

## Szczepionki DNA i antygeny rekombinantowe w prewencji zarażeń *Toxoplasma gondii* – aktualny stan badań

### DNA vaccines and recombinant antigens in prevention of *Toxoplasma gondii* infections – current status of the studies

Elżbieta Hiszczyńska-Sawicka, Lucyna Holec-Gąsior, Józef Kur

Katedra Mikrobiologii, Politechnika Gdańska, ul. G. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk

Adres do korespondencji: Elżbieta Hiszczyńska-Sawicka, Katedra Mikrobiologii, Politechnika Gdańska, ul. G. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk; E-mail: ehiszczynska@yahoo.com

**ABSTRACT.** Toxoplasmosis caused by an intracellular parasite *Toxoplasma gondii* is still one of major medical and veterinary problems and there is still need for a vaccine for human toxoplasmosis. Despite years of research much remains to be done to develop effective vaccine. The article presents the current status of vaccine strategies against toxoplasmosis with focus on the most developed approaches using naked DNA and recombinant antigens.

**Key words:** *Toxoplasma gondii*, vaccines, naked DNA, recombinant antigens

#### Wstęp

*Toxoplasma gondii* jest pasożytem odpowiedzialnym za jedną z najbardziej rozpowszechnionych na świecie chorób odzwierzęcych – toksoplazmozę. Na podstawie badań serologicznych stwierdzono, że zarażenie *T. gondii* występuje u prawie wszystkich gatunków zwierząt stałocieplnych oraz u około 1/3 ludności świata. Toksoplazmoza stanowi bardzo poważny problem medyczny, ponieważ pasożyt jest czynnikiem powodującym poronienia i wady wrodzone u ludzi oraz uogólnioną i zagrażającą życiu chorobę u osób z upośledzoną odpornością. Ponadto choroba ta u zwierząt hodowlanych (głównie owiec) prowadzi do dużych strat ekonomicznych w hodowli, a także w przemyśle z nią związanym. Próby opracowania skutecznych szczepionek przeciwko *T. gondii* dla zwierząt były dotychczas mało pomyślne. Jedyną szczepionką komercyjnie dostępną, stosowaną przeciwko toksoplazmozie u owiec, jest preparat zawierający atenuowane tachyzoity pasożyta szczepu S48 (TOXOVAX), dopuszczony do użytku w niektórych krajach (np. Nowa Zelandia, Wielka Brytania). Pomi-

mo, iż TOXOVAX zmniejsza ryzyko wystąpienia poronień u immunizowanych zwierząt, to jednak szereg krajów nie dopuściło do użytku tej szczepionki ze względu na duże ryzyko rewersji pasożyta szczepionkowego do formy patogennej. Z powyższej wymienionych względów stworzenie efektywnej szczepionki przeciwko *T. gondii* ma ogromne znaczenie zarówno w weterynarii, jak i medycynie, biorąc szczególnie pod uwagę bardzo poważne następstwa toksoplazmozy nabytej w życiu płodowym i toksoplazmozy u osób z upośledzoną odpornością.

Pomimo dekad badań oraz zaangażowania ogromnych funduszy, próby stworzenia szczepionki przeciwko toksoplazmozie, a także innym chorobom pasożytniczym zwierząt i człowieka, nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. Jedną z głównych przyczyn jest przewlekły charakter infekcji pasożytniczych, będący skutkiem wzbudzania przez pasożyta takiej odpowiedzi immunologicznej, która nie chroni żywiciela przed rozwojem zarażenia [1]. Dodatkowo, pasożyty bardzo często stosują różne sposoby unikania odpowiedzi immunologicznej, takie jak zmienność antygenowa czy mimikra molekularna, a ponadto mają złożony cykl życiowy. Te

wszystkie czynniki bardzo komplikują opracowanie efektywnej szczepionki, która byłaby skuteczna w prewencji zarażeń pasożytniczych. Wraz z rozwojem inżynierii genetycznej oraz metod biologii molekularnej pojawiła się jednak możliwość nowych strategii w konstruowaniu coraz lepszych i bardziej efektywnych szczepionek.

Prace nad konstrukcją szczepionki przeciwko infekcjom pasożytniczym obejmują różne metody, począwszy od przygotowywania preparatów całego pasożyta, aż do otrzymywania syntetycznych antygenów peptydowych [2, 3]. Pierwsze szczepionki przeciwko pasożytom zawierały z reguły komórki danego pasożyta, natomiast ostatnimi laty – tylko wybrane jego komponenty: białka, glikoproteiny lub węglowodany [4, 5]. W ostatniej dekadzie zaczęto stosować bardziej nowoczesne strategie, oparte na DNA lub/i wirusach jako nośnikach antygenów szczepionkowych [6, 7].

