowanych do oznaczeń cytokin.

6.5.7 Podsumowanie badania *in vivo*

Celem badania *in vivo* była ocena odpowiedzi humoralnej kur po podaniu antygenów *Campylobacter jejuni* różnymi drogami oraz analiza interakcji układu odpornościowego gospodarza z podanym antygenem i żywymi bakteriami szczepu odmiennego od podanego immunogenu. W doświadczeniu porównano dwie strategie immunizacji: podanie doustne (grupa B) oraz schemat mieszany – doustne i iniekcyjne (grupa D). Ocenę dokonywano na podstawie poziomów swoistych przeciwciał IgY w surowicy oraz IgA w wycinkach jelit, a także oznaczeń cytokin z osocza i prób mikrobiologicznych zarówno z wymazów jak również z wycinków jelit zwierząt po eutanazji.

Wyniki oznaczeń immunologicznych wykazały istotny wzrost poziomu IgY w grupie D względem grupy kontrolnej w późniejszych punktach czasowych (27 i 31 dzień), co wskazuje na skuteczniejszą stymulację odpowiedzi humoralnej w schemacie mieszanym. Również oznaczenia IgA potwierdzają silniejszą odpowiedź w grupie D, choć ze względu na brak wzorca ilościowego możliwe było jedynie porównanie względne.

W badaniu nie udało się uzyskać skutecznego zakażenia modelowego – we wszystkich próbkach biologicznych wynik posiewów na *C. jejuni* był ujemny. Możliwe przyczyny obejmują m.in. wybór niewłaściwego odcinka przewodu pokarmowego do pobrania materiału do analizy, obumarcie szczepów w trakcie transportu próbek do laboratorium lub przebieg zakażenia w formie subklinicznej. Z tego powodu dalsza analiza skoncentrowała się na odpowiedzi immunologicznej jako wskaźniku skuteczności działania zastosowanego preparatu.

Należy zaznaczyć, że choć badanie *in vivo* stanowi uzupełnienie głównego ciągu eksperymentalnego, jego charakter nieco odbiega od wcześniejszych etapów pracy. Trzon rozprawy obejmuje charakterystykę szczepów terenowych *C. jejuni*, analizę ich potencjału antygenowego oraz opracowanie i ocenę funkcjonalności swoistych przeciwciał IgY. W badaniu *in vivo* analizowano również warianty jednoczesnego podania antygenów z przeciwciałami, jednak ze względu na poufność danych przedsięwzięcia realizującego projekt, ta część została wyłączona z analizy końcowej. Niniejsze wyniki odnoszą się wyłącznie do interakcji układu odpornościowego gospodarza z antygenami oraz żywymi bakteriami *C. jejuni*.

7 Dyskusja

Celem niniejszej pracy było zbadanie interakcji pomiędzy przeciwciałami IgY, bakteriami *Campylobacter jejuni* oraz układem odpornościowym brojlerów. W ramach badań oceniono zarówno właściwości szczepów terenowych, skuteczność izolowanych przeciwciał, jak i odpowiedź immunologiczną organizmu na kontakt z patogenem. Poniżej przedstawiono interpretację uzyskanych wyników w odniesieniu do dostępnych danych literaturowych, z uwzględnieniem kluczowych aspektów biologii patogenu, potencjału IgY oraz możliwych zastosowań praktycznych.

7.1 Znaczenie różnic genotypowych szczepów *C. jejuni* dla potencjału wirulencji

W przeprowadzonej analizie szczepów terenowych *C. jejuni* potwierdzono ich przynależność gatunkową zarówno na podstawie cech fenotypowych (testy biochemiczne), jak i genotypowych (analiza obecności genów). Zgodność wyników z danymi literaturowymi dotyczącymi aktywności oksydazy, katalazy oraz zdolności hydrolizy hipuranu pozwalała na wiarygodną identyfikację gatunku, co pozostaje zgodne z rutynowymi metodami diagnostycznymi stosowanymi w mikrobiologii żywności i weterynarii^{6,74}.

W analizie genotypowej szczepów terenowych *Campylobacter jejuni* wykazano obecność większości badanych genów związanych z wirulencją, w tym genów kodujących białka flageliny (*flaA*, *flaB*), adhezyny (*cadF*) oraz toksynę CDT (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*). Wyjątek stanowił szczep CJ8, u którego stwierdzono brak czterech genów – *flaC*, *cdtA*, *cdtB* oraz *cdtC*. Brak tych genów może oznaczać, że szczep ten nie syntetyzuje toksyny CDT, odpowiedzialnej za zatrzymanie cyklu komórkowego gospodarza w fazie G2/M, co stanowi jeden z kluczowych mechanizmów cytotoksyczności¹¹⁴. Jednocześnie brak genu kodującego białko FlaC może osłabiać system transportu typu III (T3SS), ograniczając zdolność do inwazji komórek gospodarza²⁴. Tego rodzaju utrata lub modyfikacja wybranych czynników wirulencji, opisywana również w literaturze, może prowadzić do istotnych zmian w przebiegu zakażenia, w tym obniżenia patogenności lub zmiany jej charakteru¹¹⁵. Z tych względów szczep CJ8 został wykluczony z dalszych analiz.

Ruchliwość oceniano jako potencjalny wskaźnik wirulencji, co znajduje potwierdzenie w badaniach wykazujących, że obecność funkcjonalnej wici warunkuje zdolność *C. jejuni* do kolonizacji jelit gospodarza i penetracji warstwy śluzu^{25,27,116}. Wysoka ruchliwość szczepów terenowych, potwierdzona w testach przeprowadzonych na półpłynnym agarze, sugeruje zachowanie zdolności inwazyjnych i potencjału zakaźnego. Obniżona ruchliwość szczepu CJ8 stanowi zatem kolejne potwierdzenie jego odmiennych właściwości.

Na podstawie wyników porównawczych wyselekcjonowano szczepy do dalszych etapów badań, w tym immunizacji i doświadczeń *in vivo*. Wybór ten podyktowany był ich typowym profilem wirulencji, wysoką ruchliwością oraz zgodnością cech biochemicznych i genotypowych z danymi referencyjnymi. Takie podejście zapewniało reprezentatywność oraz możliwość wiarygodnej oceny skuteczności zastosowanej immunizacji. Uzyskane dane genotypowe stanowiły punkt wyjścia do opracowania skutecznego preparatu IgY, co wymagało oceny różnych metod jego pozyskiwania i oczyszczania.

