

Joanna Jadwiga Klim<sup>1</sup>, Renata Godlewska<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Wpłynęło w czerwcu 2016 r.  
Zaakceptowano we wrześniu 2016 r.

1. Wprowadzenie. 2. Biogeneza pęcherzyków zewnątrzblonowych. 3. Funkcje pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. 3.1. Udział w odpowiedzi na czynniki stresogenne. 3.2. Udział w transporcie pozakomórkowym. 3.3. Udział w tworzeniu biofilmu. 4. Pęcherzyki zewnątrzblonowe w konstrukcji szczepionek. 4.1. *Neisseria meningitidis*. 4.2. *Vibrio cholerae*. 4.3. *Bordetella pertussis*. 4.4. *Chlamydia trachomatis*. 4.5. *Burkholderia pseudomallei*. 4.6. *Acinetobacter baumannii*. 4.7. *Francisella noatunensis*. 4.8. *Shigella* spp. 4.9. *Campylobacter jejuni*. 5. Podsumowanie

#### Application of the bacterial outer membrane vesicles in vaccine design

**Abstract:** Outer membrane vesicles (OMVs) are extracellular structures produced by most gram-negative bacteria, including pathogens of humans and animals. OMVs play an important role in the physiology of microorganisms and are an integral part of many biological processes. Following the discovery that they are able to transport many biomolecules, also these which have the ability to interact with the immune system, their potential use as non-replicating vaccines has become an important aspect of immunotherapeutic researches. These nano-sized elements exhibit remarkable potential for immunomodulation of immune response, thanks to the ability to deliver naturally or artificially incorporated antigens within their structure. First vaccine based on outer membrane vesicles was developed almost 30 years ago against *Neisseria meningitidis* serogroup B. This review presents some basic information on biogenesis and functions of OMVs. It also provides examples of pathogens, whose OMVs (in natural or modified form) have been used in the development of immunogenic vaccines against the organisms from which the vesicles had been obtained. OMVs are proving to be more versatile than first conceived and may become important part of biotechnology research, not limited to medical applications.

1. Introduction. 2. Outer membrane vesicles biogenesis. 3. Biological functions of outer membrane vesicles. 3.1. Role in response to stressors. 3.2. Role in the extracellular transport. 3.3. Role in biofilm formation. 4. OMVs in vaccine construction. 4.1. *Neisseria meningitidis*. 4.2. *Vibrio cholerae*. 4.3. *Bordetella pertussis*. 4.4. *Chlamydia trachomatis*. 4.5. *Burkholderia pseudomallei*. 4.6. *Acinetobacter baumannii*. 4.7. *Francisella noatunensis*. 4.8. *Shigella* spp. 4.9. *Campylobacter jejuni*. 5. Conclusions

**Słowa kluczowe:** antygeny rekombinowane, immunomodulacja, pęcherzyki zewnątrzblonowe (OMVs – *outer membrane vesicles*), szczepionki nowej generacji

**Key words:** immunomodulation, new generation vaccines, outer membrane vesicles, recombinant antigens

## 1. Wprowadzenie

Pęcherzyki zewnątrzblonowe (OMVs – *outer membrane vesicles*) – to sferyczne struktury uwalniane z powierzchni komórek bakterii Gram-ujemnych. Po raz pierwszy zaobserwowano je 50 lat temu podczas analizy zdjęć z mikroskopu elektronowego komórek szczepu mutanta *E. coli* hodowanych w warunkach niedoboru lizyny. Wiele bakterii otoczonych było charakterystycznymi pęcherzykami (blebs), często połączonymi z błoną zewnętrzną. W czasie prowadzenia hodowli zmiana ulegała morfologia osłon bakterii, przy jednoczesnym braku wzrostu ilości komórek ulegających lizie [40].

Za początek badań nad OMVs uważa się eksperyment przeprowadzony w 1959 roku. Naukowcy zaobserwowali odpowiedź immunologiczną u królików po podaniu im wolnego od bakterii supernatantu po hodowli *Vibrio cholerae*. Wtedy podejrzewano, że za

reakcję układu odpornościowego odpowiedzialne są składniki błony zewnętrznej (OM – *outer membrane*), które z niejasnych przyczyn pozostają w oczyszczonym płynie pochodzącym [15].

Wielkość OMVs waha się w przedziale od 20 do 300 nm i w głównej mierze zależy od szczepu producenta [7]. Do tej pory opisano wiele gatunków mikroorganizmów zdolnych do wytwarzania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, w tym liczne grono bakterii patogennych, takich jak: *Neisseria meningitidis*, *Legionella pneumophila*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Porphyromonas gingivalis* czy *Campylobacter jejuni*.

Pęcherzyki zewnątrzblonowe składają się z podwójnej błony lipidowej, która podobnie jak błona zewnętrzna bakterii zbudowana jest z lipopolisacharydu, fosfolipidów oraz białek błonowych. Skład białkowy różni się w zależności od gatunku producenta i od warunków hodowli bakterii [41]. Obok białek

\* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; e-mail: renatag@biol.uw.edu.pl

pochodzących z peryplazmy coraz częściej wskazuje się na obecność w świetle pęcherzyków również białek cytoplazmatycznych i białek związanych z błoną wewnętrzną bakterii (IM – inner membrane). Początkowo podejrzewano, że jest to wynik źle przeprowadzonych izolacji OMVs lub ma to związek z zanieczyszczeniami pochodzącymi ze zlizowanych komórek. Jednakże po dopracowaniu protokołu oczyszczania OMVs w dalszym ciągu identyfikowano białka pochodzenia cytoplazmatycznego [42].

Pęcherzyki obok białek mogą zawierać również kwasy nukleinowe. Po raz pierwszy obecność DNA wykazano w przypadku OMVs *Haemophilus parainfluenzae* [36]. Podobnie jak w przypadku białek cytoplazmatycznych obecność DNA w tych strukturach zewnątrzkomórkowych uważano za artefakty preparatyki. Sugerowano, że kwas deoksyrybonukleinowy wiąże się do dodatnio naładowanej powierzchni pęcherzyka, ale potraktowanie OMVs deoksyrybonukleazami potwierdziło, że identyfikowane fragmenty DNA znajdowały się w świetle pęcherzyków [58].

Jak się okazuje, zdolność do produkcji pęcherzyków nie jest jedynie domeną bakterii Gram-ujemnych. Otóż Gurung i wsp. wykazali, że *Staphylococcus aureus* wytwarza tzw. pęcherzyki błonowe (MVs – membrane – derived vesicles) będące pochodną błony cytoplazmatycznej i składające się głównie z białek obecnych w cytoplazmie, związanych z błoną, jak również z białek sekrecyjnych [25]. Wcześniej zjawisko to opisano dla *Bacillus anthracis* [59] i dwóch przedstawicieli archeonów [18, 56].

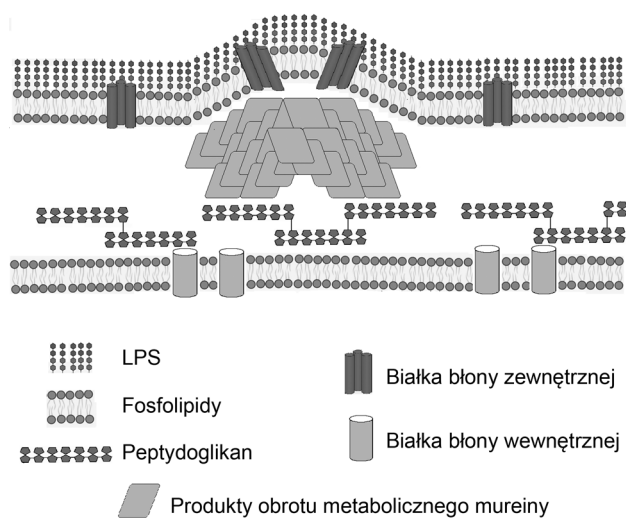
## 2. Biogeneza pęcherzyków zewnątrz błonowych

Ścieżka syntezy pęcherzyków nie jest znana. Istnieje kilka hipotez wyjaśniających mechanizmy tego procesu.

Pierwsza z nich zakłada, że OMVs tworzą się wtedy, gdy synteza mureiny zachodzi wolniej niż leżącej nad nią błony zewnętrznej. Rozrastająca się błona podlega wyrzucaniu, a jej nadmiar ostatecznie odrywa się od komórki w postaci pęcherzyka.

Drugi zaproponowany model odnosi się do obrotu metabolicznego peptydoglikanu (Rys. 1). U bakterii Gram-ujemnych struktury cukrowo-peptydowe powstałe w czasie reorganizacji ściany komórkowej nie są uwalniane poza komórkę, lecz są zatrzymywane w peryplazmie przez co mogą fizycznie oddziaływać na OM prowadząc do jej fałdowania i powstania OMVs [84]. Model ten nie tłumaczy jednak jak cząsteczki pochodzące z cytoplazmy pakowane są do OMVs.