Wraz z rozwojem inżynierii genetycznej pojawiła się możliwość produkcji antygenów pasożytów w zmodyfikowanych genetycznie bakteriach i drożdżach. Z tego powodu rekombinantowe białka antygenowe stały się jednymi z bardziej popularnych szczepionek podjednostkowych. Antygeny takie są przede wszystkim łatwe w produkcji, a koszt ich uzyskania jest często dużo niższy niż koszt otrzymania antygeny (ów) natywnych. Obecnie najpowszechniej stosowanymi szczepionkami białkowymi są wysoce immunogenne antygeny powierzchniowe pasożytów. Ponadto pojawienie się pierwszych doniesień o pomyślnych wynikach domięśniowej immunizacji zwierząt przy użyciu szczepionek z „nagiego” DNA [8], umożliwiających ekspresję białka o właściwościach antygenowych, zachęciło parazytologów z wielu laboratoriów na całym świecie do podjęcia badań nad konstrukcją tego typu szczepionek dla szerokiego zakresu pasożytów [9–12]. Szczepionki DNA są łatwe w konstrukcji, przygotowaniu i podawaniu, a ponadto można użyć je do selektywnego wzbudzania odporności z udziałem limfocytów Th1 lub Th2, co jest istotne w przypadku infekcji pasożytniczych, w których rozwój odpowiedzi tylko określonego typu prowadzi do ochrony żywiciela.

Wiadomo, że oba rodzaje odpowiedzi immunologicznej, humoralna i komórkowa, są ważne w generowaniu skutecznej odporności przeciwko *T. gondii* [13, 14]. Odpowiedź ochronna przeciwko pasożyтови opiera się na limfocytach T CD8+ oraz CD4+ i jest mediowana przez IFN-gamma [15]. Ostatnie badania wykazały, że w indukcji odporno-

ści przez szczepionki równie ważne są limfocyty B, ponieważ produkowane przez nie przeciwciała blokują inwazję komórek żywiciela przez tachyzoity. Często zwraca się uwagę, że szczepienia antygenami specyficznymi dla określonej fazy cyklu rozwojowego prowadzą do powstania odporności ograniczonej tylko do tej fazy [16]. Dlatego też szczepionka zdolna do indukowania odpowiedzi immunologicznej typu 1 (z udziałem limfocytów CD4+ Th1) przeciwko antygenom *T. gondii*, które są produkowane w różnych fazach cyklu rozwojowego, powinna wzbudzać chociaż częściową ochronę przeciwko zarażeniu *T. gondii*.

W przypadku *T. gondii* w ostatnich latach zrobiono ogromny postęp w identyfikacji antygenów, które mogłyby spełniać warunki stawiane antygenom szczepionkowym. Większość prac była oczywiście skoncentrowana na antygenach powierzchniowych tachyzoitów (SAG), poza tym antygenach granul o dużej gęstości (GRA) wydzielanych zarówno przez tachyzoity, jak i bradyzoity. Brane pod uwagę były również antygeny roptrii (ROP) i mikronem (MIC).

W tej pracy porównane zostały rezultaty zastosowania antygenów rekombinantowych *T. gondii* oraz „nagiego” DNA jako potencjalnych szczepionek przeciwko toksoplazmozie.

### Antygeny powierzchniowe *T. gondii*

Powierzchnia tachyzoitów i bradyzoitów jest pokryta białkami zakotwiczonymi w niej poprzez glikozylfosfatydyloinozitol (GPI). Większość antygenów powierzchniowych należy do rodziny antygenów SAG1 lub SAG2 [17–20]. Białka te odgrywają kluczową rolę nie tylko w inwazji pasożyta do komórek żywiciela, ale także odpowiadają za jego zjadliwość i mają właściwości immunomodulujące [21].

Spośród dotychczas poznanych i opisanych w literaturze antygenów powierzchniowych *T. gondii* (SAG1–SAG5, SRS1–SRS9, BSR4), pierwszym scharakteryzowanym pod względem biochemicznym oraz zastosowanym jako szczepionka był antygen SAG1 (ang. surface antigen 1).

Jego przydatność testowano na modelach zwierzęcych, w których antygen wykazywał na ogół tylko częściową ochronę szczepionych żywicieli. W badaniach stosowano oczyszczony preparat naturalnego białka SAG1 [22, 23], a także antygeny rekombinantowe produkowane w komórkach bakteryjnych *Escherichia coli* [24], oraz w drożdżach

Tabela 1. Ocena immunogenności i skuteczności szczepionek z wykorzystaniem rekombinantowego antygenu SAG1 *T. gondii*  
 Table 1. Estimation of immunogenicity and effectiveness of vaccines containing recombinant SAG1 antigen of *T. gondii*