7.2 Optymalizacja metody izolacji IgY pod kątem skuteczności i wdrożenia

W tej części pracy porównano cztery metody izolacji przeciwciał IgY: precypitację chlorkiem sodu, precypitację siarczanem amonu, precypitację glikolem polietylenowym (PEG 6000) oraz chromatografię tiofilową (na Tgel). Najlepsze wyniki funkcjonalne uzyskano w przypadku precypitacji chlorkiem sodu, co potwierdzają również wcześniejsze obserwacje innych autorów^{96,102}. Metoda z użyciem siarczanu amonu również pozwalała uzyskać wysoki poziom aktywności swoistych IgY, jednak proces był bardziej pracochłonny i mniej wygodny do wdrożenia na skalę przemysłową. Najwyższą czystością charakteryzował się preparat oczyszczony na złożu tiofilnym, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami wskazującymi wysoką skuteczność technik chromatograficznych w eliminacji białek niespecyficznych¹¹⁷. W kontekście zastosowań weterynaryjnych, w których priorytetem jest uzyskanie dużej ilości aktywnych przeciwciał przy zachowaniu zgodności z przyjętymi w firmie Immunolab normami jakości (ISO 9001, ISO 13485) oraz zasadami dobrostanu zwierząt, niższa czystość metod niechromatograficznych nie stanowi istotnego ograniczenia. Chromatografia, mimo wysokiej czystości, prowadziła do obniżenia stężenia swoistych IgY, co w kontekście potencjalnej przemysłowej produkcji ograniczyło jej przydatność. Zaobserwowane wyższe poziomy IgY w żółtkach przed izolacją oraz w frakcjach WSF uzyskanych na pośrednich etapach produkcji wskazują na potencjał dalszej optymalizacji metody, co mogłoby dodatkowo zwiększyć wydajność i efektywność procesu.

Wybór metody precypitacji chlorkiem sodu był uzasadniony nie tylko wysoką funkcjonalnością otrzymanych preparatów, ale także względami technologicznymi i ekonomicznymi istotnymi dla realizacji doktoratu

wdrożeniowego. Proces ten jest prosty, tani, łatwy do standaryzacji i skalowania, a jednocześnie możliwy do bezpośredniego przeniesienia do warunków produkcyjnych bez konieczności inwestycji w specjalistyczny sprzęt chromatograficzny. Dzięki temu metoda ta stanowi optymalny kompromis pomiędzy wymaganiami jakościowymi, efektywnością procesu i realiami wdrożenia w przemyśle. Metoda z precypitacją siarczanem amonu miała porównywalny potencjał, jednak nieznacznie prostszy protokół oraz tańsze odczynniki przesądziły o wyborze chlorku sodu jako rozwiązania optymalnego. Dodatkowo, w prowadzonych przez nas długoterminowych obserwacjach, obejmujących dwuletni okres przechowywania preparatów, metoda z użyciem chlorku sodu pozwalała na uzyskanie przeciwciał o wyższej stabilności w porównaniu z siarczanem amonu, co stanowi dodatkowy atut w kontekście ich późniejszego zastosowania w produkcji i dystrybucji. Wybór optymalnej metody izolacji pozwolił na przygotowanie preparatu o odpowiednich właściwościach, co umożliwiło ocenę jego aktywności w badaniach *in vitro*.

7.3 Skuteczność przeciwciał IgY wobec *C. jejuni* w warunkach *in vitro*

W badaniach *in vitro* uzyskano jedno z najlepszych wyników całego projektu, co potwierdza opublikowana analiza skuteczności hiperimmunizowanych przeciwciał IgY wobec *Campylobacter jejuni*¹¹¹. Skuteczność preparatu wobec tego patogenu była wyraźnie wyższa niż w analogicznych testach prowadzonych dla *Salmonella* spp. i *Escherichia coli*. Może to wynikać ze specyfiki biologicznej *C. jejuni*, obejmującej m.in. wysoką ruchliwość, delikatną strukturę ściany komórkowej oraz dużą wrażliwość na zmienne warunki środowiska^{15,116,118}, co może zwiększać podatność na mechanizmy neutralizacji przez przeciwciała IgY. Warto podkreślić, że gatunek ten charakteryzuje się stosunkowo długim czasem generacji, co sprzyja skuteczności strategii polegających na zahamowaniu jego wzrostu⁷.

Do oceny miana przeciwciał zastosowano test aglutynacji, który w warunkach przemysłowych stanowi metodę prostszą, tańszą i szybszą w wykonaniu niż test ELISA, a jednocześnie pozwala na ocenę funkcjonalnej aktywności przeciwciał, a nie jedynie ich stężenia. Metoda ta jest standardowo stosowana w procedurach jakościowych zgodnych z ISO 13485 w firmie Immunolab, co dodatkowo uzasadniało jej wybór w ramach projektu wdrożeniowego.

Analiza wyników uzyskanych dla trzech stężeń preparatu IgY wykazała istotną korelację pomiędzy zastosowanym stężeniem przeciwciał a stopniem hamowania wzrostu bakteryjnego, z wyraźnie silniejszym efektem przy wyższych stężeniach. Zależność ta, obserwowana również w badaniach innych autorów^{64,72}, potwierdza potencjał zastosowania przeciwciał IgY jako elementu ograniczania kolonizacji *C. jejuni* w przewodzie pokarmowym kur, co w warunkach hodowli drobiu może istotnie zmniejszać ryzyko przeniesienia patogenu na ludzi. W perspektywie długoterminowej preparaty zawierające IgY mogłyby również znaleźć zastosowanie jako element wspomagający ograniczanie lub potencjalny czynnik terapeutyczny w przebiegu kamylobakteriozy. Obiecujące wyniki uzyskane w warunkach *in vitro* uzasadniały podjęcie próby oceny skuteczności preparatu w badaniu *in vivo*.

7.4 Wnioski z badań *in vivo*: odpowiedź immunologiczna i ograniczenia modelu

Badania *in vivo* przeprowadzono w celu oceny immunogenności przygotowanego preparatu IgY oraz porównania skuteczności dwóch schematów podania – doustnego (*per os*) oraz łączonego (*per os* + iniekcja z adjuwantem)¹⁰³. Z analizy wyłączono grupy A i C, co wynikało z przyjętej strategii ochrony know-how przedsiębiorstwa. Przedstawione wyniki odnoszą się wyłącznie do interakcji pomiędzy antygenem a układem odpornościowym zwierząt.

