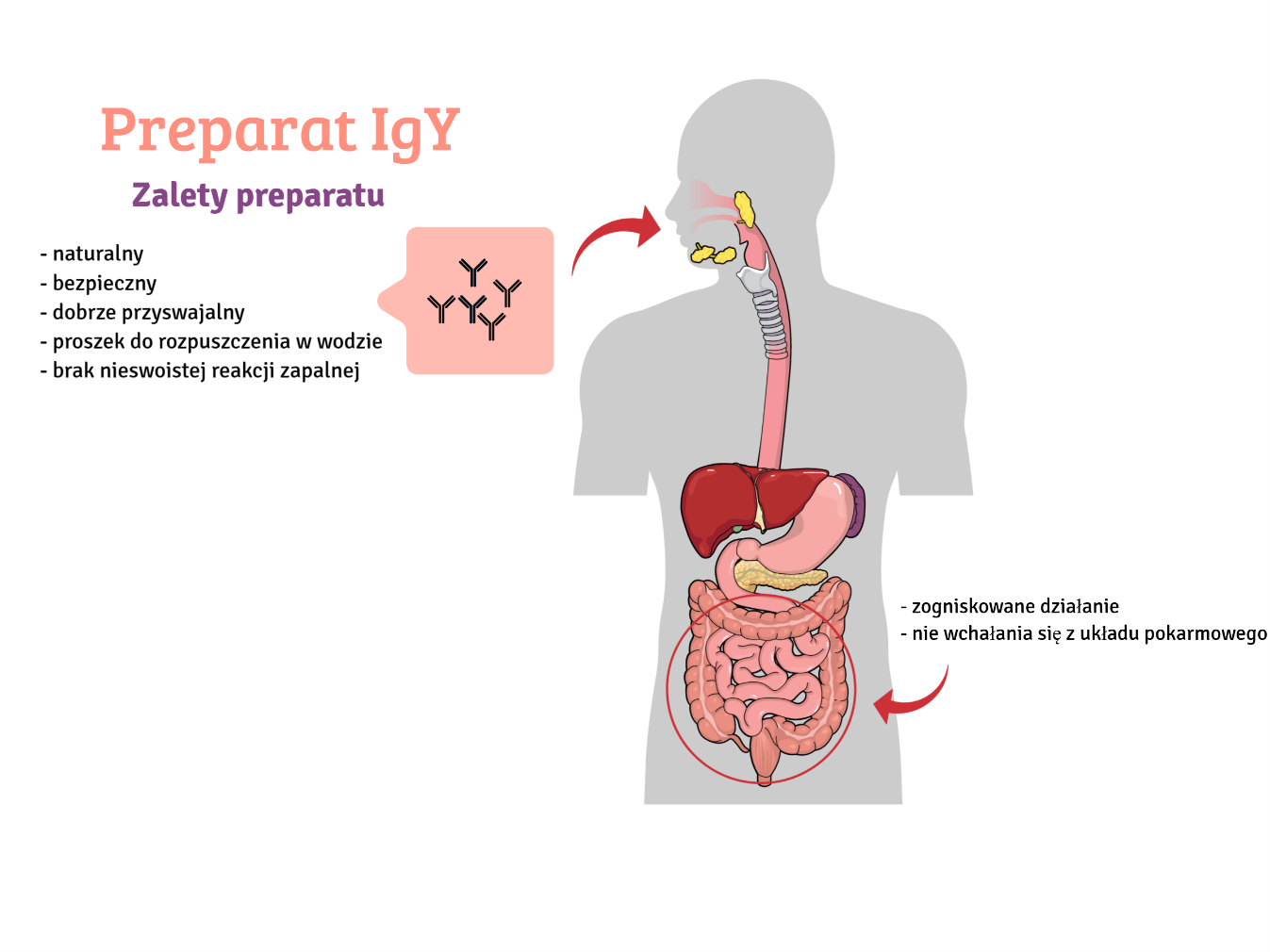
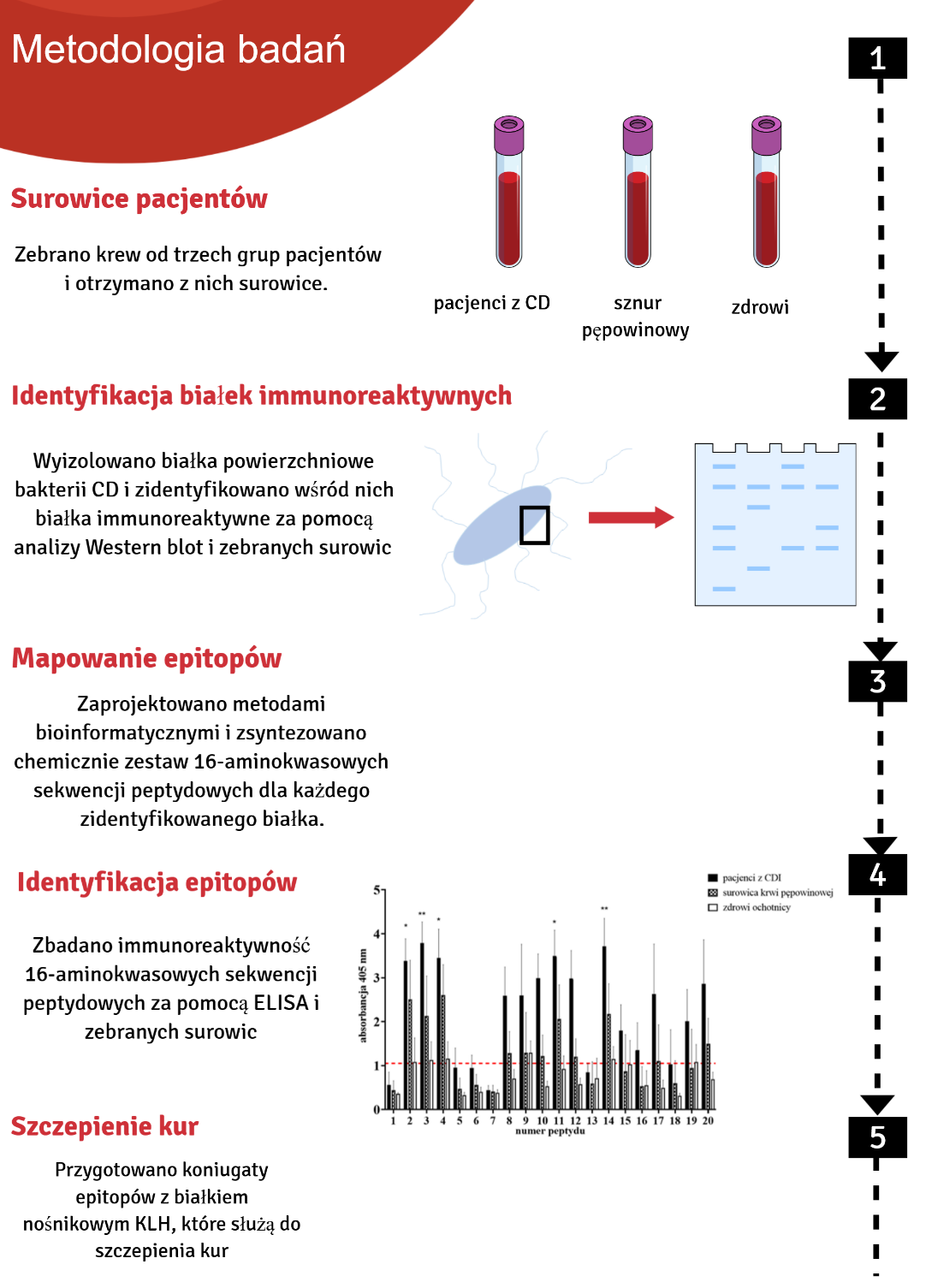
*Clostridioides difficile* (CD) należy do grupy oportunistycznych, anaerobowych bakterii wywołujących schorzenia układu pokarmowego ludzi i zwierząt. Są to Gram-dodatnie laseczki wytwarzające groźne dla zdrowia toksyny (A i B) oraz spory o dużej odporności na wysokie temperatury oraz powszechnie stosowane środki utrzymania czystości [1]. CDnie jest bakterią inwazyjną, ale po długotrwałej antybiotykoterapii i zahamowaniu rozwoju prawidłowej flory bakteryjnej pacjenta powoduje biegunkę poantybiotykową, która dotyka nawet 10% hospitalizowanych osób. Do najczęstszych powikłań po zakażeniu CD należy rzekomobłoniaste zapalenie jelita grubego (u 25% chorych), a bardzo ciężka postać zakażenia występuje u 3% chorych i u 11% chorych, którzy zarazili się szczepem hiperwirulentnym [2]. Może dojść do mnogich perforacji jelita, zapalenia otrzewnej z wtórną posocznicą i zgonem. W ciągu ostatnich dziesięciu lat w krajach wysoko rozwiniętych nastąpił wyraźny wzrost zapadalności oraz ciężkości przebiegu zakażeń. Co więcej, nawrót choroby po pierwszym leczeniu występuje u około 20% chorych, po drugim leczeniu u około 40% [3]. Dane zebrane przez ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) z 556 szpitali z 20 krajów europejskich wykazały 7 711 przypadków zakażeń CD w 2016 roku. Autorzy raportu zwracają jednak uwagę na znaczne niedoszacowanie tej liczby ze względu na niską liczbę przeprowadzanych testów oraz na brak odgórnego wymogu zgłaszania takich przypadków [4]. Co więcej, testy są przeprowadzane głównie w szpitalach wysokospecjalistycznych, a do zakażeń dochodzi najczęściej na oddziałach wewnętrznych, geriatrycznych oraz domach opieki. Starsze dane mówią o ponad 120 000 przypadków zakażeń CD w 2011 roku w Europie, z których od 3 do 30% zakończyło się śmiercią pacjenta. Szacuje się, że koszt leczenia pojedynczego pacjenta wynosi około 9 000 euro i jest ściśle uzależniony od czasu jaki pacjent musi dodatkowo spędzić w szpitalu [5].