Antygen	Białko	Adiuwant	Zwierzęta	Immunizacja	Zarazenie	Wyniki	Literatura
SAG1	Produktowane w <i>E. coli</i> , z domagą His-Tag	Al(OH) <sub>3</sub>	Myszki NMRI	20 µg SAG1+ 0,5 µg adiuwantu, domięśniowo 4 dawki co 2 tygodnie	10 <sup>5</sup> tachyzoitów wirulentnego szczepu RH, 45 dni po ostatnim szczepieniu, dootrzewnowo 100 cyst kankowych awirulentnego szczepu SS1119, 2 tygodnie po ostatniej immunizacji, podskórnice	<ul style="list-style-type: none"> <li>Znaczący wzrost czasu przeżywania</li> </ul>	[24]
	Produktowane w <i>E. coli</i>	IL-12	Myszki CBA/J	4 µg SAG1 4 µg SAG1 + 4 µg IL-12, podskórnice 4 dawki w dniu 1, 4, 8, 13	20 cyst szczepu PRU, 4 tygodnie po ostatnim szczepieniu, drogą pokarmową	<ul style="list-style-type: none"> <li>Po szczepieniu SAG1 tylko odpowiedź typu 2</li> <li>Szczepienie z IL-12 redukcja liczby cyst w mózgu o 40%</li> </ul>	[37]
	Produktowane w <i>E. coli</i>	–	Myszki BALB/c CBA/J	1 µg SAG1, 4 dawki w ciągu 2 tygodni	10 cyst szczepu Mc49, w 12 dniu ciąży, drogą pokarmową	<ul style="list-style-type: none"> <li>U myszy BALB/c 2-krotny spadek odsetka zarazonych płodów, odpowiedź mieszana typu 1 i 2</li> <li>U myszy CBA/J wzrost liczby zainfekowanych płodów o 50%, odpowiedź typu 2</li> </ul>	[38]
	Produktowane w <i>Pichia pastoris</i>	SBAS1	Świnie morskie, ♀ ciężarne	10 µg SAG1+ adiuwant podskórnice, 3 dawki co 3 tygodnie	5x10 <sup>5</sup> tachyzoitów szczepu C56, w 3 tygodniu ciąży, śródskórnice	<ul style="list-style-type: none"> <li>Znaczną ochrona przed transmisją matka–dziecko, 66-86% płodów wolnych od pasożyta</li> </ul>	[25]
	Peptydy	–	Myszki CH3	250 µg peptydu + BSA, dożylnie, 3 dawki w dniu 1, 15 i 30	3x10 <sup>3</sup> tachyzoitów szczepu RH, 2 tygodnie po ostatniej dawce, dootrzewnowo	<ul style="list-style-type: none"> <li>Znaczący wzrost przeżywalności dla 4 peptydów z końca C-terminalnego białka</li> </ul>	[39]

IL-12 – interleukina 12

SBAS1 – adiuwant składający się z saponiny (QS21) i MPL-A (monofosforylowany lipid A)

BSA – surowicza albumina wołowa

Tabela 2. Ocena immunogenności i skuteczności szczepionek DNA kodujących antygen SAG1 *T. gondii*  
 Table 2. Estimation of immunogenicity and effectiveness of DNA vaccine encoding SAG1 antigen of *T. gondii*

Antygen	DNA	Adiuwant	Zwierzęta	Immunizacja	Zarażenie	Wyniki	Literatura
SAG1	Plazmidowy, kodujący antygen SAG1 (pCMV/Int) z sekwencją sygnałną aktywatora ludzkiego plazminogenu	GM-CSF	Myszy C57BL/6 Szczury (Sprague - Dawley)	100 µg plazmidu + 50 µg pGM-CSF, domięśniowo, 3 dawki co 3-tygodnie	80 cyst tkankowych szczepu Me49, 2 tygodnie po ostatnim szczepieniu, doustnie Szczury – oocysty szczepu VEG, 122 dni po 1 szczepieniu, doustnie	<ul style="list-style-type: none"> <li>Indukcja odpowiedzi immunologicznej</li> <li>Obniżenie śmiertelności</li> <li>Brak ochrony przed zarażeniem szczepem RH</li> <li>Redukcja liczby cyst mózgowych</li> </ul>	[40]
	Plazmidowy, kodujący antygen SAG1 (WRG7079) z sekwencją sygnałną tPA	–	Myszy C3H (H-2 <sup>k</sup> ), BALB/c (H-2 <sup>d</sup> )	50 µg plazmidu, domięśniowo w tygodniu 0 i 3	10 <sup>5</sup> tachyzoitów szczepu RH, w tygodniu 5, dootrzewnowo	<ul style="list-style-type: none"> <li>Całkowita ochrona u myszy C3H</li> <li>80% ochrona u myszy BALB/c</li> </ul>	[41]
	Plazmidowy, kodujący antygen SAG1 (pcDNA3)	IL-2 (gen w plazmidzie)	Myszy NIH	100 µg pSAG1 100 µg pcIL-2, domięśniowo, 3 dawki co 3 tygodnie	200 tachyzoitów szczepu RH, 2 tygodnie po ostatniej immunizacji, dootrzewnowo	<ul style="list-style-type: none"> <li>Koinokulacja IL-2 wzmacnia odpowiedź immunologiczną i przedłuża czas przeżycia myszy</li> </ul>	[42]
	Plazmidowy, kodujący antygen SAG1 (pItPA)	–	Myszy BALB/c	50 µg plazmidu domięśniowo, 2 dawki w tygodniu 0 i 3	10 lub 20 cyst szczepu Beverley, 7 tygodni od 1 szczepienia, doustnie lub dootrzewnowo	<ul style="list-style-type: none"> <li>Wzmocniona odpowiedź typu 1</li> <li>Wzrost przeżywalności</li> <li>Spadek poziomu cyst mózgowych</li> </ul>	[43]

GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów

IL-2 – interleukina 2

Tabela 3. Ocena immunogenności i skuteczności szczepionek z wykorzystaniem rekombinantowych antygenów SAG2 i SAG3 *T. gondii*  
 Table 3. Estimation of immunogenicity and effectiveness of vaccines containing recombinant SAG2 and SAG3 antigen of *T. gondii*

Antygen	Białko	Adiuwant	Zwierzęta	Immunizacja	Zarazenie	Wyniki	Literatura
SAG2	Produktowane w <i>E. coli</i> , SAG2-GST	ISCOM	Mysz (Swiss Webster)	0,65 µg SAG2/ISCOM, podskórnie, 6 dawek w tygodniu 1, 4, 10, 12, 18	3000 oocyst szczepu Me49, drogą pokarmową 10 cyst tkankowych szczepu C56	• 100% śmiertelność	[44]
	Produktowane w <i>Pichia pastoris</i>	-	Mysz ICR	10 µg SAG2, śródskórnym, 3 dawki w tygodniowych odstępach	2x10 <sup>3</sup> tachyzoitów szczepu RH, dootrzewnowo	• 60% ochrona przed zarazeniem	[45]
SAG2/SAG1	Produktowane w <i>E. coli</i> SAG1/SAG2 białko hybrydowe	IL-10	Mysz BALB/c	10 µg SAG1/2 10 µg SAG1 10 µg SAG2, dootrzewnowo Druga dawka po 14 dniach	1x10 <sup>3</sup> tachyzoitów szczepu RH, podskórnym 2 tygodnie po ostatniej immunizacji	• Przeżywalność 73% dla rSAG1/2 60% – rSAG1 53% – rSAG2	[46]
SAG3	Produktowane w <i>E. coli</i> SAG3-GST	QuilA	Mysz BALB/c	50 µg rSAG3 50 µg rSAG3 + QuilA, dootrzewnowo szczepienia 2 razy w tygodniu przez 4 tygodnie	1500 cyst szczepu Me49, drogą pokarmową, 3 tygodnie po ostatniej immunizacji	• Znaczące zwiększenie czasu przeżycia myszy • Redukcja liczby cyst mózgowych	[47]

ISCOM – (immune stimulating complexes ) kompleksy składają się z cholesterolu, fosfolipidów i saponin  
 IL-10 – interleukina 10  
 QuilA – saponina QuilA

Tabela 4. Ocena immunogenności i skuteczności szczepionek w postaci plazmidowego DNA, kodującego antygen ROP1 i ROP2 *T. gondii*  
 Table 4. Estimation of immunogenicity and effectiveness of DNA vaccine encoding ROP1 and ROP2 antigens

Antygen	DNA	Adiuwant	Zwierzęta	Immunicacja	Zarażenie	Wyniki	Literatura
<b>ROP1</b>	Plazmidowy, kodujący antygen ROP1 (pcDNA3)	IFN- $\gamma$ gen w plazmidzie	Myszy BALB/c	100 $\mu$ g pROP1 lub 100 $\mu$ g pROP1 + pINF- $\gamma$ , domięśniowo, dodatkowe szczepienia po 30, 50 i 70 dniach	–	• Silna odpowiedź komórkowa po zastosowaniu IFN- $\gamma$	[48]
	Plazmidowy, kodujący antygen ROP1 (pcDNA3)	–	Myszy BALB/c	100 $\mu$ g pROP1, domięśniowo, druga dawka po 2 tygodniach	–	• Indukowana odpowiedź komórkowa i humoralna	[49]
<b>ROP2</b>	Plazmidowe, kodujący antygen ROP2 (pcDNA3)	–	Myszy BALB/c, C57BL/6, CBA/J	50 $\mu$ g pROP2, domięśniowo, dwie dodatkowe dawki po 100 $\mu$ g pROP2 co 3 tygodnie	600 tachyzoitów szczepu RH, podskórnie, 3 tygodnie po ostatniej immunizacji	• Brak ochrony • Generowana odpowiedź typu I i 2	[50]