Próba wywołania kontrolowanego zakażenia modelowego *C. jejuni* zakończyła się niepowodzeniem – w posiewach nie stwierdzono wzrostu patogenu. Potencjalne przyczyny obejmują m.in. pobranie próbek z odcinka przewodu pokarmowego o niewystarczającej kolonizacji, zbyt niską dawkę inokulum, możliwą oporność rasową ptaków, niewłaściwy moment podania bakterii lub obumarcie komórek w trakcie transportu próbek do laboratorium^{57,112}. Podobne trudności odnotowano w innych badaniach^{15,113} – w których opisano szczepy *C. jejuni*, które nie potrafiły skolonizować 14-dniowych kurcząt oraz wykazano,

że formy VBNC nie są w stanie kolonizować jelita ślepego. Obie te obserwacje wpisują się w możliwe przyczyny niepowodzenia. W efekcie analizę ograniczono do parametrów odpowiedzi humoralnej i cytokinowej. Uzyskana *in vitro* redukcja o 6 log *C. jejuni* świadczy o wysokim potencjale preparatu do ograniczania liczebności bakterii. Choć w przeprowadzonym doświadczeniu *in vivo* nie udało się uzyskać skutecznej kolonizacji modelowej, co uniemożliwiło ocenę efektu w przewodzie pokarmowym, wyniki *in vitro* stanowią mocne uzasadnienie dla dalszych badań w warunkach kontrolowanego zakażenia.

W przypadku przeciwciał IgY w surowicy zaobserwowano typową kinetykę odpowiedzi – wyraźny spadek stężenia przeciwciał pochodzenia matczynego w pierwszych dniach życia⁶⁶, następnie wzrost po kolejnych dawkach szczepionki, z najsilniejszym efektem w grupie, w której zastosowano dodatkową iniekcję z adjuwantem¹⁰³. Odpowiedź obecności przeciwciał klasy IgA, ze względu na brak wzorca, oceniano w sposób względny. Analiza poziomu cytokin wykazała znaczne różnice osobnicze, co w połączeniu z ograniczeniami metodycznymi (m.in. liczba dostępnych próbek) utrudnia jednoznaczną interpretację tych wyników.

Porównanie dróg podania antygeny wykazało, że podanie doustne w połączeniu z dodatkową iniekcją skutkowało wyższymi poziomami zarówno swoistych IgY w surowicy, jak i IgA w treści jelitowej, w porównaniu z dwukrotnym podaniem doustnym. Należy jednak podkreślić, że w kontekście potencjalnego zastosowania w warunkach produkcyjnych, droga doustna pozostaje rozwiązaniem prostszym, mniej inwazyjnym oraz korzystniejszym z punktu widzenia dobrostanu zwierząt. Może to stanowić istotny argument wdrożeniowy, biorąc pod uwagę oczekiwania hodowców oraz wymogi praktyczne stosowania preparatu na szeroką skalę.

Badanie miało również ograniczenia organizacyjne. Ze względów budżetowych oznaczenia wykonano jedynie dla części osobników (10–15 ptaków z każdej grupy zamiast planowanych 35), co wpłynęło na większe odchylenia standardowe i niższą moc statystyczną analiz. Dodatkowo, w trakcie trwania doświadczenia odnotowano upadki ptaków, prawdopodobnie wynikające z czynników stresowych, takich jak częste ważenie i pobieranie krwi^{119,120}.

Pomimo ograniczeń, uzyskane dane pozwoliły na ocenę reakcji immunologicznej oraz wskazały, że droga podania preparatu ma istotny wpływ na siłę odpowiedzi humoralnej. Wyższe poziomy IgA w grupie D prawdopodobnie wynikały z drogi podania antygeny i silniejszej stymulacji błon śluzowych, co może mieć znaczenie przy projektowaniu przyszłych schematów immunizacji. Zaobserwowane różnice w dynamice narastania przeciwciał między grupami mogą natomiast wskazywać na odmienne mechanizmy odpowiedzi humoralnej, wymagające dalszych badań. Wyniki te mogą stanowić punkt wyjścia do bardziej ukierunkowanych eksperymentów *in vivo*, projektowanych w sposób minimalizujący ryzyko powtórzenia zaobserwowanych problemów i lepiej odzwierciedlających warunki docelowego zastosowania w produkcji drobiarskiej.

Podsumowując, mimo ograniczeń organizacyjnych i niepowodzenia zakażenia modelowego, badanie *in vivo* dostarczyło cennych informacji o wpływie drogi podania preparatu IgY na odpowiedź immunologiczną u kur, wskazując kierunki dalszych prac optymalizacyjnych w warunkach zbliżonych do praktyki hodowlanej.

7.5 Podsumowanie dyskusji

Punktem wyjścia dla niniejszej rozprawy była hipoteza, że swoiste przeciwciała IgY, otrzymane po immunizacji kur inaktywowanymi antygenami *Campylobacter jejuni*, wchodzi w istotne interakcje z bakteriami i układem odpornościowym brojlerów, wpływając na dynamikę zakażenia oraz mogą potencjalnie ograniczać kolonizację jelit przez *C. jejuni*. Ponadto zakładano, że proces ich produkcji może zostać zoptymalizowany w sposób umożliwiający praktyczne wykorzystanie.

1. Charakterystyka terenowych szczepów *C. jejuni*

Zrealizowano kompleksową analizę genotypową, biochemiczną i fenotypową, identyfikując zróżnicowanie profilu genów wirulencji, w tym brak elementów kluczowych dla produkcji toksyny CDT i integralności systemu T3SS u wybranych izolatów. Wyniki te potwierdzają istotne różnice w potencjale patogennym szczepów obecnych w polskich hodowlach drobiu.

2. Opracowanie i optymalizacja metody izolacji IgY

Porównano cztery metody izolacji, wskazując precypitację chlorkiem sodu jako optymalną pod względem funkcjonalności, prostoty wykonania, kosztów oraz możliwości wdrożenia w skali przemysłowej. Uzyskane preparaty charakteryzowały się wystarczającą czystością dla zastosowań weterynaryjnych przy zachowaniu wysokiej aktywności funkcjonalnej.

3. Ocena wpływu IgY na wzrost *C. jejuni* w warunkach *in vitro*

Badania wykazały istotne, zależne od stężenia, ograniczenie wzrostu bakterii. Wyniki te wskazują, że preparaty IgY mają potencjał do skutecznego zmniejszania kolonizacji *C. jejuni* u kur, a w szerszej perspektywie mogą stanowić element strategii ograniczania kampylobakteriozy u ludzi.