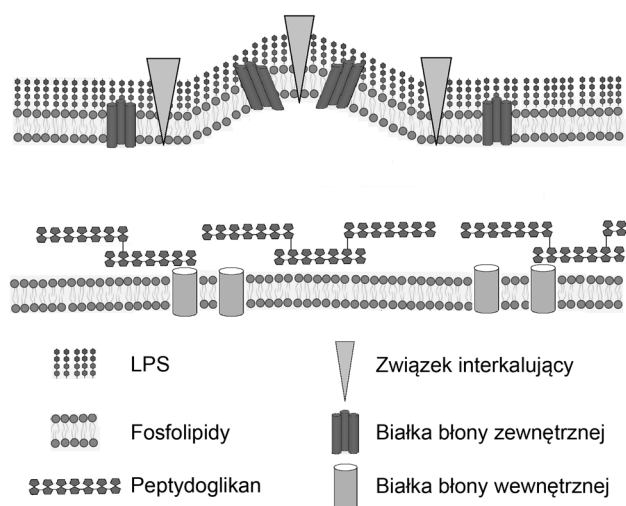
Część naukowców wskazuje, że przyczyną powstawania pęcherzyków zewnątrz błonowych jest obecność w błonie zewnętrznej ujemnie naładowanych cząsteczek lipopolisacharydu. Błona zewnętrzna patogennej



Rys. 1. Powstawanie pęcherzyków zewnątrz błonowych jako wynik obrotu metabolicznego mureiny

bakterii *Pseudomonas aeruginosa* składa się z dwóch rodzajów lipopolisacharydu, z czego jeden z nich posiada silnie ujemny ładunek. Okazuje się, że OMVs tworzą się głównie w miejscach, w których występuje LPS o silnie ujemnym ładunku, co potwierdza jego przeważająca zawartość w błonach pęcherzyków. Najprawdopodobniej dzieje się tak dlatego, że długie, ujemnie naładowane łańcuchy lipopolisacharydu odpychają się od siebie powodując uwypuklenie i fałdowanie błony zewnętrznej, które ostatecznie kończy się powstaniem pęcherzyka [35].

Kolejny mechanizm wyjaśniający zjawisko powstawania OMVs związany jest z oddziaływaniem na błonę zewnętrzną bakterii pozakomórkowych cząsteczek sygnałowych [46]. Naukowcy udowodnili, że niektóre związki powiązane ze zjawiskiem quorum-sensing u bakterii, silnie łączą się z OM (Rys. 2). Wbudowując



Rys. 2. Powstawanie pęcherzyków zewnątrz błonowych jako wynik oddziaływania związków interkalujących w strukturę OM

się w jej strukturę powodują odpychanie łańcuchów lipopolisacharydu i wiązanie jonów metali, co pogłębia proces dezorganizacji błony i ostatecznie powoduje jej fałdowanie i oderwanie pęcherzyka.

Tworzenie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych może bezpośrednio wynikać ze zmiany składu białkowego OM. Błona zewnętrzna połączona jest z peptydoglikanem i błoną wewnętrzną za pomocą specyficznych białek, których ilość wpływa na poziom integralności tych elementów. Zaobserwowano, że mutanty *Salmonella enterica* sv. Typhimurium LT2 pozbawione ekspresji niektórych białek zapewniających łączność osłon (np. LppAB, OmpA, TolB, TolA czy Pal) charakteryzują się podwyższoną produkcją OMVs [16].

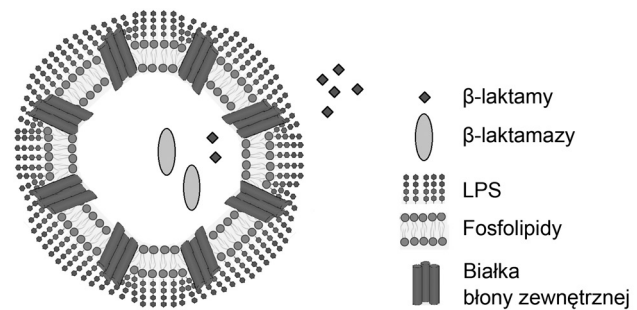
Kolejna z hipotez opiera się na założeniu, że istnieją białka, których nadprodukcja w komórce powoduje wzmożone wydzielanie pęcherzyków. Przykładem może być białko PagC wyrażane w komórkach *Salmonella enterica* w sytuacji, gdy bakteria znajduje się w fagosomie makrofaga. Badania potwierdziły istnienie pozytywnej korelacji między ilością PagC, a produkcją pęcherzyków. Co więcej, stwierdzono, że wraz ze wzrostem poziomu tego białka nie tylko proces powstawania OMV ulega przyspieszeniu, ale również rośnie ilość uwalnianych OMVs [37].

### 3. Funkcje pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

Dawniej stwierdzenie, że pęcherzyki zewnątrzblonowe, to struktury niezbędne do przetrwania bakterii budziłyby liczne sprzeczności. Dziś, w obliczu tego co wiadomo na ich temat nie dziwi fakt, że większość badaczy jest zdania, że OMVs odgrywają bardzo istotną rolę w fizjologii bakterii Gram-ujemnych i stanowią nieodłączny element wielu procesów biologicznych. Niektóre z tych ról opisano poniżej.

#### 3.1. Udział w odpowiedzi na czynniki stresogenne

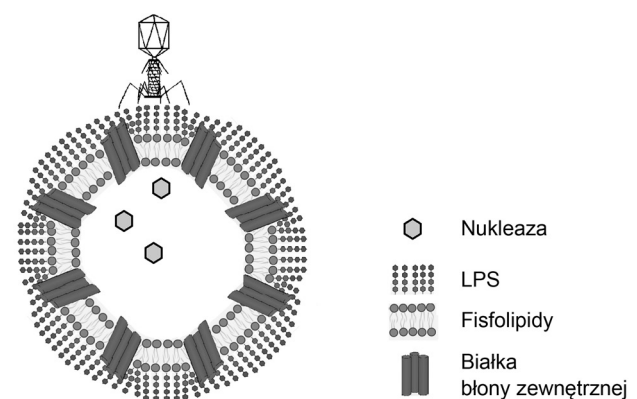
W warunkach stresu, np. w przypadku obecności toksyn, antybiotyków lub podczas narażenia na czynniki uszkadzające powierzchnię komórek, zwykle rośnie ilość wydzielanych pęcherzyków. Dzięki produkcji OMVs komórki są w stanie sprawnie pozbyć się szkodliwych substancji i źle zwiniętych białek. Mimo, że indukcja wydzielania OMVs wymaga znacznych nakładów energii, korzyści związane z tym procesem są niewspółmierne do poniesionych kosztów [47]. Mutanty *E. coli*, wykazujące ekstremalnie wysoki stopień wydzielania OMVs charakteryzowały się wyższą przeżywalnością na podłożu z polimyksyną B w porównaniu do szczepu dzikiego [45]. Ciekawym przykładem jest sposób eliminowania antybiotyków  $\beta$ -laktamowych przez *Pseudomonas aeruginosa*. Szczep *P. aeruginosa*



Rys. 3. Degradacja antybiotyków  $\beta$ -laktamowych przez  $\beta$ -laktamazy w świetle pęcherzyka

oporny na te antybiotyki wytwarza pęcherzyki zewnątrzblonowe zawierające  $\beta$ -laktamazy (Rys. 3). Dzięki temu, że błona OMVs podobnie jak OM zawiera porony tworzące kanały dyfuzyjne,  $\beta$ -laktamy obecne w środowisku dyfundują do wnętrza pęcherzyków, a następnie ulegają inaktywacji przez znajdujące się tam enzymy [63].

Bakterie wykształciły różne mechanizmy zwalczania fagów, do których zaliczyć również można produkcję OMVs (Rys. 4). Stwierdzono, że wynikiem interakcji bakteriofaga T4 z pęcherzykami zewnątrzblonowymi *E. coli* jest nieodwracalna utrata aktywności faga. Powyższe badania popierają koncepcję, iż OMVs mogą stanowić „przynętę” w celu ochrony komórek przed czynnikami przeciwdrobnoustrojowymi [44].



Rys. 4. Produkcja pęcherzyków zewnątrzblonowych w celu ochrony komórek przed atakiem fagów

#### 3.2. Udział w transporcie pozakomórkowym

Pęcherzyki zewnątrzblonowe zaangażowane są w transport szeregu związków, m.in. biorą udział w transferze DNA [81] i dostarczają do komórek eukariotycznych wiele czynników wirulencji, które znajdują się – zarówno w świetle pęcherzyka jak i na jego powierzchni [45]. Najważniejszą zaletą transportu pęcherzykowego jest to, że substancja dostarczana jest do docelowej lokalizacji w relatywnie wysokim stężeniu, a sam transport może odbywać się na większe

odległości w porównaniu do typowej sekrecji. Może on przebiegać na drodze fuzji błony OMV i błony komórki docelowej, internalizacji pęcherzyka w procesie fagocytozy lub poprzez przyłączenie się pęcherzyka do komórki docelowej i jego częściowej lizy [8, 23, 34].

OMVs biorą także udział w przenoszeniu enzymów wspomagających bakterie w zdobywaniu niezbędnych składników odżywczych i pierwiastków. Proteazy, tak jak np. aminopeptydazy *P. aeruginosa* transportowane zarówno w świetle jak i na powierzchni pęcherzyków pozwalają na degradację związków wielkocząsteczkowych i uwalnianie do środowiska aminokwasów, które mogą mieć decydujące znaczenie dla przetrwania bakterii w określonych warunkach [5]. Podobnie ma się sprawa z jonami metali w sytuacji ich niedoboru w środowisku. Błona pęcherzyka może zawierać specyficzne białka odpowiedzialne za wiązanie jonów na jego powierzchni, co pozwala na koncentrację ich stężenia w sąsiedztwie bakterii [42].

### 3.3. Udział w tworzeniu biofilmu

Jedną z reakcji bakterii na stres jest wytwarzanie wielokomórkowych, skomplikowanych struktur otoczonych pozakomórkową matryks. Ostatnie badania wskazują na dodatnią korelację pomiędzy ilością wydzielanych pęcherzyków, a zdolnością bakterii do tworzenia

biofilmu [6]. W przypadku *Helicobacter pylori* OMVs zaangażowane są w proces agregacji komórek [82]. Sugeruje się również, że pęcherzyki pełnią funkcję pośrednika w interakcji komórek bakteryjnych, egzopolisacharydów, DNA i białek z powierzchnią, do której przytwierdzony jest dany biofilm [65].