Na rynku polskim brak jest leków przeciwko *Clostridioides difficile* innych niż antybiotyki. Warto wspomnieć, że bakterie CD są oporne na wiele powszechnie stosowanych antybiotyków (cefalosporyny, fluorochinolony, karbapenemy, klindamycyna, monobaktamy, mniej na makrolity, penicyliny, sulfonamidy i trimetoprim), a także względem antybiotyków stosowanych do ich zwalczania [6,7]. Nie ma również terapii ani suplementów, które by działały wspomagająco i przyspieszały powrót do zdrowia. Profilaktyka zakażeń sprowadza się do częstego mycia rąk oraz użycia rękawiczek jednorazowych, co nie do końca wydaje się być skuteczne. **Proponowany przez nas produkt działa na zupełnie innej zasadzie niż antybiotyki. Oparty jest o bezpieczne, nietoksyczne przeciwciała IgY izolowane z jaj kur immunizowanych koniugatem epitopu specyficznego względem białek zlokalizowanych na powierzchni komórki CD.** Szczepienie kur (powszechnie dostępne, niski koszt utrzymania) konkretnym epitopem powoduje produkcję specyficznych, ochronnych przeciwciał w znacznie większym stężeniu w stosunku do produktów, które otrzymuje się na drodze szczepienia całą bakterią.