IFN- $\gamma$  – interferon gamma

Tabela 5. Ocena immunogenności i skuteczności szczepionek w postaci plazmidowego DNA, kodującego antygeny MIC oraz inne antygeny *T. gondii*  
 Table 5. Estimation of immunogenicity and effectiveness of DNA vaccine encoding MIC antigens and others antigens of *T. gondii*

Antygen	DNA	Adiuwant	Zwierzęta	Immunicacja	Zarażenie	Wyniki	Literatura
<b>MIC3</b>	Plazmidowy, kodujący antygen MIC3 (pcDNA3)	pGM-CSF	Myszy CBA/J	50 $\mu$ g pMIC3 50 $\mu$ g pGM-CSF, domięśniowo, 3 dawki w dniu 0, 14 i 28	70 cyst szczepu 76K, drogą pokarmową, 2 tygodnie po ostatniej immunizacji	• Znacząca ochrona • Redukcja liczby cyst o 74% • GM-CSF wzmacnia oba typy odpowiedzi immunologicznej	[51]
<b>AMA1</b> <b>MIC2</b> <b>M2AP</b> <b>BAG1</b>	Plazmidowy, kodujący białka AMA1, MIC2, M2AP, BAG1 (pcDNA6-V5-HisA)	IL-10	Myszy C57BL/6 BALB/c	2 $\mu$ g DNA, gene gun	20 cyst szczepu Beverley, drogą pokarmową, 2 tygodnie po ostatnim szczepieniu	• AMA1 - indukcja specyficznej odpowiedzi typu 1 • Zwiększenie odsetka przeżyjących myszy o 40% • MIC2, M2AP, BAG1 – mieszana odpowiedź typu I i 2	[52]

pGM-CSF – plazmid kodujący czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów  
 gen gun – pistolet genowy  
 AMA1 – (Apical Membrane Antigen-1) błonowy antygen apikalny  
 M2AP – (MIC2 associated protein) białko związane z MIC2  
 BAG1 – (Bradyzoite Antigen 1) antygen bradyzoitów, hsp30

Tabela 6. Ocena immunogenności i skuteczności szczepionek z wykorzystaniem antygenów GRA T. gondii  
 Table 6. Estimation of immunogenicity and effectiveness of vaccines containing GRA antigens of *T. gondii*

Antygen	Białko	DNA	Adiuwant	Zwierzęta	Immunizacja	Zarazenie	Wyniki	Literatura
GRA1		Plazmidowy, kodujący antygen GRA1 z sekwencją sygnalną aktywatora ludzkiego plazminogenu (pVR1020)						
	Produkowane w <i>E. coli</i> rGRA1 z domena HistTag	Plazmid pVR1020-GRA1	Chitozan	Myszy C3H/HeN	50 µg pGRA1 / 50 µg pGRA1-chitozan, 50 µg rGRA1 / 100 µg pGRA1, dożyłkowo-domiśniowo	–	• Odpowiedź typu 2 lub mieszana	[54]
GRA4	–	Plazmidowy, kodujący antygen GRA4 (pcDNA3)	pGM-CSF pIL-12	Myszy C57BL/6	50 µg pGRA4, 25 µg pGM-CSF, 25 µg pIL-12, kolejne dawki w dniu 14 i 28	40 cyst szczepu 76K, drogą pokarmową, dwa tygodnie po ostatniej immunizacji	• Wzrost czasu przeżycia myszy o 62% • Odpowiedź typu 1	[55]
GRA7	–	Plazmidowy, kodujący antygen GRA7 (pVR1020)	–	Myszy C3H/HeN	75 µg pGRA7, domiśniowo 3 dawki co 3 tygodnie	20 cyst szczepu 76K, drogą pokarmową, 1 lub 2 miesiące po ostatnim szczepieniu	• Silne zahamowanie wytworzenia cyst mózgowych	[56]

pGM-CSF – plazmid kodujący czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów  
 pIL-12 – plazmid kodujący interleukinę 12

Tabela 7. Ocena immunogenności i skuteczności szczepionek z wykorzystaniem mieszanek antygenów *T. gondii*  
 Table 7. Estimation of immunogenicity and effectiveness of vaccines containing mixtures of *T. gondii* antigens