W przedstawionej poniżej tabeli (Tab. I) zebrano przykłady funkcji pęcherzyków w różnych procesach fizjologicznych wraz z przykładami bakterii je produkującymi.

### 4. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe w konstrukcji szczepionek

Infekcje bakteryjne są wciąż jedną z głównych przyczyn hospitalizacji milionów ludzi na świecie. Leczenie chorób bakteryjnych staje się coraz trudniejsze ze względu na szybkie rozprzestrzenianie się i wzrost liczby szczepów opornych na stosowane w leczeniu antybiotyki. Za najlepszy sposób radzenia sobie z infekcjami w trwającej właśnie „erze postantybiotycznej” uznaje się immunizację społeczeństwa – czyli stosowanie szczepionek. Tradycyjne szczepionki opierają się na zastosowaniu żywych, atenuowanych komórek bądź zabitych patogenów lub na zastosowaniu anatoksyn – czyli toksyn pozbawionych zjadliwości, ale o zachowanych właściwościach antygenowych. Niestety, dla wielu patogenów skonstruowanie bezpiecznej, skutecznej i w pełni specyficznej szczepionki, której produkcja opierałaby się na klasycznych metodach otrzymywania nie jest możliwe.

Po odkryciu, że OMVs transportują wiele biomolekuł wykazujących zdolność do wywołania przeciwnie sobie odpowiedzi układu odpornościowego, ich potencjał jako niereplikujących szczepionek nowej generacji stał się ważnym aspektem badań immunoterapeutycznych [75].

Pierwsza szczepionka zawierająca pęcherzyki zewnątrzkomórkowe opracowana została prawie 30 lat temu. Był to preparat przeciwko meningokokowemu zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych, które wywołuje *Neisseria meningitidis* serotyp B. Skuteczność tej szczepionki sięgała ponad 80% [68].

W rzeczywistości, do roku 2010 jedynymi komercyjnie dostępnymi szczepionkami opartymi na OMVs były te skierowane przeciwko *Neisseria meningitidis*. Sukcesy związane z ich medycznym zastosowaniem skłoniły naukowców do badań nad właściwościami pęcherzyków zewnątrzkomórkowych innych bakterii Gram-ujemnych. Szczególnie istotnym aspektem tych badań było określenie w jakim stopniu pęcherzyki wpływają na układ odpornościowy i czy są one zdolne do wywołania swoistej odpowiedzi immunologicznej. Na podstawie powyższych kryteriów wyłoniono wiele bakterii patogennych, których OMVs w przyszłości

Tabela I  
Przykłady funkcji OMVs powiązanych z wybranymi procesami fizjologicznymi [za 45]

Funkcja	Przykłady bakterii Gram-ujemnych
Transport DNA Transformacja	<i>A. tumefaciens</i> , <i>B. burgdorferi</i> , <i>E. coli</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sv. <i>Typhimurium</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>Y. pestis</i>
Transport innych cząsteczek (w tym czynników wirulencji)	<i>E. agglomerans</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>M. morgani</i> , <i>N. meningitidis</i> , <i>P. trifolii</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fragi</i> , <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sv. <i>Typhimurium</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>V. cholerae</i>
Odpowiedź na czynniki stresogenne działające na osłony komórkowe	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> sv. <i>Typhimurium</i>
Ochrona przed czynnikami antydrobnoustrojowymi	<i>E. coli</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. putida</i>
Tworzenie i utrzymanie biofilmu	<i>H. pylori</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Biominalizacja Absorbacja UV Działanie owadobójcze Reaktywność redoks	<i>S. putrefaciens</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>X. nematophilus</i>

mogłyby posłużyć w konstrukcji szczepionek. Są to m.in. *Acinetobacter baumannii*, *Brucella melitensis*, *Francisella novicida*, *Haemophilus influenzae*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *Treponema pallidum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Borrelia burgdorferi*, *Bordetella pertussis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pestis* i wiele innych [13, 60]. Niektóre z przykładów przedstawiono bardziej szczegółowo poniżej.

#### 4.1. *Neisseria meningitidis*

Co roku z powodu zakażeń *N. meningitidis* choruje 1,2 mln ludzi na całym świecie, z czego 10% umiera. Ta będąca dwoinką bakteria, należąca do klasy Betaproteobacteria kolonizuje błony śluzowe górnych dróg oddechowych człowieka (występuje jako normalna flora bakteryjna w nosogardzieli 5–15% dorosłych osób), z których czasami przechodzi do płynu mózgowo-rdzeniowego i krwiobiegu, powodując zagrażające życiu zapalenie opon mózgowych i posocznice [72].

Do tej pory zidentyfikowano trzynaście grup serologicznych *N. meningitidis* w oparciu o antygenowe różnice polisacharydów otoczki. Najpowszechniejszymi z nich są serogrupy: A, B, C, W i Y, które odpowiadają za 90% wszystkich zachorowań na meningokokowe zapalenie opon mózgowych na świecie.

W przypadku meningokoków, polisacharydowa otoczka okazała się być cennym narzędziem w tworzeniu skutecznych szczepionek, niestety z wyłączeniem grupy serologicznej B, która odpowiada za 30–80% zachorowań mieszkańców krajów Ameryki Łacińskiej, Europy i USA. Otóż serotyp B *Neisseria meningitidis* zawiera w osłonach homopolimery kwasu N-acetylonauraminowego, które wchodzą w skład ludzkich glikoprotein w tkance mózgu [22]. To determinowało niską immunogenność szczepionki tworzonej na bazie otoczki [80]. Dopiero zastosowanie OMVs pozwoliło na stworzenie skutecznego preparatu. Prace nad szczepionką rozpoczęto od wytypowania potencjalnie najlepszych antygenów. Odpowiednimi kandydatami okazały się białka PorA i PorB, ze względu na wysoki poziom ekspresji w komórce i wysoką immunogenność [66]. OMVs do produkcji szczepionek uzyskiwano przy użyciu ekstrakcji detergentem, otrzymując tzw. dOMVs. Metoda ta pozwala na produkcję jednorodnych pęcherzyków ze zmniejszoną zawartością lipopolisacharydu, będącego silną endotoksyną, ale wciąż na poziomie, który zapewnia utrzymanie prawidłowej struktury pęcherzyka i wzmocnienie poszczepiennej odpowiedzi na podane antygeny.

Skonstruowane w ten sposób szczepionki, tzw. I generacji (first-generation vaccines based on outer membrane vesicles) okazały się być skuteczne, ale w wąskim zakresie, co wynika z dużej różnorodności białek PorA i PorB wśród szczepów serogrupy B [73].

Dzięki analizie genomu szczepu MC58 *N. meningitidis* zidentyfikowano 350 genów potencjalnych antygenów, które następnie wprowadzano do komórek *Escherichia coli*. Nadprodukcja badanych białek w heterologicznym gospodarzu i immunizacja myszy tak przygotowanymi antygenami umożliwiła wyłonienie najbardziej immunogennych cząsteczek [55]. Ostatecznie, do konstrukcji szczepionki wybrano 5 antygenów, które połączono w rekombinowane białka, w tym:

- NHBA (*Neisseria heparin binding antigen*) – antygen *Neisseria* wiążący heparynę
- NadA (*Neisseria meningitidis adhesin A*) – adhezyna A biorąca udział w inwazji bakterii na komórkę nabłonkową
- fHbp (*factor H binding protein*) – białko wiążące surowiczy czynnik H

Badania na zwierzętach dowiodły znacznej skuteczności i szerszego zakresu ochrony przed zakażeniami *N. meningitidis* serotypem B, w porównaniu do wcześniej stosowanych szczepionek I generacji [67]. Nową szczepionkę o nazwie Bexsero®, opatentowaną przez firmę Novartis do 2014 roku dopuszczono do użytku w 34 krajach, w tym w Kanadzie, Australii i państwach Unii Europejskiej. Firma Novartis zapoczątkowała erę szczepionek nowej generacji (next generation OMVs vaccines).

Kaaijk i wsp. powrócili do pomysłu szczepionki z białkiem PorA. Stworzyli genetycznie zmodyfikowany szczep, który wyraża różne warianty tego białka. Tak powstały szczepionki HexaMen® (zawierająca pęcherzyki dwóch szczepów, wyrażających po trzy różne wersje białka PorA) i NonaMen® (trzy różne szczepy, każdy wyrażający trzy różne warianty PorA). Jak wynika z badań klinicznych, oba preparaty są skuteczne, dobrze tolerowane i bezpieczne w użyciu [33].

Kolejnym krokiem w rozwoju szczepionek przeciwko serotypowi B *N. meningitidis* opartych na OMVs było stworzenie preparatów o obniżonej zawartości lipopolisacharydu, tak by ich produkcja wykluczała konieczność stosowania ekstrakcji detergentem. Metoda ta skutkuje utratą wielu lipoprotein, co obniża ogólny potencjał immunogeny pęcherzyków [76]. Problem rozwiązano dzięki odkryciu genu *lpxL1*. Mutacja w tym genie związana jest z modyfikacją lipidu A, która skutkuje obniżeniem toksyczności lipopolisacharydu, przy jednoczesnym braku wpływu na jego właściwości jako adiuwantu [77].

Obecnie trwają próby stworzenia multiwalentnej szczepionki przeciwko serogrupom A, W i X [51]. Serotypy te odpowiadają za większość zachorowań w Afryce. Do tej pory badaniu klinicznemu pierwszej fazy poddana jest biwalentna szczepionka z antygenami serotypów A i W, uzyskana ze szczepów najczęściej identyfikowanych w ogniskach zakaźnych meningokokowego zapalenia opon mózgowych [1].