4. Analiza odpowiedzi immunologicznej brojlerów *in vivo*

Mimo nieskutecznego zakażenia modelowego, badanie pozwoliło porównać odpowiedź humoralną przy różnych drogach podania antygeny. Stwierdzono typową kinetykę narastania IgY po szczepieniach oraz wyższy poziom IgA w grupie poddanej iniekcji z adjuwantem, co potwierdza zdolność preparatu do stymulowania odpowiedzi immunologicznej w warunkach hodowlanych.

Łącznie uzyskane wyniki pozwalają częściowo potwierdzić hipotezę badawczą – wykazano istotne interakcje swoistych IgY z *C. jejuni* oraz wpływ na odpowiedź immunologiczną brojlerów, a także opracowano efektywną i możliwą do wdrożenia metodę ich pozyskiwania. Wyniki *in vitro* wspierają założenie o potencjale ograniczania kolonizacji jelit, choć wymaga ono dalszej weryfikacji w zoptymalizowanych badaniach *in vivo*.

Wyniki niniejszej pracy stanowią istotny wkład w rozwój strategii ograniczania kampylobakteriozy w duchu koncepcji One Health, łączącej ochronę zdrowia ludzi i zwierząt z poprawą bezpieczeństwa żywności. Opracowana, możliwa do wdrożenia metoda pozyskiwania swoistych przeciwciał IgY oraz uzyskane dane dotyczące ich skuteczności wpisują się w misję działalności badawczo-wdrożeniowej Immunolab, ukierunkowanej na poprawę stanu zdrowia zwierząt gospodarskich i pośrednio zdrowia publicznego.

8 Wnioski

1. Wśród terenowych izolatów *Campylobacter jejuni* pochodzących z polskich ferm drobiu stwierdzono zróżnicowanie genotypowe, fenotypowe i biochemiczne. U jednego z analizowanych izolatów wykazano brak czterech badanych genów wirulencji (*flaC*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*), co może wpływać na zdolność kolonizacji i patogenność.
2. Opracowana i zoptymalizowana w ramach pracy metoda izolacji swoistych przeciwciał IgY z żółtek jaj kur niosek, immunizowanych inaktywowanymi antygenami *C. jejuni*, jest ekonomiczna, powtarzalna i możliwa do wdrożenia w warunkach przemysłowych, z zachowaniem przyjętych w firmie Immunolab wymagań norm ISO 9001 i ISO 13485.
3. W badaniach *in vitro* wykazano, że swoiste IgY skutecznie ograniczają wzrost i przeżywalność *C. jejuni*, przy czym efekt był zależny od stężenia przeciwciał. Wyniki te potwierdzają funkcjonalny potencjał IgY wobec tego patogenu.
4. W modelu *in vivo* porównanie schematów podania wykazało, że podanie doustne w połączeniu z dodatkową iniekcją generowało wyższy poziom swoistych IgY w surowicy oraz IgA w treści

jelitowej niż samo podanie doustne. Mimo to droga doustna pozostaje rozwiązaniem prostszym, bezpieczniejszym i korzystniejszym dla dobrostanu zwierząt, co ma istotne znaczenie wdrożeniowe.

5. Uzyskane wyniki, mimo ograniczeń badania *in vivo*, wskazują na potencjał wykorzystania przeciwciał IgY w ograniczaniu kolonizacji jelit drobiu przez *C. jejuni*. Stanowią także podstawę do dalszych prac optymalizacyjnych i walidacyjnych w warunkach zbliżonych do praktyki produkcyjnej.

Przeprowadzone badania potwierdziły postawioną w pracy hipotezę, że swoiste przeciwciała IgY, pozyskane po immunizacji kur inaktywowanymi antygenami *C. jejuni*, wchodzi w istotne interakcje z patogenem i układem odpornościowym brojlerów, wpływając na przebieg odpowiedzi humoralnej oraz mogące ograniczać kolonizację przewodu pokarmowego^{64,66,103}. Równocześnie udało się opracować metodę ich pozyskiwania o potencjale wdrożeniowym, zgodną z zasadami One Health⁷³ – zakładającą poprawę stanu zdrowia ludzi poprzez redukcję rezerwuaru zoonotycznego u zwierząt gospodarskich^{15,23}. Wyniki pracy dostarczają zarówno nowych danych o biologii zakażeń *C. jejuni*, jak i praktycznych podstaw do projektowania przyszłych rozwiązań immunoprofilaktycznych dla drobiu⁴⁹.

9 Odwołania

1. Gundogdu, O. & Wren, B. W. Microbe profile: *Campylobacter jejuni* – survival instincts. *Microbiology (United Kingdom)* 166, 230–232 (2020).
2. Bolton, D. J. *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiology* vol. 48 99–108 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.017> (2015).
3. Macé, S., Haddad, N., Zagorec, M. & Tresse, O. Influence of measurement and control of microaerobic gaseous atmospheres in methods for *Campylobacter* growth studies. *Food Microbiology* vol. 52 169–176 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.07.014> (2016).
4. Nachamkin, I., Blaser, M. J. & Tompkins, L. S. *Campylobacter Jejuni: Current Status and Future Trends*. (American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1992).
5. Bronowski, C., James, C. E. & Winstanley, C. Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiol Lett* 356, (2014).
6. On, S. L. W. *Taxonomy of Campylobacter, Arcobacter, Helicobacter and Related Bacteria: Current Status, Future Prospects and Immediate Concerns*.
7. Battersby, T., Walsh, D., Whyte, P. & Bolton, D. J. *Campylobacter* growth rates in four different matrices: broiler caecal material, live birds, Bolton broth, and brain heart infusion broth. *Infect Ecol Epidemiol* 6, (2016).
8. Bosquez, J. M., Parker, C. T., Pascoe, B. & Cooper, K. K. Growth rates and Metabolic Traits Differentiate *Campylobacter jejuni* Strains by Diarrheal Manifestation. Preprint at <https://doi.org/10.1101/2025.04.24.650550> (2025).
9. Sellars, M. J., Hall, S. J. & Kelly, D. J. Growth of *Campylobacter jejuni* supported by respiration of fumarate, nitrate, nitrite, trimethylamine-N-oxide, or dimethyl sulfoxide requires oxygen. *J Bacteriol* 184, 4187–4196 (2002).
10. Hofreuter, D. Defining the metabolic requirements for the growth and colonization capacity of *Campylobacter jejuni*. *Front Cell Infect Microbiol* 4, (2014).
11. Waite, D. W. *et al.* Addendum: Comparative genomic analysis of the class Epsilonproteobacteria and proposed reclassification to Epsilonbacteraeota (phyl. nov.) [Front. Microbiol., 8, (2017), (682)] doi:

- 10.3389/fmicb.2017.00682. *Frontiers in Microbiology* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00772> (2018).
12. Costa, D. & Iraola, G. Pathogenomics of emerging *Campylobacter* species. *Clin Microbiol Rev* 32, (2019).
 13. Natsos, G. *et al.* The genus *Campylobacter*: Detection and isolation methods, species identification & typing techniques. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 70, 1327–1338 (2019).
 14. The European Union One Health 2023 Zoonoses report. *EFSA Journal* 22, (2024).
 15. Hermans, D. *et al.* Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. *Veterinary Research* vol. 42 Preprint at <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-82> (2011).
 16. Guerry, P. *et al.* Changes in flagellin glycosylation affect *Campylobacter* autoagglutination and virulence. *Mol Microbiol* 60, (2006).
 17. Allos, M. *Campylobacter Jejuni Infections: Update on Emerging Issues and Trends*. <http://cid.oxfordjournals.org/> (2001).
 18. Godschalk, P. C. R. *et al.* The crucial role of *Campylobacter jejuni* genes in anti-ganglioside antibody induction in Guillain-Barré syndrome. *Journal of Clinical Investigation* 114, (2004).
 19. Konkel, M. E. *et al.* Identification of a fibronectin-binding domain within the *Campylobacter jejuni* CadF protein. *Mol Microbiol* 57, (2005).
 20. Awad, W. A., Hess, C. & Hess, M. Re-thinking the chicken–*Campylobacter jejuni* interaction: a review. *Avian Pathology* vol. 47 Preprint at <https://doi.org/10.1080/03079457.2018.1475724> (2018).
 21. Szymanski, C. M., Ruijin, Y., Ewing, C. P., Trust, T. J. & Guerry, P. Evidence for a system of general protein glycosylation in *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol* 32, 1022–1030 (1999).
 22. Parkhill, J. *et al.* The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 403, (2000).
 23. Van Deun, K. *et al.* Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. *J Med Microbiol* 56, 1284–1289 (2007).
 24. Veronese, P. & Dodi, I. *Campylobacter jejuni/coli* Infection: Is It Still a Concern? *Microorganisms* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3390/microorganisms12122669> (2024).
 25. Sałamaszyńska-Guz, A. *et al.* Increased Motility in *Campylobacter jejuni* and Changes in Its Virulence, Fitness, and Morphology Following Protein Expression on Ribosomes with Altered RsmA Methylation. *Int J Mol Sci* 25, 9797 (2024).
 26. Eaton, K. A. *et al.* *Campylobacter Pylori* Virulence Factors in Gnotobiotic Piglets. *INFECTION AND IMMUNITY* vol. 57 <https://journals.asm.org/journal/iai> (1989).
 27. Golden, N. J. & Acheson, D. W. K. Identification of motility and autoagglutination *Campylobacter jejuni* mutants by random transposon mutagenesis. *Infect Immun* 70, 1761–1771 (2002).
 28. Volk, M., Gundogdu, O. & Klančnik, A. Temporal dynamics of gene expression during the development of *Campylobacter jejuni* biofilms. *Microb Genom* 11, (2025).
 29. Buelow, D. R., Christensen, J. E., Neal-Mckinney, J. M. & Konkel, M. E. *Campylobacter jejuni* survival within human epithelial cells is enhanced by the secreted protein CiaI. *Mol Microbiol* 80, 1296–1312 (2011).

30. Silva, J. *et al.* Campylobacter spp. As a foodborne pathogen: A review. *Frontiers in Microbiology* vol. 2 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00200> (2011).
31. Vandamme, P., Debruyne, L., De Brandt, E. & Falsen, E. Reclassification of *Bacteroides ureolyticus* as *Campylobacter ureolyticus* comb. nov., and emended description of the genus *Campylobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* vol. 60 2016–2022 Preprint at <https://doi.org/10.1099/ijs.0.017152-0> (2010).
32. Tejera, N. *et al.* Genome-Scale Metabolic Model Driven Design of a Defined Medium for *Campylobacter jejuni* M1cam. *Front Microbiol* 11, (2020).
33. Stahl, M., Butcher, J. & Stintzi, A. Nutrient acquisition and metabolism by *Campylobacter jejuni*. *Frontiers in cellular and infection microbiology* vol. 2 5 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00005> (2012).
34. Thompson, S. A. & Gaynor, E. C. *Campylobacter jejuni* Host Tissue Tropism: A Consequence of Its Low-Carb Lifestyle? *Cell Host and Microbe* vol. 4 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.10.010> (2008).
35. Ramić, D. *et al.* The Role of luxS in *Campylobacter jejuni* Beyond Intercellular Signaling . *Microbiol Spectr* 11, (2023).
36. Fields, J. A., Li, J., Gulbranson, C. J., Hendrixson, D. R. & Thompson, S. A. *Campylobacter jejuni* CsrA regulates metabolic and virulence associated proteins and is necessary for mouse colonization. *PLoS One* 11, (2016).
37. Fischer, G. H., Hashmi, M. F. & Paterek, E. *Campylobacter Infection*. (StatPearls Publishing, 2024).
38. Yang, Y. *et al.* A Historical Review on Antibiotic Resistance of Foodborne *Campylobacter*. *Frontiers in Microbiology* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01509> (2019).
39. Adiguzel, M. C. *et al.* Phenotypic and genotypic examination of antimicrobial resistance in thermophilic *Campylobacter* species isolated from poultry in Turkey. *Journal of Veterinary Research (Poland)* 62, 463–468 (2018).
40. Luangtongkum, T. *et al.* Antibiotic resistance in *Campylobacter*: Emergence, transmission and persistence. *Future Microbiology* vol. 4 Preprint at <https://doi.org/10.2217/17460913.4.2.189> (2009).
41. Willison, H. J., Jacobs, B. C. & van Doorn, P. A. Guillain-Barré syndrome. *The Lancet* vol. 388 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00339-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00339-1) (2016).
42. Sadek, S. A. S., Shaapan, R. M. & Barakat, A. M. A. *Campylobacteriosis* in Poultry: A Review. *Journal of World's Poultry Research* vol. 13 Preprint at <https://doi.org/10.36380/jwpr.2023.19> (2023).
43. Hermans, D. *et al.* Passive immunization to reduce *Campylobacter jejuni* colonization and transmission in broiler chickens. *Vet Res* 45, (2014).
44. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial resistance and Foodborne outbreaks in the European Union in 2005. *EFSA Journal* 4, (2006).
45. Meade, K. G. *et al.* Comparative in vivo infection models yield insights on early host immune response to *Campylobacter* in chickens. *Immunogenetics* 61, 101–110 (2009).
46. Bucher, O., Waddell, L., Greig, J. & Smith, B. A. Systematic review-meta-analysis of the effect of chilling on *Campylobacter* spp. during primary processing of broilers. *Food Control* 56, (2015).