Antygen	Białko	DNA	Adiuwant	Zwierzęta	Immunizacja	Zarażenie	Wyniki	Literatura
<b>SAG1 + ROP1</b>	–	Plazmidowy, kodujący antygeny SAG1 i ROP1 w fuzji (pcDNA3)	Liposomy	Myszy BALB/c	10 µg pSAG1-ROP1, domięśniowo	–	<ul style="list-style-type: none"> <li>Indukcja odpowiedzi humoralnej i komórkowej</li> </ul>	[57]
<b>SAG1 + ROP2</b>	–	Plazmidowy, kodujący antygeny SAG1 i ROP2 w fuzji (pcDNA3)	pIL-12 (gen w plazmidzie)	Myszy BALB/c	100 µg DNA, domięśniowo w dniu 0, 14, 28	10 <sup>4</sup> tachyzoitów szczepu RH	<ul style="list-style-type: none"> <li>Wydłużenie czasu przeżycia myszy</li> <li>Odpowiedź wzmacniana po podaniu pIL-12</li> </ul>	[36]
	–	Plazmidowy, kodujący antygeny SAG1 i ROP2 w fuzji	CT, IL-12	Myszy BALB/c	100 µg pSAG1-ROP2 100 µg pSAG1-ROP2 + pCTA2/B lub pIL-12, domięśniowo, w dniu 0, 14 i 28	10 <sup>4</sup> tachyzoitów szczepu RH, dootrzewnowo	<ul style="list-style-type: none"> <li>Wydłużenie czasu przeżycia myszy w grupie z IL-12</li> </ul>	[58]
<b>SAG1 + ROP2 + SAG2</b>	–	Plazmidowy, kodujący antygeny SAG1, ROP2 i SAG2 w fuzji	pIL-12	Myszy BALB/c	100 µg DNA, domięśniowo w dniu 0, 14, 28	10 <sup>4</sup> tachyzoitów szczepu RH, dootrzewnowo, 4 tygodnie po ostatnim szczepieniu	<ul style="list-style-type: none"> <li>Częściowa ochrona</li> <li>Wydłużenie czasu przeżycia myszy po podaniu pIL-12</li> </ul>	[34]
<b>SAG1 + ROP2 + GRA2</b>	–	Plazmidowy, kodujący antygeny SAG1-ROP2-GRA2 w fuzji i SAG1-ROP2 w fuzji	IL-12	Myszy BALB/c	100 µg SAG1-ROP2-GRA2 100 µg SAG1-ROP2	1x10 <sup>4</sup> tachyzoitów szczepu RH, dootrzewnowo	<ul style="list-style-type: none"> <li>IL-12 wzmacnia odpowiedź immunologiczną oraz zwiększa przeżywalność myszy</li> </ul>	[59]
<b>SAG1 + HSP70 + HSP30</b>	–	Plazmidowy	–	Myszy C57BL/6 BALB/c	50 µg DNA lub 2 µg gene gun, domięśniowo lub dootrzewnowo	10 cyst szczepu Fukaya, tydzień po szczepieniu	<ul style="list-style-type: none"> <li>Obniżenie parazytemii po immunizacji z zastosowaniem gene gun</li> </ul>	[60]
<b>SAG1 GRA4</b>	–	Plazmidowy, (pcDNA3), mutacja w miejscu N-glikozylacji w genie SAG1	GM-CSF	Myszy C57BL/6 CBA/J OF1	50 µg pSAG1 lub pGRA4 lub oba + GM-CSF Druga dawka bez GM-CSF po 28 dniach	40 cyst szczepu 76K, drogą pokarmową	<ul style="list-style-type: none"> <li>Znacząca ochrona w przypadku mieszanek plazmidów</li> <li>Zwiększenie przeżywalności do 87%</li> <li>Obniżenie liczby cyst po szczepieniu</li> </ul>	[61]