Tabela II  
Przykłady szczepionek opartych o użycie OMVs przeciwko meningokokowemu zapaleniu opon mózgowych

Nazwa szczepionki	Charakterystyka	Producent
VA-MENGOC-BC*	Zaprojektowana do zwalczania wybuchu choroby meningokokowej na Kubie (przeciwko serogroupom B i C). Skuteczność ok. 80% [27].	Finlay Institute, Vacunas Finlay S.A.
MenBvac*	Opracowana w Norwegii w związku z epidemią choroby w latach 1988–91. Skuteczność sięga 87% [17].	Norwegian Institute of Public Health
MeNZB*	Opracowana w Norwegii, nigdy niedopuszczona do użytku w tym kraju. Stosowana podczas epidemii w Nowej Zelandii. Skuteczność ponad 75%.	Norwegian Institute of Public Health, Chiron Vaccines
Bexsero*	Szczepionka stymuluje wytwarzanie przeciwciał rozpoznających antygeny NHBA, NadA, fHbp i PorA. Wysoka skuteczność [2].	Novartis
Trumenba*	Produkt dopuszczony do użytku w USA od 2014 roku. Skład obejmuje dwa warianty białka fHbp. Preparat został uznany za całkowicie bezpieczny.	Pfizer
HexaMen*	Zawiera OMVs dwóch rekombinowanych szczepów – każdy z nich wyraża trzy warianty białka PorA. Skuteczność ponad 50% [52].	National Institute of Public Health and Environment (RIVM)
NonaMen*	Preparat zawiera OMVs trzech rekombinowanych szczepów – łącznie składa się z 9 wersji białka PorA. Szacowana skuteczność wynosi 80% [33].	National Institute of Public Health and Environment (RIVM)

W przedstawionej powyżej tabeli (Tab. II) zebrano informacje dotyczące opatentowanych szczepionek anty-*Neisseria* wraz z ich charakterystyką.

#### 4.2. *Vibrio cholerae*

Bakterie *Vibrio cholerae* należące do klasy Gamma-proteobacteria są czynnikiem etiologicznym cholery. Choroba ta przenoszona jest drogą fekalno-oralną i charakteryzuje się obfitą, wodnistą biegunką, prowadzącą do odwodnienia, a często także, w przypadku nieleczenia, do śmierci. Najważniejszymi czynnikami chorobotwórczymi *V. cholerae* jest produkcja pili TCP (toxin-coregulated pilus), które ułatwiają przyleganie do mikrokosmków gospodarza i uwalnianie egzotoksyny [38]. Od 2000 roku na świecie odnotowuje się stały wzrost liczby zachorowań na cholere. Duże ogniska epidemii występują w krajach rozwijających się na terenie Afryki i Azji. Według oficjalnych danych przekazanych do WHO, na świecie notuje się ok. 200 000 przypadków tej choroby rocznie. WHO ocenia jednak, że zgłaszanych jest jedynie 5–10% przypadków [62].

Do tej pory zidentyfikowano 200 serogrup tego gatunku, ale za epidemie cholery odpowiadają wyłącznie szczepy *V. cholerae* O1 i w mniejszym stopniu O139. Te dwie spokrewnione serogrupy wyróżnia unikalna kompozycja i struktura lipopolisacharydu w błonie. *V. cholerae* O1 dalej dzieli się na biotyp klasyczny i El Tor [11].

Na rynku farmaceutycznym istnieją komercyjnie dostępne szczepionki przeciwko *V. cholerae* na bazie zabitych bądź atenuowanych bakterii, niemniej jednak nie zapewniają one długoterminowej ochrony. Obecnie żadna szczepionka nie jest licencjonowana do użytku dla dzieci w wieku poniżej 2 lat i żaden z dostępnych na rynku preparatów nie chroni przed cholera wywołaną przez serotyp O139 [64].

Rozwiązaniem problemu może okazać się zastosowanie pęcherzyków zewnątrzblonowych. Schild i wsp. opublikowali badania, w których wykazali, że podanie myszom preparatów z oczyszczonymi OMVs *V. cholerae* (donosowo, dożołądkowo lub dootrzewnowo) wywołuje trwałą i wysoki poziom produkcji przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom obecnym w pęcherzykach, 1000-krotnie wyższy niż w grupie kontrolnej.

Co więcej, samica przekazuje przeciwciała przeciwko antygenom *V. cholerae* potomstwu, co chroni je przed zakażeniem [64]. W Indiach powstała multiwalentna szczepionka nazwana w skrócie CPMVs (*ch*olera *p*entavalent OMVs) z pęcherzyków zewnątrzblonowych pięciu szczepów, obejmujących serotypy O1, O139 i O6. Wyniki badań potwierdzają jej właściwości immunogenne i zdolność pobudzania układu odpornościowego myszy do produkcji przeciwciał różnych klas. W tym przypadku również potomstwo immunizowanych samic uzyskiwało odporność na zakażenia *V. cholerae*. Niewątpliwie CPMVs ma potencjał, by stać się podstawą licencjonowanej szczepionki przeciwko cholere, dlatego, że zapewnia ochronę przed większością chorobotwórczych szczepów [71].

#### 4.3. *Bordetella pertussis*

Krztusiec to ostra choroba układu oddechowego, charakteryzująca się nawracającymi napadami kaszlu i przedłużającą się dusznością. Chorobę wywołują pałeczki *Bordetella pertussis*, wykazujące wysokie powinowactwo do komórek rzęskowych nabłonka oddechowego. Patogeneza tego gatunku związana jest z produkcją adhezyn i toksyn. Choroba podlega transmisji poprzez kontakt bezpośredni lub kichanie. Szacuje się, że na całym świecie rocznie występuje ok. 20 milionów zachorowań. Obecnie na rynku farmaceutycznym dostępne są dwa rodzaje szczepionek przeciwko

krztuscowi: pierwsza z nich oparta jest na zastosowaniu zabitych bakterii, druga natomiast to preparat bezkomórkowy w skład którego wchodzi immunogenne składniki, takie jak fimbrie, toksyna krztuszcowa PT (pertussis toxin), hemaglutynina, i pertaktyna [43].

Pomimo szeroko zakrojonego programu szczepień, krztusiec powraca nie tylko wśród dzieci, lecz również wśród dorosłych. Przypuszczalnie odpowiedzialna za to jest zbyt niska skuteczność dostępnych preparatów immunogennych. Alternatywnym podejściem jest konstrukcja szczepionek na bazie OMVs.

Fernández i wsp. przeprowadzili badania z użyciem pęcherzyków, w których potwierdzili ich wysoką skuteczność w zapobieganiu chorobie, na mysim modelu krztusca. Po 2 tygodniach od podania szczepionki gryzoniom infekowano *B. pertussis*. Myszy immunizowane preparatem wykazywały wysoki poziom ochrony przed rozwojem choroby (wynoszący ok. 90%) w porównaniu do zwierząt, którym aplikowano roztwór PBS (ok. 12%). Po czterech dniach od infekcji, w wymazach z płuc osobników grupy badanej nie identyfikowano żywych bakterii, w przeciwieństwie do wymazów z narządów oddechowych grupy kontrolnej [20].

#### 4.4. *Chlamydia trachomatis*

Drobnoustroje z rodzaju *Chlamydia* sp. są pasywnymi wewnątrzkomórkowymi charakteryzującymi się cyklem życiowym, w którym bakterie występują w dwóch formach morfologicznych – jako zakaźne ciała elementarne (EBs – elementary bodies) i nieinfekcyjne ciała siateczkowate (RBs – reticulate bodies). *Chlamydia* sp. występują powszechnie w przyrodzie i wywołują wiele schorzeń u ludzi i zwierząt [53].

Początkiem konstrukcji szczepionki przeciw *Chlamydia trachomatis* były analizy *in silico* genomu bakterii, w celu wytypowania potencjalnie najbardziej immunogennych antygenów. Finco i wsp. wyselekcjonowali 120 białek, a do oceny ich immunogenności posłużyły eksperymenty mające na celu sprawdzenie zdolności stymulacji produkcji IFN- $\gamma$  i specyficznych limfocytów T (badania *in vitro* na splenocytach myszy). Ostatecznie wybrano 7 białek. Dalsze badania prowadzone były na ortologicznych odpowiednikach tych białek z *Chlamydia muridarum* na mysim modelu zapalenia płuc. Potwierdziły one wysoką skuteczność w indukcji odpowiedzi komórkowej i humoralnej [21]. Jednym z wytypowanych do badań białek była silnie konserwowana ewolucyjnie proteaza serynowa – HtrA (*high temperature requirement A protease*). Enzym odpowiada za usuwanie nieprawidłowo zwiniętych białek [12]. Gen proteazy *C. muridarum* został wprowadzony do komórek *E. coli*, a wyrażone białko identyfikowano w produkowanych przez *E. coli* pęcherzykach zewnątrzblonowych, którymi ostatecznie

immunizowano myszy BALB/c. Wynikiem była indukcja produkcji specyficznych przeciwciał anti-HtrA. Co więcej, badania *in vitro* udowodniły, że surowica myszy immunizowanych preparatem HtrA-OMVs neutralizuje zakażenia *Chlamydia* sp. na poziomie znacznie wyższym, niż surowica myszy immunizowanej tylko białkiem HtrA lub tylko OMVs [4]. Zgromadzone dane stanowią solidną podstawę do dalszych badań w kierunku zastosowania pęcherzyków jako bazy pod szczepionkę przeciwko *Chlamydia* sp.