Nasze badania oparliśmy o białka immunoreaktywne zlokalizowane na powierzchni komórki, które zidentyfikowaliśmy za pomocą surowicy trzech grup: pobrana od osób zakażonych CD, sznura pępowinowego i od zdrowych ochotników. Zastosowanie surowicy izolowanej ze sznura pępowinowego to podejście nowatorskie, które pozwoliło nam na określenie epitopów o właściwościach potencjalnie silnie ochronnych. W wyniku naszych działań określiliśmy 4 epitopy z czterech różnych białek CD zlokalizowanych na powierzchni bakterii. Część z naszych badań została opublikowana w uznanych czasopismach [8,9]. Uzyskane epitopy posłużyły do przygotowania szczepionki, którą następnie będą immunizowane kury. Z jaj szczepionych kur izolowane są duże ilości specyficznych przeciwciał IgY (ok. 10 mg/jajo), znacznie większe niż w przypadku skrwawiania innych zwierząt np. królika [10]. Dzięki skupieniu się na celach znajdujących się na powierzchni komórki preparat zadziała już na etapie wejścia bakterii do organizmu, zanim jeszcze dojdzie do namnożenia bakterii i produkcji niszczących jelito toksyn.



Potencjalnymi odbiorcami preparatu mogą być dwie duże grupy osób. Pierwsza, pacjenci przed planowanym zabiegiem w szpitalu, szczególnie osoby powyżej 60 roku życia czy o obniżonej odporności. Druga, osoby już zakażone stosujące preparat wspomagająco w terapii antybiotykowej, co potencjalnie skróci czas trwania kuracji. Nie należy jednak zawężać grup odbiorców ponieważ preparat mógłby być również stosowany zapobiegawczo u osób znajdujących się w jednostkach opieki długoterminowej, paliatywnej oraz u osób często stosujących antybiotyki w warunkach domowych.