<b>GRA4 ROP2</b>	Produkowane w <i>E. coli</i> , z domeną His-Tag	Plazmidowy, kodujący antygeny GRA4 i ROP2 (pcDNA3)	Al(OH) <sub>3</sub>	Myszy C57BL/6 C3H	10 µg rROP2 10 µg rGRA4 lub mieszanka 10 µg każde, absorbowane na 0,5 µg alhydrogelu, domięśniowo. Kolejne 3 dawki w odstępie 2 lub 8 tygodni 100 µg pGRA4	20 lub 100 cyst tkankowych szczepu Me49, drogą pokarmową, 14 dni po ostatniej dawce	Indukcja odpowiedzi humoralnej i komórkowej rGRA4 – obniżenie liczby cyst w mózgu	[35]
<b>GRA2 GRA6</b>	Produkowane w <i>E. coli</i> , z domeną His-Tag	–	MPL	Myszy CBA/J	20 µg rGRA2 20 µg rGRA6 lub mieszanka 10 mg każde, podskórnice, w tygodniu 0, 3 i 6	20 cyst Pru-b-gal, dootrzewnowo, 3 tygodnie po ostatniej immunizacji	rGRA2 – indukcja silnej odpowiedzi humoralnej i komórkowej oraz znaczącą ochroną przed infekcją chroniczną rGRA6, słaba odpowiedź komórkowa, brak indukcji ochrony	[62]
<b>GRA1 GRA7</b>	–	Plazmidowy, kodujący antygeny GRA1 i GRA7 (VR1020, sekwencja sygnalna tPA)	pGM-CSF	Świnie	500 µg pGRA1 500 µg pGRA7 250 µg pGM-CSF, mieszanika, śródskórnice	Dootrzewnowo 2x10 <sup>3</sup> cyst mózgowych szczepu RH, 4 tygodnie po drugim szczepieniu	Silna odpowiedź komórkowa i humoralna	[63]
<b>GRA1 GRA7 ROP2</b>	–	Plazmidowy, kodujący antygeny GRA1, GRA7 i ROP2	–	Myszy (C57BL/6) (H-2 <sup>b</sup> ) BALB/c (H-2 <sup>d</sup> ), C3H (H-2 <sup>k</sup> )	100 µg pDNA, 3 dawki co 3 tygodnie	C3H-50 cyst IPB-G lub 76K BALB/c-50 lub 200 cyst C57BL/6-10 cyst IPB-G, drogą pokarmową, 6 lub 9 tygodni po ostatnim szczepieniu	U myszy CH3 obniżenie liczby cyst w mózgu Brak ochrony u myszy C57BL/6 oraz BALB/c	[64]
<b>ROP2 GRA5 GRA7</b>	Produkowane w <i>E. coli</i> , z domeną His-Tag	–	CT	Myszy BALB/c	12,5 µg każdego białka, donosowo, 2 dawki w dzień 0 i 21	50 cyst szczepu VEG, drogą pokarmową, 12 dni po ostatniej immunizacji	Znacząca produkcja przeciwciał klasy IgA Wzbudzenie odporności miejscowej Ochrona przed wytwarzaniem cyst mózgowych do poziomu 58,3%	[65]
<b>EC2 (fragmenty antygenowe białek: MIC2, MIC3, SAG1) GRA7</b>	Produkowane w <i>E. coli</i> , z domeną His-Tag fuzyjną His-Tag	Plazmidowy, kodujący fragmenty antygenowe białek MIC2, MIC3, SAG1 i GRA7 (pVRI020)	GERBU	Myszy Swiss F1	10 µg rEC2+pGRA7 10 µg rEC2+rGRA7 2 iniekcje, domięśniowo	20 cyst szczepu 76K, drogą pokarmową	Przeciwciała anti-EC2 – brak rozpoznawania całych tachyzoitów w IFA Szczepionka białko/białko redukcja liczby cyst mózgowych o 79% oraz wzbudzenie silnej odpowiedzi typu 1 Szczepionka białko/DNA – wzbudzenie mieszanej odpowiedzi typu 1 i 2 oraz 28% redukcja poziomu cyst mózgowych	[66]

Tabela 7. Ocena immunogenności i skuteczności szczepionek z wykorzystaniem mieszanek antygenów *T. gondii* c.d.  
Table 7. Estimation of immunogenicity and effectiveness of vaccines containing mixtures of *T. gondii* antigens

Antygen	Białko	DNA	Adiuwant	Zwierzęta	Immunizacja	Zarażenie	Wyniki	Literatura
<b>MIC1</b> <b>MIC4</b>	Oczyszczone z tachyzoitów	–	Kompletny adiuwant Freund. 14 dni później adiuwant niekompletny	Myszy C57BL/6	10 µg, podskórnice, w dniu 0 i 14	80 cyst szczepu Me49, drogą pokarmową	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stymulacja odpowiedzi typu 1</li> <li>• Obniżenie liczby cyst mózgowych o 68%</li> <li>• Wzrost przeżywalności o 80%.</li> </ul>	[32]
<b>Antygeny tachyzoitów zintegrowane z ISCOM</b>	–	–	QuilA ISCOM	Myszy Swiss Webster	5 µg białka + adiuwant, 3 dawki co 6 tygodni	2,5x10 <sup>4</sup> tachyzoitów szczepu C56, 10 cyst szczepu C56 lub 250 oocyst szczepu Me49 dootrzewnowo lub drogą pokarmową, 17dni po ostatniej immunizacji	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Wzrost czasu przeżycia myszy</li> </ul>	[67]
<b>Ekstrakt białek tachyzoitów</b> (lizat sporządzony z zastosowaniem Nonidet P-40)	–	–	Cząsteczki PLG CT	Owce	200 µg białka, donosowo 3 dawki co 2 tygodnie	200 oocyst szczepu M3, drogą pokarmową, 9 tygodni po 1 immunizacji	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Produkcja przeciwciał klasy IgA</li> <li>• Indukcja odpowiedzi komórkowej</li> </ul>	[68]
<b>Pula białek skrecyjno-ekstrakcyjnych (ESA)</b>	–	–	Al(OH) <sub>3</sub>	Myszy C57BL/6 Swiss A/Sn	20 µg ESA, dootrzewnowo, 4 dawki w tygodniu 0, 2, 4 i 6	1x10 <sup>3</sup> tachyzoitów szczepu RH, dootrzewnowo, 2 tygodnie po ostatnim szczepieniu	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Indukcja odpowiedzi komórkowej i humoralnej</li> <li>• Redukcja poziomu parazytemii</li> <li>• Wzrost przeżywalności</li> </ul>	[69]
<b>Pula białek roprtrii</b>	–	–	ISCOM	Świnie	100 µg białka, podskórnice w dniu 0 i 21	4x10 <sup>4</sup> oocyst szczepu VEG w dniu 54	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Częściowa ochrona</li> </ul>	[70]