#### 4.5. *Burkholderia pseudomallei*

Pałeczki *Burkholderia pseudomallei* wywołują melioidozę – tropikalną chorobę ludzi i zwierząt podobną w przebiegu do nosacizny, gruźlicy lub duru brzuszego. Może ona występować w jednej lub kilku postaciach klinicznych, np. jako ostre, miejscowe zakażenie, w postaci płucnej lub posocznicy. Często prowadzi do śmierci chorego. Do zakażenia dochodzi poprzez uszkodzoną skórę, drogi oddechowe lub przewód pokarmowy, a głównym źródłem pałeczek jest zanieczyszczona woda i gleba. Melioidoza występuje głównie w krajach południowej Azji i północnej Australii [79]. Choroba ta jest trudna w leczeniu ze względu na naturalną oporność *B. pseudomallei* na wiele antybiotyków. Obecnie na rynku nie ma żadnej komercyjnie dostępnej szczepionki przeciwko melioidozie, chociaż kilka preparatów jest testowanych w badaniach przedklinicznych [69].

Nieves i wsp. wykazali, że OMVs *B. pseudomallei* indukują produkcję specyficznych przeciwciał, nawet bez udziału egzogennej adiuwanty. Co więcej, badania na myszach udowodniły, że preparat immunogeny zawierający pęcherzyki zewnątrzblonowe podawany podskórnie zapewnia wysoki poziom ochrony w przypadku zakażenia *B. pseudomallei*, natomiast podawany donosowo nie wywołuje dostatecznego efektu ochronnego [49].

W późniejszych badaniach przeprowadzono również test aktywności bakteriobójczej surowicy. Szczep K96243 *B. pseudomallei* inkubowano w pożywce z dodatkiem bydlęcej surowicy płodowej – FBS (fetal bovine serum) lub z dodatkiem FBS wzbogaconej o surowicę myszy immunizowanych pęcherzykami zewnątrzblonowymi. Po inkubacji określano liczbę zdolnych do przeżycia bakterii wysiewając je w różnych rozcieńczeniach na podłoże stałe. Wyniki potwierdziły obecność we krwi gryzoni immunoglobulin skierowanych przeciwko *B. pseudomallei*. Po inkubacji z surowicą myszy wcześniej immunizowanych OMVs stwierdzono znaczny spadek ilości żywych bakterii. W przypadku inkubacji pałeczek *Burkholderia* w roztworze FBS zaobserwowano wzrost liczby bakterii w porównaniu do początkowej ich ilości [50].

#### 4.6. *Acinetobacter baumannii*

Wśród Gram-ujemnych pałeczek, do których zalicza się m.in. takie patogeny, jak *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* czy *Burkholderia cepacia* wyróżnić również można bakterie rodzaju *Acinetobacter*.

W praktyce najczęściej izoluje się szczepy należące do gatunku *A. baumannii*, które stanowią ponad 70% klinicznych izolatów. Bakterie te są patogenami oportunistycznymi odgrywającymi coraz większą rolę w zakażeniach pacjentów leczonych na oddziałach intensywnej terapii. Wywołują przede wszystkim zakażenia układu oddechowego, a także bakteriemie, zakażenia układu moczowego, skóry i ran czy zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych lub wsierdza. Rzadko powiązane są z zakażeniami pozaszpitalnymi.

Leczenie infekcji wywołanych przez *A. baumannii* jest trudne, ponieważ wysoki odsetek szczepów tych bakterii posiada oporność na wiele, a czasami na wszystkie skuteczne niegdyś antybiotyki [61].

W związku z tym, istnieje konieczność opracowania nowych leków, ale przede wszystkim konstrukcji skutecznej szczepionki anty-*Acinetobacter*.

Jun i wsp. udowodnili, że OMVs *A. baumannii* są cytotoksyczne w stosunku do komórek linii nabłonka ludzkiego (Hep-2). Uszkodzenia komórek oceniano przy użyciu mikroskopii odwróconej i za pomocą testu określającego stopień proliferacji komórek z użyciem WST 1 (water soluble tetrazolium salts). Zaobserwowano, że zaaplikowanie pęcherzyków w ilości  $\geq 20 \mu\text{g/ml}$  powoduje zmianę morfologii komórek Hep-2 (kurczenie lub zaokrąglenie) i ich odrywanie od podłoża. Określono również zdolność OMVs do wywołania reakcji prozapalnej. W tym celu izolowano RNA z Hep-2 potraktowanych wcześniej preparatem zawierającym pęcherzyki zewnątrz błonowe i przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji w celu uzyskania cDNA pięciu cytokin (IL-1b, IL-6, IL-8, MIP-1a (macrophage inflammatory protein – ludzkie białko zapalne makrofagów) i MCP-1 (monocyte chemotactic protein 1 – białko chemotaktyczne dla monocytów)). Komplementarny DNA posłużył do reakcji PCR w czasie rzeczywistym, pozwalającej na oszacowanie ilości kwasu deoksyrybonukleinowego. Okazało się, że komórki w odpowiedzi na OMVs transkrybują geny wszystkich badanych cytokin, a ich poziom zależy od dawki pęcherzyków. Jednocześnie potwierdzono działanie prozapalne preparatów pęcherzykowych w warunkach *in vivo* [32].

Porównano również, w warunkach *in vivo* nasilenie odpowiedzi prozapalnej powodowanej przez zakażenie komórek bakteriami z odpowiedzią wywołaną przez podanie preparatów pęcherzykowych. Okazuje się, że produkcja ww. cytokin jest znacznie wyższa w przypadku zaaplikowania pęcherzyków (o stężeniu  $15 \mu\text{g/ml}$ )

niż w przypadku odpowiedzi komórek na zakażenie komórkami *A. baumannii* [32].

Dotychczasowe wyniki badań nad OMVs *A. baumannii* stanowią obiecującą perspektywę na stworzenie szczepionki przeciwko schorzeniom wywołanym przez ten mikroorganizm. Po podaniu OMVs domięśniowo myszom (w trzech dawkach) zaobserwowano powstawanie specyficznych przeciwciał IgG, a w przypadku immunizacji donosowej również IgA. Poziom immunoglobulin był na tyle wysoki, że po zakażeniu zwierząt bakteriami *A. baumannii* i wywołaniu sepsy poziom przeżywalności zwierząt był 10-krotnie wyższy w grupie immunizowanej OMVs niż w grupie kontrolnej. Ponadto, myszy, którym podano surowicę ze specyficznymi przeciwciałami anty-*Acinetobacter* były całkowicie chronione przed zakażeniem tym patogenem, w przeciwieństwie do grupy kontrolnej, w której jedynie 20% myszy przeżyło infekcję [28].

#### 4.7. *Francisella noatunensis*

Rodzaj *Francisella* obejmuje trzy gatunki nieruchliwych, ściśle tlenowych pałeczek. Jeden z nich, *F. tularensis* jest wewnątrzkomórkowym patogenem człowieka. Progową dawką infekcyjną dla ludzi wynosi zaledwie 10 bakterii [29]. Cechą charakterystyczną typowych postaci tularemii jest nagły początek choroby z dreszczami, bólami mięśni i głowy, wysoką temperaturą, ogólnym rozbiciem, brakiem apetytu. Może również przebiegać łagodnie lub bezobjawowo. W miejscu wniknięcia patogenu następuje namnożenie bakterii i tworzenie owrzodzeń [39]. Drugi gatunek, *F. noatunensis* powoduje choroby ryb (francisellosis) odpowiedzialne za straty ekonomiczne w sektorze hodowli ryb. Znane są dwa podgatunki *Francisella noatunensis*, pierwszy z nich – *F. noatunensis* spp. *noatunensis* – infekuje ryby żyjące w wodach chłodniejszego klimatu, natomiast podgatunek *orientalis* bytuje w wodach klimatu cieplejszego. Obecnie nie ma żadnej komercyjnie dostępnej szczepionki przeciwko temu patogenowi, a wcześniej badana szczepionka oparta o atenuowane szczepy *Francisella noatunensis* okazała się być mało skuteczna [10].

Analiza LC-MS OMVs produkowanych przez *F. noatunensis* spp. *noatunensis* ujawniła obecność wielu białek związanych z wirulencją, w tym trzy białka kodowane przez geny będące częścią genów zgrupowanych w postaci wyspy patogenności FPI (*Francisella pathogenicity island*).

Brudal i wsp. przeprowadzili szczepienia dootrzewnowe ryb *Danio rerio*. Podawano  $40 \mu\text{g}$  OMVs zawieszonych w PBS lub aplikowano tylko PBS (grupa kontrolna). Po 32 dniach, część ryb infekowano *F. noatunensis* spp. *noatunensis* ( $10^8$  bakterii). Zaobserwowano, że grupa ryb nieimmunizowanych, a poddanych zakażeniu wykazywała takie objawy jak: zmniejszona ruchli-



wość, spadek masy ciała czy brak apetytu, co odpowiada symptomom choroby wywołanej przez pałeczki *Francisella*. Natomiast ryby immunizowane przed zakażeniem, nie wykazywały żadnych objawów chorobowych. Liczba bakterii w poszczególnych narządach była określana pośrednio za pomocą reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Analiza w oparciu o ilość DNA odpowiadającą wielkości genomu pojedynczej komórki *F. noatunensis* (tzw. ekwiwalent genomu) wykazała zmniejszoną liczbę bakterii w nerkach, śledzionie i sercu ryb immunizowanych pęcherzykami, w porównaniu do grupy kontrolnej (nieimmunizowanej OMVs) [9].