47. Dogan, O. B., Aditya, A., Ortuzar, J., Clarke, J. & Wang, B. A systematic review and meta-analysis of the efficacy of processing stages and interventions for controlling *Campylobacter* contamination during broiler chicken processing. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 21, (2022).
48. Fadzirul Anwar Zainol, M. *et al.* *Campylobacteriosis and Control Strategies against Campylobacters in Poultry Farms. Journal of Microbiology and Biotechnology* vol. 34 987–993 Preprint at <https://doi.org/10.4014/jmb.2311.11045> (2024).
49. Lin, J. *Novel Approaches for Campylobacter Control in Poultry.* (2009) doi:10.1089/fpd.2008.0247.
50. Wernicki, A., Nowaczek, A. & Urban-Chmiel, R. Bacteriophage therapy to combat bacterial infections in poultry. *Virol J* 14, (2017).
51. Johnson, T. J., Shank, J. M. & Johnson, J. G. Current and potential treatments for reducing *Campylobacter* colonization in animal hosts and disease in humans. *Frontiers in Microbiology* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00487> (2017).
52. Wieczorek, K., Kania, I. & Osek, J. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolated from poultry carcasses in Poland. *J Food Prot* 76, (2013).
53. Barroug, S., Chaple, S. & Bourke, P. Combination of Natural Compounds With Novel Non-thermal Technologies for Poultry Products: A Review. *Frontiers in Nutrition* vol. 8 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.628723> (2021).
54. Pokhrel, D. *et al.* Roles of Aerotolerance, Biofilm Formation, and Viable but Non-Culturable State in the Survival of *Campylobacter jejuni* in Poultry Processing Environments. *Microorganisms* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112165> (2022).
55. Carvalho, D. *et al.* Development of Predictive Modeling for Removal of Multispecies Biofilms of *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli*, and *Campylobacter jejuni* from Poultry Slaughterhouse Surfaces. *Foods* 13, (2024).
56. Wyszynska, A., Kobierecka, P. & Jagusztyn-Krynicka, K. E. Advancements In Developing Anti-*Campylobacter* Vaccine For Poultry. *Postępy Mikrobiologii - Advancements of Microbiology* 58, 385–398 (2019).
57. Phongsisay, V. *et al.* *Campylobacter* vaccination of poultry: Clinical trials , quantitative microbiological methods and decision support tools for the control of *Campylobacter* in poultry. *Int J Food Microbiol* 9, (2015).
58. Hansson, I., Sandberg, M., Habib, I., Lowman, R. & Engvall, E. O. Knowledge gaps in control of *Campylobacter* for prevention of campylobacteriosis. *Transbound Emerg Dis* 65, (2018).
59. Poly, F., Noll, A. J., Riddle, M. S. & Porter, C. K. Update on *Campylobacter* vaccine development. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* vol. 15 Preprint at <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1528410> (2019).
60. Sharafutdinov, I., Linz, B., Tegtmeyer, N. & Backert, S. Therapeutic and protective approaches to combat *Campylobacter jejuni* infections. *Frontiers in Pharmacology* vol. 16 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1572616> (2025).
61. Sudjarwo, S. A., Eraiko, K., Sudjarwo, G. W. & Koerniasari. The potency of chicken egg yolk immunoglobulin (IgY) specific as immunotherapy to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Adv Pharm Technol Res* 8, (2017).
62. Müller, S., Schubert, A., Zajac, J., Dyck, T. & Oelkrug, C. IgY antibodies in human nutrition for disease prevention. *Nutrition Journal* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s12937-015-0067-3> (2015).

63. Lee, L., Samardzic, K., Wallach, M., Frumkin, L. R. & Mochly-Rosen, D. Immunoglobulin Y for Potential Diagnostic and Therapeutic Applications in Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.696003> (2021).
64. Capotă, R., Ciaușu-Sliwa, D., Bostănaru-Iliescu, A.-C., Năstasă, V. & Mareș, M. Latest Findings in Immunoglobulin Y Technologies and Applications. *Int J Mol Sci* 26, 6380 (2025).
65. Okamoto, M. *et al.* FcRY is a key molecule controlling maternal blood IgY transfer to yolks during egg development in avian species. *Front Immunol* 15, (2024).
66. Gharaibeh, S. & Mahmoud, K. Decay of maternal antibodies in broiler chickens. *Poult Sci* 92, 2333–2336 (2013).
67. Bižanov, G. IgY extraction and purification from chicken egg yolk. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* vol. 68 265–282 Preprint at <https://doi.org/10.12681/jhvms.15466> (2017).
68. Nilsson, E., Hanrieder, J., Bergquist, J. & Larsson, A. Proteomic characterization of IgY preparations purified with a water dilution method. *J Agric Food Chem* 56, 11638–11642 (2008).
69. Abadeen, Z. U. Salutary Effects of anti-Clostridium perfringens Type A Egg Yolk Antibodies (IgY) on Growth Performance and Hemato-Biochemical Parameters in Experimentally Infected Broiler Chicken. *The Pakistan Veterinary Journal* 41, (2021).
70. Karamzadeh-Dehaghani, A., Towhidi, A., Zhandi, M., Mojgani, N. & Fouladi-Nashta, A. Combined effect of probiotics and specific immunoglobulin Y directed against Escherichia coli on growth performance, diarrhea incidence, and immune system in calves. *Animal* 15, (2021).
71. Han, S., Wen, Y., Yang, F. & He, P. Chicken Egg Yolk Antibody (IgY) Protects Mice Against Enterotoxigenic Escherichia coli Infection Through Improving Intestinal Health and Immune Response. *Front Cell Infect Microbiol* 11, (2021).
72. Grzywa, R., Łupicka-Słowik, A. & Sienćzyk, M. IgYs: on her majesty's secret service. *Frontiers in Immunology* vol. 14 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1199427> (2023).
73. WHO, FAO & WOA. *Taking a Multisectoral, One Health Approach: A Tripartite Guide to Addressing Zoonotic Diseases in Countries*. <https://www.fao.org/publications/card/en/c/CA2942EN/> (2019).
74. *Microbiology of the Food Chain — Horizontal Method for Detection and Enumeration of Campylobacter Spp. — Part 1: Detection Method*. (2017).
75. Kim, J. *et al.* Metagenomic analysis of isolation methods of a targeted microbe, Campylobacter jejuni, from chicken feces with high microbial contamination. *Microbiome* 7, (2019).
76. Smibert, R. & Krieg, N. Phenotypic characterization. In *Methods for General and Molecular Bacteriology*, pp. *American Society for Microbiology* DC:, (1994).
77. Nachamkin, I. & Barbagallo, S. Culture confirmation of Campylobacter spp. by latex agglutination. *J Clin Microbiol* 28, (1990).
78. Yadav, R., Yadav, J., Maherchandani, S. & Kashyap, S. K. Typing of Campylobacter jejuni isolated from poultry on the basis of flaA-RFLP by various restriction enzymes. *Vet Anim Sci* 6, 1–5 (2018).
79. Cheng, J., Shoffner, M. A., Hvichia, G. E., Kricka, L. J. & Wilding, P. *Chip PCR. II. Investigation of Different PCR Amplification Systems in Microfabricated Silicon-Glass Chips*. *Nucleic Acids Research* vol. 24 (1996).
80. Biswas, D., Hannon, S. J., Townsend, H. G. G., Potter, A. & Allan, B. J. Genes coding for virulence determinants of Campylobacter jejuni in human clinical and cattle isolates from Alberta, Canada, and their potential role in colonization of poultry. *International Microbiology* 14, 25–32 (2011).