Proponowany przez nas preparat cechuje się tym, że jest pochodzenia naturalnego przez co jest bezpieczny. Jego otrzymanie nie jest kosztowne, a metody produkcji powszechnie stosowane. Preparat cechuje się dużo wyższą specyficznością niż preparaty otrzymywane poprzez immunizację kur całą bakterią. Preparat będzie łatwy w stosowaniu w postaci proszku do rozpuszczenia w wodzie (możliwe inne formy produktu np. granulat, tabletka). Przeciwciała IgY są odporne na warunki panujące w układzie pokarmowym przez co nie ma potrzeby stosowania wyszukanych formulacji. Są również odporne na podwyższoną temperaturę więc preparat nie wymaga przechowywania w lodówce.

Zespół zaangażowany w projekt:

Prof. dr hab. Andrzej Gamian – kierownik

Dr hab. inż. Sabina Górska

Dr Agnieszka Razim

Mgr Katarzyna Pacyga-Prus

Mgr inż. Swen Stręk

1. Gerding, D.N.; Johnson, S.; Peterson, L.R.; Mulligan, M.E.; Silva, J., Jr Clostridium difficile-associated diarrhea and colitis. *Infect Control Hosp Epidemiol* **1995**, *16*, 459–477.

2. Pépin, J.; Routhier, S.; Gagnon, S.; Brazeau, I. Management and outcomes of a first recurrence of Clostridium difficile-associated disease in Quebec, Canada. *Clin. Infect. Dis.* **2006**, *42*, 758–764, doi:10.1086/501126.

3. McFarland, L.V.; Elmer, G.W.; Surawicz, C.M. Breaking the cycle: treatment strategies for 163 cases of recurrent Clostridium difficile disease. *Am. J. Gastroenterol.* **2002**, *97*, 1769–1775, doi:10.1111/j.1572-0241.2002.05839.x.

4. Healthcare-associated infections: Clostridium difficile infections - Annual Epidemiological Report for 2016 Available online: http://ecdc.europa.eu/en/publications-data/healthcare-associated-infections-clostridium-difficile-infections-annual (accessed on Dec 29, 2018).

5. Heister, T.; Wolkewitz, M.; Hehn, P.; Wolff, J.; Dettenkofer, M.; Grundmann, H.; Kaier, K. Costs of hospital-acquired Clostridium difficile infections: an analysis on the effect of time-dependent exposures using routine and surveillance data. *Cost Effectiveness and Resource Allocation* **2019**, *17*, 16, doi:10.1186/s12962-019-0184-5.

6. Bielec, D.; Stempkowska, J.; Markiewicz-Zięba, M. Postępy w leczeniu zakażenia Clostridium difficile. *Postępy Nauk Medycznych* **2014**, *XXVII*.

7. Freeman, J.; Vernon, J.; Morris, K.; Nicholson, S.; Todhunter, S.; Longshaw, C.; Wilcox, M.H.; Pan-European Longitudinal Surveillance of Antibiotic Resistance among Prevalent Clostridium difficile Ribotypes’ Study Group Pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent Clostridium difficile ribotypes. *Clin. Microbiol. Infect.* **2015**, *21*, 248.e9-248.e16, doi:10.1016/j.cmi.2014.09.017.

8. Razim, A.; Pacyga, K.; Martirosian, G.; Szuba, A.; Gamian, A.; Myc, A.; Górska, S. Mapping Epitopes of a Novel Peptidoglycan Cross-Linking Enzyme Cwp22 Recognized by Human Sera Obtained from Patients with Clostridioides difficile Infection and Cord Blood. *Microorganisms* **2019**, *7*, 565, doi:10.3390/microorganisms7110565.

9. Pacyga, K.; Razim, A.; Martirosian, G.; Aptekorz, M.; Szuba, A.; Gamian, A.; Myc, A.; Górska, S. The Bioinformatic and In Vitro Studies of Clostridioides Difficile Aminopeptidase M24 Revealed the Immunoreactive KKGIK Peptide. *Cells* **2020**, *9*, 1146, doi:10.3390/cells9051146.

10. Ferreira Júnior, Á.; Santiago, F.M.; Silva, M.V.; Ferreira, F.B.; Macêdo Júnior, A.G.; Mota, C.M.; Faria, M.S.; Silva Filho, H.H.; Silva, D.A.O.; Cunha-Júnior, J.P.; et al. Production, characterization and applications for Toxoplasma gondii-specific polyclonal chicken egg yolk immunoglobulins. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e40391, doi:10.1371/journal.pone.0040391.