#### 4.8. *Shigella* spp.

Należące do rodziny *Enterobacteriaceae* pałeczki *Shigella* to Gram-ujemne, względnie beztlenowe, niezdolne do ruchu drobnoustroje. Gatunek *S. dysenteriae* obejmuje 13 serotypów, *S. flexneri* – 16 serotypów, *S. boydii* – 18 serotypów, a *S. sonnei* – 1 serotyp. *S. dysenteriae* wytwarza jedną z najsilniejszych toksyn, jaką jest toksyna Shiga. Pałeczki *S. sonnei* i *S. boydii* powodują zatrucia o łagodniejszym przebiegu niż szczepy *S. flexneri* i *S. dysenteriae*.

Szacuje się, że co roku ponad 150 milionów ludzi na świecie choruje na tzw. czerwonkę bakteryjną, z czego około milion przypadków kończy się śmiercią. Do wywołania choroby wystarczy niewielka liczba komórek bakteryjnych (10–100), które nie giną w kwaśnym środowisku żołądka. Zakażenia występują często u małych dzieci i ludzi starszych. Do najbardziej charakterystycznych objawów szigelozy należą gorączka, bóle brzucha i wodniste lub krwawe biegunki. Oporność na antybiotyki wśród rodzaju *Shigella* jest bardzo częsta i ciągle wzrasta [57].

Szczegółowa wiedza dotycząca epidemiologii zakażeń pozwala na wybór potencjalnych kandydatów do skutecznej szczepionki, umożliwiającej zapanowanie nad szigelozą. Od lat prowadzone są badania nad skutecznym preparatem anty-*Shigella*, który chroniłby przed zakażeniami spowodowanymi przez różne serotypy tego patogena [78].

Mitra i wsp. opracowali multiwalentną szczepionkę na bazie pęcherzyków zewnątrzblonowych o nazwie MOMVs (*multi-serotype outer membrane vesicles*), zawierającą antygeny sześciu szczepów *Shigella* spp. (*S. sonnei*, *S. dysenteriae* 1, *S. flexneri* 2a, 3a i 6 oraz *S. boydii* 4). Zastosowanie tych szczepów wiąże się z wykształceniem oporności na czerwonkę w skali globalnej, w związku z podobieństwem antygenowym do szerokiego grona innych pokrewnych serotypów. Wszystkie użyte w badaniu na myszach OMVs wykazywały podobny poziom immunogenności, a wywołana przez nie produkcja przeciwciał typu IgG utrzymywała się na wysokim poziomie, nawet w 120 dniu po ostatniej

dawce szczepionki. Badaniu poddano również zdolność surowicy myszy immunizowanych i nieimmunizowanych do opsonizacji drobnoustrojów, umożliwiającą ich fagocytozę przez komórki żerne. Wyniki pokazują, że bakterie inkubowane z mysią surowicą anty-MOMVs były skuteczniej fagocytowane i zabijane przez makrofagi w porównaniu do próby kontrolnej.

Zbadano również stopień odporności biernej nabytej u mysich noworodków. Czterodniowe myszy zakażano szczepami *Shigella* i określano ich przeżywalność. Większość potomstwa nieimmunizowanych samic wykazywała objawy choroby i ostatecznie nie przeżywała infekcji, w przeciwieństwie do potomstwa grupy samic immunizowanych MOMVs, w której śmiertelność młodych nie wynosiła więcej niż 10%. Jest to związane z przenikaniem przeciwciał wytworzonych przez układ immunologiczny matki przez łożysko podczas ciąży i podczas karmienia mlekiem [48].

#### 4.9. *Campylobacter jejuni*

Pałeczki *Campylobacter* są obecnie jednym z najczęściej izolowanych etiologicznych czynników zatrucia i zakażeń pokarmowych pochodzenia bakteryjnego w populacji ludzkiej. Zakażenia u ludzi wywołują głównie pałeczki należące do gatunków *C. jejuni*, *C. coli* i *C. lari*, spośród których najczęściej izolowany od pacjentów jest *C. jejuni* subsp. *jejuni* wywołujący ok. 90–95% przypadków kamylobakteriozy [70].

Gatunek *C. jejuni* powszechnie występuje w produktach pochodzenia zwierzęcego. Badania prowadzone w kierunku obecności pałeczek *Campylobacter* spp. na powierzchni tuszek drobiowych wykazały znaczne ich zanieczyszczenie, sięgające nawet 80%. Niebezpieczeństwo zakażenia niesie także spożycie zanieczyszczonej bakteriami wody lub kontakt ze zwierzętami domowymi i hodowlanymi [14]. Po przedostaniu się do przewodu pokarmowego człowieka i przetrwaniu w niesprzyjającym im, kwaśnym środowisku żołądka, pałeczki docierają do nabłonka jelita, gdzie przenikają przez śluzówkę i wnikają do komórek nabłonka jelitowego [83].

Zakażenie może przebiegać w sposób bezobjawowy lub prowadzić do występowania nudności, wymiotów, bólów brzucha, podwyższonej temperatury ciała, a przede wszystkim do ostrej biegunki z obecnością krwi w kale. Sporadycznie pałeczki *Campylobacter* mogą wywołać powikłania, takie jak reaktywne zapalenie stawów, zespół Guillaina-Barrégo (1% ludzi zakażonych), czy zespół Millera-Fischer'a [70].

Według danych Zakładu Epidemiologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego liczba zachorowań na kamylobakteriozę w naszym kraju w 2014 roku była dość niska i wynosiła 654 potwierdzonych przypadków [24]. W Polsce jest to nadal choroba, która nie jest wystarczająco często diagnozowana, rozpoznawana

i rejestrowana, dlatego trudno oszacować rzeczywistą liczbę przypadków i częstość występowania kamylobakteriozy w naszym kraju.

W większości przypadków zakażenia *C. jejuni* przemijają samoistnie, wymagając jedynie uzupełnienia płynów. Niemniej jednak, w niektórych przypadkach nieodzowne jest zastosowanie antybiotykoterapii. Zjawisko nasilającej się antybiotykooporności wynikające z często nieuzasadnionego stosowania antybiotyków w terapii ludzi jak i zwierząt przybiera coraz poważniejszą postać. Badania epidemiologiczne wykazują gwałtowny wzrost oporności na powszechnie stosowane terapie, co niewątpliwie utrudnia zwalczanie przypadków kamylobakteriozy, wydłużając czas leczenia lub powodując całkowitą nieskuteczność stosowanej terapii [26].

Prace nad szczepionką anty-*Campylobacter* dla ludzi wiążą się z ryzykiem wystąpienia chorób autoimmunologicznych, ze względu na podobieństwo lipooligosacharydu (LOS) *C. jejuni* do ludzkich glikosfingolipidów obecnych w komórkach nerwowych [74]. Dlatego wprowadzenie do powszechnego stosowania szczepień ochronnych drobiu – głównego rezerwuaru *Campylobacter jejuni*, wydaje się być bezpieczniejszą alternatywą w strategii zapobiegania przypadkom kamylobakteriozy u ludzi.

Od wielu lat różne ośrodki badawcze na całym świecie prowadzą badania nad stworzeniem skutecznej szczepionki anty-*Campylobacter* dla drobiu. Testowane propozycje można podzielić na preparaty skonstruowane w oparciu o zabite komórki drobnoustrojów tzw. CWC (*Campylobacter whole-cell* vaccines) oraz szczepionki podjednostkowe zawierające jedynie wybrane antygeny *Campylobacter* [30].

Jang i wsp. przeprowadzili analizę proteomiczną pęcherzyków zewnątrzkomórkowych *C. jejuni* szczepu NCTC11168 z zastosowaniem techniki spektrometrii mas. Badania proteomiczne potwierdziły obecność w OMVs białek warunkujących chorobotwórczość pałeczek *Campylobacter jejuni*, takich jak: czynniki adhezyjne (CadF, PEB1, MOMP, FlaC, FspA), białka budujące rzeskę (FlgE, FlgK, FliI, FliD i FliF, FlaA, FlaB), białka sekrecyjne (Cj0511) czy cytoletalna toksyna – CDT (cytolethal distending toxin) [31]. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe *C. jejuni* indukują produkcję wielu czynników związanych z niespecyficznymi mechanizmami obronnymi w organizmie człowieka. Jedną z najlepiej opisanych cytokin uwalnianych we wczesnej fazie zakażenia pałeczkami *Campylobacter* jest IL-8. Elmi i wsp. przeprowadzili eksperyment, w którym porównali stężenie wydzielanej interleukiny po inkubacji z komórkami *C. jejuni* 11168H i OMVs tego szczepu. Ilość produkowanej przez IECs (intestinal epithelial cells) IL-8 pod wpływem 100 µg OMVs była znacznie wyższa w porównaniu do komórek kontroli negatywnej, i oscylowała na podobnym poziomie

w odniesieniu do IECs inkubowanych z komórkami *C. jejuni*. Istotna statystycznie różnica występowała nawet przy zastosowaniu 10 µg OMVs [19].

## 5. Podsumowanie

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, początkowo obserwowane tylko w specyficznych warunkach hodowli, są obecnie nieodłączną częścią mikrobiologii. W ciągu ostatnich 50 lat stało się jasne, że ich wytwarzanie przez bakterie Gram-ujemne jest zjawiskiem powszechnym i typowym. Badania nad OMVs obecnie w dużej mierze obejmują poznanie ich roli w fizjologii bakterii, procesie patogenezy i interakcji ze środowiskiem zewnętrznym. OMVs stanowią alternatywną drogę wydzielania i transportu wielu białek i innych biomolekuł, w tym kwasów nukleinowych. Transport tego typu pozwala na interakcje ze środowiskiem pozakomórkowym, jednocześnie wykluczając ryzyko związane z kontaktem bezpośrednim np. z komórkami eukariotycznymi podczas procesu patogenezy. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe stały się ważnym narzędziem w walce z chorobami zakaźnymi. Zainicjowane do tej pory programy szczepienne przeciwko serotypowi B *Neisseria meningitidis* zdecydowanie dowodzą, iż warto inwestować w tworzenie szczepionek na bazie OMVs również w walce z innym bakteriami patogennymi.