81. Talukder, K. A. *et al.* Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. *J Clin Microbiol* 46, 1485–1488 (2008).
82. Oh, E., McMullen, L. M., Chui, L. & Jeon, B. Differential survival of hyper-aerotolerant *Campylobacter jejuni* under different gas conditions. *Front Microbiol* 8, (2017).
83. Modi, S., Brahmabhatt, M. N., Chatur, Y. A. & Nayak, J. B. Prevalence of *Campylobacter* species in milk and milk products, their virulence gene profile and antibiogram. *Vet World* 8, 1–8 (2015).
84. Palma, V., Gutiérrez, M. S., Vargas, O., Parthasarathy, R. & Navarrete, P. Methods to Evaluate Bacterial Motility and Its Role in Bacterial–Host Interactions. *Microorganisms* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030563> (2022).
85. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition.* (2015).
86. Alonso-Calleja, C., Carballo, J., Capita, R., Bernardo, A. & García-López, M. L. Evaluation of the spiral plating method for the enumeration of microorganisms throughout the manufacturing and ripening of a raw goat's milk cheese. *J Food Prot* 65, (2002).
87. Wagle, B. R. *et al.* Carvacrol attenuates *Campylobacter jejuni* colonization factors and proteome critical for persistence in the chicken gut. *Poult Sci* 99, (2020).
88. Van Deun, K. *et al.* Colonization strategy of *Campylobacter jejuni* results in persistent infection of the chicken gut. *Vet Microbiol* 130, (2008).
89. Kovacs-Nolan, J. & Mine, Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. *Annu Rev Food Sci Technol* 3, 163–182 (2012).
90. Kassim, N., Mtenga, A. B., Shim, W. B. & Chung, D. H. The in vitro and in vivo efficacy of hen IgY against *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. *J Microbiol Biotechnol* 22, 1423–1431 (2012).
91. Hänel, I. *et al.* Genomic and phenotypic changes of *Campylobacter jejuni* strains after passage of the chicken gut. *Vet Microbiol* 136, (2009).
92. Thibodeau, A. *et al.* Extensive characterization of *campylobacter jejuni* chicken isolates to uncover genes involved in the ability to compete for gut colonization Microbial genetics, genomics and proteomics. *BMC Microbiol* 15, (2015).
93. Chalghoumi, R., Théwis, A., Portetelle, D. & Beckers, Y. Production of hen egg yolk immunoglobulins simultaneously directed against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in the same egg yolk. *Poult Sci* 87, (2008).
94. Tong, C., Geng, F., He, Z., Cai, Z. & Ma, M. A simple method for isolating chicken egg yolk immunoglobulin using effective delipidation solution and ammonium sulfate. *Poult Sci* 94, (2015).
95. Schade, R. *et al.* Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *ATLA Alternatives to Laboratory Animals* vol. 33 Preprint at <https://doi.org/10.1177/026119290503300208> (2005).
96. Pauly, D., Chacana, P. A., Calzado, E. G., Brembs, B. & Schade, R. IgY technology: Extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation. *Journal of Visualized Experiments* (2011) doi:10.3791/3084.
97. Polson, A., Coetzer, T., Kruger, J., von Maltzahn, E. & van der Merwe, K. J. Improvements in the isolation of igy from the yolks of eggs laid by immunized hens. *Immunol Invest* 14, (1985).