Co więcej, obserwuje się stały wzrost zainteresowania OMVs jeśli chodzi o możliwości i drogi ich zastosowania – nie tylko w prewencji bakteryjnych chorób zakaźnych. Obecnie naukowcy coraz częściej skupiają się w swoich badaniach nad możliwością zmiany ich właściwości. Dzięki technikom biologii molekularnej można przeprogramować skład biomolekuł transportowanych przez OMVs (zarówno w ich świetle, jak i na ich powierzchni). To umożliwia przenoszenie unikalnych kombinacji antygenów, przeciwciał, receptorów czy różnego typu enzymów, co ostatecznie pozwoli na ich zastosowanie w różnych gałęziach biotechnologii.

Wprowadzanie specyficznych genów i wyrażanie rekombinowanych białek w komórkach producenta umożliwia optymalizację procesu produkcji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, a w konsekwencji tworzenie swoistych „minifabryk”, niezbędnych do wprowadzenia technologii związanej z OMVs na szeroką skalę. Kto wie, czy w przyszłości nie uda się stworzyć w pełni specyficznych, całkowicie nietoksycznych szczepionek na bazie OMVs, wywołujących wysoki poziom ochrony przed poszczególnymi drobnoustrojami? Możliwe, że w niedługim czasie pojawią się również inne zastosowania dla OMVs, jak np. ich wykorzystanie w procesach bioremediacji, przetwarzaniu materiałów drzewnych, diagnostyce, czy dostarczaniu leków w terapiach docelowych [3].

## Piśmiennictwo

- Acevedo R., Fernández S., Zayas C., Acosta A., Sarmiento M.E., Ferro V.A.: Bacterial outer membrane vesicles and vaccine applications. *Front. Immunol.* **5**, DOI: 10.3389/fimmu.2014.00121 (2014)
- Bai X., Findlow J., Borrow R.: Recombinant protein meningococcal serogroup B vaccine combined with outer membrane vesicles. *Expert Opin. Biol. Ther.* **11**, 969–985 (2011)
- Baker J.L., Chen L., Rosenthal J.A., Putnam D., DeLisi M.P.: Microbial biosynthesis of designer outer membrane vesicles. *Curr. Opin. Biotechnol.* **29**, 76–84 (2014)
- Bartolini E., Ianni E., Frigimelica E., Petracca R.: Recombinant outer membrane vesicles carrying *Chlamydia muridarum* HtrA induce antibodies that neutralize chlamydial infection *in vitro*. *J. Extracell. Vesicles.* **2**, DOI: 10.3402/jev.v2i0.20181 (2013)
- Bauman S.J., Kuehn M.J.: Purification of outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* and their activation of an IL-8 response. *Microbes Infect.* **8**, 2400–2408 (2006)
- Baumgarten T., Sperling S., Seifert J., von Bergen M., Steiniger F., Wick L., Heipieper H.: Membrane vesicle formation as a multiple-stress response mechanism enhances *Pseudomonas putida* DOT-T1E cell surface hydrophobicity and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 6217–6224 (2012)
- Beveridge T.J.: Structures of Gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **181**, 4725–4733 (1999)
- Bomberger J.M., MacEachran D.P., Coutermarsh B.A., Ye S., O'Toole G.A., Stanton B.A.: Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. *PLoS Pathog.* **5**, DOI: 10.1371/journal.ppat.1000382 (2009)
- Brudal E., Lampe E., Reubsæet L., Roos N., Hegna I., Thrane I., Koppang E., Winther-Larsen H.C.: Vaccination with outer membrane vesicles from *Francisella noatunensis* reduces development of francisellosis in a zebrafish model. *Fish Shellfish Immunol.* **42**, 50–57 (2015)
- Brudeseth B.E., Wiulsrød R., Fredriksen B.N., Lindmo K., Løklung K.E., Bordevik M.: Status and future perspectives of vaccines for industrialised fin-fish farming. *Fish Shellfish Immunol.* **35**, 1759–1768 (2013)
- Chatterjee S. N., Chaudhuri K.: Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae*. Physical and chemical characterization. *Biochim. Biophys. Acta*, **1639**, 65–79 (2003)
- Clausen T., Southan C., Ehrmann M.: The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol. Cell.* **10**, 443–455 (2002)
- Collins B.S.: Gram-negative outer membrane vesicles in vaccine development. *Discov. Med.* **12**, 7–15 (2011)
- Daczowska-Kozon E.: Kamylobakterioza – możliwe źródła infekcji. *Folia Univ. Agric. Stetin. Scientia Alimentaria*, **238**, 21–28 (2004)
- De S.N.: Enterotoxicity of bacteria-free culture-filtrate of *Vibrio cholerae*. *Nature*, **183**, 1533–1534 (1959)
- Deatherage B.L., Lara J.C., Bergsbaken T., Rassouljian Barrett S.L., Lara S., Cookson B.T.: Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Mol. Microbiol.* **72**, 1395–1407 (2009)
- Delbos V., Lemée L., Bénichou J., Berthelot G., Deghmane A.E., Leroy J.P., Houivet E., Hong E., Taha M.K., Caron F.: Impact of MenBvac, an outer membrane vesicle (OMV) vaccine, on the meningococcal carriage. *Vaccine*, **31**, 4416–4420 (2013)
- Ellen A.F., Albers S.V., Huibers W., Pitcher A., Hobel C.F., Schwarz H., Folea M., Schouten S., Boekema E.J., Poolman B.: Proteomic analysis of secreted membrane vesicles of archaeal *Sulfolobus* species reveals the presence of endosome sorting complex components. *Extremophiles*, **13**, 67–79 (2009)
- Elmi A., Dorrell N. i wsp.: *Campylobacter jejuni* outer membrane vesicles play an important role in bacterial interactions with human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* **80**, 4089–4098 (2012)
- Fernández S., Fajardo E.M., Mandiarote A., Año G., Padrón M.A., Acosta M.: A proteoliposome formulation derived from *Bordetella pertussis* induces protection in two murine challenge models. *BMC Immunol.* **14**, DOI: 10.1186/1471-2172-14-S1-S8 (2013)
- Finco O., Frigimelica E., Buricchi F., Petracca R., Galli G.: Approach to discover T- and B-cell antigens of intracellular pathogens applied to the design of *Chlamydia trachomatis* vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 9969–9974 (2011)
- Finne J., Leinonen M., Makela P.H.: Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet*, **2**, 355–357 (1983)
- Furuta N., Tsuda K., Omori H., Yoshimori T., Yoshimura F., Amano A.: *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles enter human epithelial cells via an endocytic pathway and are sorted to lysosomal compartments. *Infect. Immun.* **77**, 4187–4196 (2009)
- Główny Inspektorat Sanitarny: Stan sanitarny kraju w roku 2014. [http://gis.gov.pl/images/kafelki/stan\\_sanitarny\\_kraju.pdf](http://gis.gov.pl/images/kafelki/stan_sanitarny_kraju.pdf) (06.09.2016)
- Gurung M., Moon D.C., Choi C.W., Lee J.H., Bae Y.C., Kim J., Lee Y.C., Seol S.Y., Cho D.T., Kim S.I.: *Staphylococcus aureus* produces membrane-derived vesicles that induce host cell death. *PLoS One*, **6**, DOI: 10.1371/journal.pone.0027958 (2011)
- Helms M., Simonsen J., Olsen K.E., Mølbak K.: Adverse health events associated with antimicrobial drug resistance in *Campylobacter* species: a registry-based cohort study. *J. Infect. Dis.* **191**, 1050–1055 (2005)
- Holst J.D., Martin R., Campa C., Oster P., O'Hallahan J., Rosenqvist E.: Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *Vaccine*, **27**, DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.04.071 (2009)
- Huang W., Yao Y., Long Q., Yang X., Sun W.: Immunization against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* effectively protects mice in both pneumonia and sepsis models. *PLoS One*, **9**, DOI: 10.1371/journal.pone.0100727 (2014)
- Huntley J.F., Conley P.G., Hagman K.E., Norgard M.V.: Characterization of *Francisella tularensis* outer membrane proteins. *J. Bacteriol.* **189**, 561–574 (2007)
- Jagusztyn-Krynicka E.K., Łaniewski P., Wyszynska A.: Update on *Campylobacter jejuni* vaccine development for preventing human campylobacteriosis. *Expert. Rev. Vaccines*, **8**, 625–645 (2009)
- Jang K.S., Sweredoski M.J., Graham R.L., Hess S., Clemons W.M.: Comprehensive proteomic profiling of outer membrane vesicles from *Campylobacter jejuni*. *J. Proteomics*, **98**, 90–98 (2014)
- Jun S.H., Lee J.H., Kim B.R., Kim S.I., Park T.I., Lee J.C., Lee Y.C.: *Acinetobacter baumannii* outer membrane vesicles elicit a potent innate immune response via membrane proteins. *PLoS One*, **8**, DOI: 10.1371/journal.pone.0071751 (2013)
- Kaaijk P., van Straaten I., van de Waterbeemd B., Boot E.P., Levels L.M., van Dijken H.H., van den Dobbelen G.P.: Preclinical safety and immunogenicity evaluation of a nonavalent PorA native outer membrane vesicle vaccine against serogroup B meningococcal disease. *Vaccine*, **31**, 1065–1071 (2013)
- Kadurugamuwa J.L., Beveridge T.J.: Membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella flexneri* can be integrated into the surfaces of other Gram-negative bacteria. *Microbiology*, **145**, 2051–2060 (1999)

35. Kadurugamuwa J.L., Beveridge, T.J.: Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J. Bacteriol.* **177**, 3998–4008 (1995)
36. Kahn M.E., Maul G., Goodgal S.H.: Possible mechanism for donor DNA binding and transport in *Haemophilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6370–6374 (1982)
37. Kitagawa R., Takaya A., Ohya M., Mizunoe Y., Takade A., Yoshida S., Isogai E., Yamamoto T.: Biogenesis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium membrane vesicles provoked by induction of PagC. *J. Bacteriol.* **192**, 5645–5656 (2010)
38. Klose K.: Regulation of virulence in *Vibrio cholerae*. *Int. J. Med. Microbiol.* **29**, 81–88 (2001)
39. Kłapeć T., Cholewa A.: Tularemia – wciąż groźna zoonoza. *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu*, **17**, 155–160 (2011)
40. Knox K.W., Vesik M., Work E.: Relation between excreted lipopolysaccharide complexes and surface structures of a lysine limited culture of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **92**, 1206–1217 (1966)
41. Kulp A., Kuehn M.J.: Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 163–184 (2010)
42. Lee E.Y., Bang J.Y., Park G.W., Choi D.S., Kang J.S.: Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli*. *Proteomics*, **7**, 3143–3153 (2007)
43. Locht C.: A common vaccination strategy to solve unsolved problems of tuberculosis and pertussis? *Microbes Infect.* **10**, 1051–1056 (2008)
44. Manning A.J., Kuehn M.J.: Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol.* **11**, DOI: 10.1186/1471-2180-11-258 (2011)
45. Manning A.J., Kuehn M.J.: Functional advantages conferred by extracellular prokaryotic membrane vesicles. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 131–141 (2013)
46. Mashburn L.M., Whiteley M.: Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature*, **437**, 422–425 (2005)
47. McBroom A.J., Kuehn M.J.: Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol. Microbiol.* **63**, 545–558 (2007)
48. Mitra S., Chakrabarti M.K., Koley H.: Multi-serotype outer membrane vesicles of *Shigellae* confer passive protection to the neonatal mice against shigellosis. *Vaccine*, **31**, 3163–3173 (2013)
49. Nieves W., Asakrah S., Qazi O., Brown K.A., Kurtz J.: A naturally derived outer membrane vesicle vaccine protects against lethal pulmonary *Burkholderia pseudomallei* infection. *Vaccine*, **29**, 8381–8389 (2011)
50. Nieves W., Petersen H., Judy B.M., Blumentritt C.A., Russell-Lodrigue K., Roy C.J., Torres A.G., Morici L.A.: A *Burkholderia pseudomallei* outer membrane vesicle vaccine provides protection against lethal sepsis. *Clin. Vaccine Immunol.* **21**, 747–754 (2014)
51. Norheim G., Tunheim G., Naess L.M., Bolstad K., Fjeldheim A.K., Garcia L.: A trivalent outer membrane vesicle (OMV) vaccine against serogroup A, W-135 and X meningococcal disease. XVIIIth International Pathogenic Neisseria Conference. Würzburg: Conventus Congress Management & Marketing GmbH (2012)
52. Panatto D., Amicizia D., Lai P.L., Cristina M.L., Domnich A., Gasparini R.: New versus old meningococcal Group B vaccines: How the new ones may benefit infants & toddlers. *Indian J. Med. Res.* **138**, 835–846 (2013)
53. Pawlikowska M., Deptuła W.: Swoista odporność humoralna a chlamydie i chlamydofile. *Post. Hig. Med. Dosw.* **15**, 505–511 (2006)
54. Perez J.L., Acevedo R., Callico A., Fernandez Y., Cedre B., Ano G.: A proteoliposome based formulation administered by the nasal route produces vibriocidal antibodies against El Tor Ogawa *Vibrio cholerae* O1 in BALB/c mice. *Vaccine*, **27**, 205–212 (2009)
55. Pizza M., Scarlato V., Masignani V.: Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science*, **287**, 1816–1820 (2000)
56. Rachel R., Wyschkony I., Riehl S., Huber H.: The ultrastructure of *Ignicoccus*: evidence for a novel outer membrane and for intracellular vesicle budding in an archaeon. *Archaea*, **1**, 9–18 (2002)
57. Ram P.K., Crump J.A., Gupta S.K., Miller M.A., Mintz E.D.: Part II. Analysis of data gaps pertaining to *Shigella* infections in low and medium human development index countries, 1984–2005. *Epidemiol. Infect.* **136**, 577–603 (2008)
58. Renelli M., Matias V., Lo R.Y., Beveridge T.J.: DNA containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology*, **150**, 2161–2169 (2004)
59. Rivera J., Cordero R.J., Nakouzi A.S., Frases S., Nicola A., Casadevall A.: *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 19002–19007 (2010)
60. Rosenthal J.A., Chen L., Baker J.L., Putnam D., DeLisa M.P.: Pathogen-like particles: biomimetic vaccine carriers engineered at the nanoscale. *Curr. Opin. Biotechnol.* **28**, 51–8 (2014)
61. Rupali J., Danziger L.H.: Multidrug-resistant *Acinetobacter infections*: an emerging challenge to clinicians. *Ann. Pharmacother.* **38**, 1449–1459 (2004)
62. Sack D.A., Sack R.B., Chaignat C.L.: Getting serious about cholera. *N. Engl. J. Med.* **355**, 649–651 (2006)
63. Schaar V., Nordstrom T., Morgelin M., Riesbeck K.: *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles carry  $\beta$ -lactamase and promote survival of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by inactivating amoxicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 3845–3853 (2011)
64. Schild S., Nelson E.J., Camilli A.: Immunization with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles induces protective immunity in mice. *Infect. Immun.* **76**, 4554–4563 (2008)
65. Schooling S.R., Hubble A., Beveridge T.J.: Interactions of DNA with biofilm-derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **191**, 4097–4102 (2009)
66. Segal S., Pollard A.J.: Vaccines against bacterial meningitis. *Br. Med. Bull.* **72**, 65–81 (2005)
67. Serruto D., Bottomley M.J., Ram S.: The new multicomponent vaccine against meningococcal serogroup B, Bexsero®: immunological, functional and structural characterization of the antigens. *Vaccine*, **30**, 87–97 (2012)
68. Sierra G., Campa H.C., Varcacel N.M., Izquierdo P.L., Sotolongo P.F., Garcia L.: Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann.* **14**, 195–210 (1991)
69. Silva E.B., Dow S.W.: Development of *Burkholderia mallei* and *Pseudomallei* vaccines. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **3**, DOI: 10.3389/fcimb.2013.00010 (2013)
70. Silva J., Leite D., Fernandes M.: *Campylobacter* spp. as a food-borne pathogen: A Review. *Front. Microbiol.* **2**, DOI: 10.3389/fmicb.2011.00200 (2011)
71. Sinha R., Koley H., Nag D., Mitra S., Mukhopadhyay A.K., Chattopadhyay B.: Pentavalent outer membrane vesicles of *Vibrio cholerae* induce adaptive immune response and protective efficacy in both adult and passive suckling mice models. *Microbes Infect.* **17**, 215–227 (2015)

72. Sinha S., Langford P., Kroll J.: Functional diversity of three different DsbA proteins from *Neisseria meningitidis*. *Microbiology*, **150**, 2993–3000 (2004)
73. Tan L.K., Carlone G.M., Borrow R.: Advances in the development of vaccines against *Neisseria meningitidis*. *N. Engl. J. Med.* **362**, 1511–1520 (2010)
74. Tribble D.R., Baqar S., Carmolli M.P., Porter C.: *Campylobacter jejuni* strain CG8421: a refined model for the study of *Campylobacteriosis* and evaluation of *Campylobacter* vaccines in human subjects. *Clin. Infect. Dis.* **49**, 1512–1519 (2009)
75. Unal C.M., Schaar V., Riesbeck K.: Bacterial outer membrane vesicles in disease and preventive medicine. *Semin. Immunopathol.* **33**, 395–408 (2011)
76. van de Waterbeemd B., Streefland M., van der Ley P., Zomer B., van Dijken H.: Improved OMV vaccine against *Neisseria meningitidis* using genetically engineered strains and a detergent-free purification process. *Vaccine*, **28**, 4810–4816 (2010)
77. van der Ley P., Steeghs L., Hamstra H.J.: Modification of lipid A biosynthesis in *Neisseria meningitidis* lpxL mutants: influence on lipopolysaccharide structure, toxicity, and adjuvant activity. *Infect. Immun.* **69**, 5981–5990 (2001)
78. Von Seidlein L., Kim D.R., Ali M., Lee H., Wang X.: A multi-centre study of *Shigella diarrhoea* in six Asian countries: disease burden, clinical manifestations, and microbiology. *PLoS Med.* **3**, DOI: 10.1371/journal.pmed.0030353 (2006)
79. Wiersinga W.J., Currie B.J., Peacock S.J.: Melioidosis. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1035–1044 (2012)
80. Wyle F.A., Artenstein M.S., Brandt B.L.: Immunologic response of man to group B meningococcal polysaccharide vaccines. *J. Infect. Dis.* **126**, 514–521 (1972)
81. Yaron S., Kolling G.L., Simon L., Matthews K.R.: Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4414–4420 (2000)
82. Yonezawa H., Osaki T., Kurata S., Fukuda M., Kawakami H., Ochiai K., Hanawa T., Kamiya S.: Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. *BMC Microbiol.* **9**, DOI: 10.1186/1471-2180-9-197 (2009)
83. Young K.T., Davis L.M., Dirita V.J.: *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 665–679 (2007)
84. Zhou L., Srisatjaluk R., Justus D.E., Doyle R.J.: On the origin of membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **163**, 223–228 (1998)