98. Polson, A., von Wechmar, M. B. & van Regenmortel, M. H. V. Isolation of viral ige antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol Invest* 9, (1980).
99. Annika Bergenstr hle & Anna Heijbel. *A Novel, Rapid Procedure for Purification of IgY from Egg Yolk*, CY14244-08Jun20-AN. [chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-11504-pdf](https://efaidnbnmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-11504-pdf) (2020).
100. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, (1970).
101. Tille, P. M. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. Sustainability (Switzerland)* vol. 11 (2019).
102. AKITA, E. M. & NAKAI, S. Immunoglobulins from Egg Yolk: Isolation and Purification. *J Food Sci* 57, (1992).
103. Rahman, S., Van Nguyen, S., Icatlo, F. C., Umeda, K. & Kodama, Y. Oral passive IgY-based immunotherapeutics: A novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* vol. 9 Preprint at <https://doi.org/10.4161/hv.23383> (2013).
104. Bustos, C. P., Leiva, C. L., Gambarotta, M., Guida, N. & Chacana, P. A. In vitro Inhibitory Activity of IgY Antibodies Against Salmonella Ser. Newport Isolated from Horses. *J Equine Vet Sci* 103, (2021).
105. Solhi, R., Alebouyeh, M., Khafri, A., Rezaeifard, M. & Aminian, M. In vitro evaluation of cross-strain inhibitory effects of IgY polyclonal antibody against H. pylori. *Microb Pathog* 110, 682–687 (2017).
106. Li, X. *et al.* Chicken egg yolk antibody (IgY) controls solobacterium moorei under in vitro and in vivo conditions. *Appl Biochem Biotechnol* 168, 1448–1458 (2012).
107. Ibrahim, E. S. M. *et al.* In vitro and in vivo effectiveness of egg yolk antibody against Candida albicans (anti-CA IgY). *Vaccine* 26, (2008).
108. Kaufmann, S. H. E. & Kabelitz, D. *Methods in Microbiology: Immunology of Infection*. (Academic Press, London, 2002).
109. Piekarska, A. *et al.* The choice of the anchoring protein influences the interaction of recombinant Bacillus spores with the immune system. *Acta Biochim Pol* 64, (2017).
110. Bolton, D. J. Campylobacter virulence and survival factors. *Food Microbiology* vol. 48 99–108 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.017> (2015).
111. Czoska, P. *et al.* Growth-Inhibitory Effect of Chicken Egg Yolk Polyclonal Antibodies (IgY) on Zoonotic Pathogens Campylobacter jejuni, Salmonella spp. and Escherichia coli, In Vitro. *Int J Mol Sci* 26, (2025).
112. Chagneau, S., Gaucher, M. Lou, Th riault, W. P., Fravalo, P. & Thibodeau, A. Observations supporting hypothetical commensalism and competition between two Campylobacter jejuni strains colonizing the broiler chicken gut. *Front Microbiol* 13, (2023).
113. Ziprin, R. L., Droleskey, R. E., Hume, M. E. & Harvey, R. B. Failure of viable nonculturable Campylobacter jejuni to colonize the cecum of newly hatched leghorn chicks. *Avian Dis* 47, (2003).
114. Lara-Tejero, M. & Gal n, J. E. CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. *Infect Immun* 69, (2001).
115. Neal-McKinney, J. M. & Konk l, M. E. The Campylobacter jejuni CiaC virulence protein is secreted from the flagellum and delivered to the cytosol of host cells. *Front Cell Infect Microbiol* 2, (2012).

116. Guerry, P. *Campylobacter* flagella: not just for motility. *Trends in Microbiology* vol. 15 456–461 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.09.006> (2007).
117. Hatta, H., Kim, M. & Yamamoto, T. A novel isolation method for hen egg yolk antibody, “IGY”. *Agric Biol Chem* 54, (1990).
118. Park, S. F. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* 74, (2002).
119. Shini, S., Huff, G. R., Shini, A. & Kaiser, P. Understanding stress-induced immunosuppression: Exploration of cytokine and chemokine gene profiles in chicken peripheral leukocytes. *Poult Sci* 89, (2010).
120. Vošmerová, P. *et al.* Transport-induced Changes in Selected Biochemical Indices in Broilers as Affected by Ambient Temperatures. *Acta Veterinaria Brno* 79, (2010).

10 Spis Rycin

Rycina 1. Obraz uzyskany metodą skaningowej mikroskopii elektronowej przedstawiający <i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> .	6
Rycina 2. Struktury powierzchniowe <i>Campylobacter jejuni</i> .	7
Rycina 3. Drogi transmisji bakterii <i>Campylobacter jejuni</i> oraz główne objawy kliniczne u ludzi.	11
Rycina 4. Liczba zgłoszonych przypadków wybranych zoonoz w krajach Unii Europejskiej w 2023 roku.	12
Rycina 5. Porównanie budowy przeciwciał: IgY (kurze) i IgG (ssacze).	14
Rycina 6. Schemat ogólny izolacji przeciwciał IgY z żółtek jaj immunizowanych kur.	28
Rycina 7. Graficzny schemat czasowy badania <i>in vivo</i> .	32
Rycina 8. Krzywe wzrostu szczepów <i>C. jejuni</i> CJ5 (panel A), CJ6 (panel B) oraz CJ10 (panel C) na podstawie pomiaru zmętnienia hodowli w skali McFarlanda (McF) w kolejnych punktach czasowych (0–48 h).	40
Rycina 9. Liczba komórek (CFU/ml) szczepów <i>C. jejuni</i> CJ5, CJ6 oraz CJ10 w różnych punktach czasowych inkubacji.	41
Rycina 10. Stężenie przeciwciał IgY (mg/ml) uzyskanych różnymi metodami izolacji.	42
Rycina 11. Badanie czystości przeciwciał IgY izolowanych różnymi metodami za pomocą elektroforezy SDS-PAGE.	44
Rycina 12. Wyniki pomiarów absorbancji w teście ELISA dla różnych rozcieńczeń próbek izolowanych różnymi metodami.	45
Rycina 13. Wpływ różnych stężeń przeciwciał IgY (0,05–0,5 mg/ml) na przeżywalność <i>C. jejuni</i> w warunkach <i>in vitro</i> .	48
Rycina 14. Zmiany stężenia przeciwciał IgY w surowicy piskląt (μg/ml) w kolejnych punktach czasowych w różnych grupach badawczych.	49
Rycina 15. Poziom przeciwciał IgA w jelitach piskląt po eutanazji.	50
Rycina 16. Stężenia interleukin w treści jelit piskląt w różnych punktach czasowych po zakażeniu <i>C. jejuni</i> .	51

11 Spis Tabel

Tabela 1. Czynniki wirulencji <i>Campylobacter jejuni</i> .	9
Tabela 2. Szczepy <i>Campylobacter jejuni</i> wykorzystane w badaniu.	19
Tabela 3. Sekwencje starterów, produkty PCR oraz warunki reakcji dla wybranych genów <i>Campylobacter jejuni</i> .	25
Tabela 4. Etapy testu ELISA wykorzystywanego w celu oznaczenia swoistości izolowanych przeciwciał IgY.	31
Tabela 5. Szczegóły badania <i>in vivo</i> - oznaczenia, wielkości grup oraz skład preparatów i dawkowanie.	33

Tabela 6. Etapy metody ELISA używanej do testów <i>in vivo</i> .	35
Tabela 7. Wyniki oznaczeń serologicznych wykonane testem lateksowym Microgen Campylobacter.	37
Tabela 8. Obecność poszczególnych genów oznaczonych reakcją PCR.	38
Tabela 9. Wyniki oznaczeń biochemicznych wykonanych testem API Campy (BioMérieux).	39
Tabela 10. Wyniki testów ruchliwości.	39
Tabela 11. Wyniki oznaczeń testu aglutynacji probówkowej.	44