IL-12 – interleukina 12

pIL-12 – plazmid kodujący interleukinę 12

CT – toksyna cholery

GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów

MPL – monofosforylowany lipid A

GERBU – cząsteczki lipidów kationowych i N-acetyloglukozamino-N-acetylomuramyl-L-alanylo-D-izoglutamina

PLG – poli(DL-laktydo-ko-glikolid)

EC2 – chimeryczny antygen składający się z fragmentów antygenowych białek MIC2, MIC3, SAG1, GRA7

IFA – test immunofluorescencji pośredniej

[25, 26] (Tabela 1). Ponadto, zastosowanie do immunizacji DNA plazmidowego (zawierającego gen kodujący białko SAG1) pozwoliło na uzyskanie 100% ochrony u myszy C3H, natomiast stopień ochrony u myszy BALB/c był niższy i wynosił tylko 80% [41]. W innych przypadkach przedstawionych w Tabeli 2 uzyskiwano jedynie wzrost przeżywalności i obniżenie liczby cyst w mózgu. Spośród pozostałych antygenów powierzchniowych, antygeny SAG2 i SAG3 produkowane w postaci białek rekombinantowych, również nie indukowały 100% ochrony (Tabela 3).

### Antygeny roptrii

Roptrie są wyspecjalizowanymi organellami sekrecyjnymi, unikalnymi dla pasożytów należących do typu Apicomplexa. Zawartość roptrii jest uwalniana do wnętrza wakuoli pasożytniczej, tworzącej się podczas inwazji *T. gondii* do komórki żywiciela. Podstawową funkcją białek zlokalizowanych w tych organellach sekrecyjnych jest ułatwienie biogenezy wakuoli pasożytniczej i wzrostu w niej tachyzoitów. Dotychczas poznane składniki roptrii *T. gondii* zostały oznaczone jako białka ROP (ROP1, ROP2, ROP4, ROP8 i ROP9 oraz inne opisane w ostatnich kilku latach) [27–29]. Spośród tych antygenów jedynie ROP1 i ROP2 były wykorzystywane w badaniach nad szczepionkami przeciwko toksoplazmozie. Testowano przydatność szczepionkową antygeny ROP1 wprowadzonego indywidualnie lub w kоекspresji z innymi antygenami (Tabela 4 i 7). W obu przypadkach uzyskiwano jedynie indukcję silnej swoistej odpowiedzi komórkowej.

Antygen ROP2, różny pod względem funkcjonalnym od ROP1, był szeroko stosowany w badaniach zarówno jako szczepionka DNA, jak i białko rekombinantowe (Tabela 3, 7), pojedynczo lub w kombinacji z innymi białkami antygenowymi. W obu przypadkach nie uzyskiwano jednak pełnej ochrony przed zarażeniem pasożytem.

### Antygeny mikronem

Zawartość mikronem (białka MIC) bierze udział w wiązaniu pasożyta do powierzchni komórki żywiciela [30]. Podstawową funkcją tych białek jest umożliwienie adhezji, a następnie penetracji *T. gondii* do komórek. Antygeny MIC budują trzy podstawowe kompleksy adhezyjne pasożyta. Jednym z pierwszych odkrytych białek umiejscowionych w mikronemach był antygen MIC1 [31]. Wykazano,

iż oczyszczone z tachyzoitów naturalne białko MIC1 powodowało indukcję odpowiedzi typu 1 u myszy, a także znaczną ochronę żywiciela, w postaci obniżenia śmiertelności oraz redukcji liczby cyst tkankowych [32]. Natomiast kolejne antygeny mikronem, MIC2 i MIC3, stosowane jako szczepionki DNA, wzbudzały mieszaną odpowiedź typu 1 i 2 (Tabela 5, 7).

### Antygeny granul o dużej gęstości

Białka wydzielane z granul o dużej gęstości (GRA) odpowiadają za wzrost toksoplazmy wewnątrz wakuoli pasożytniczej (PV) [33]. Główną funkcją antygenów granul jest budowa struktury wewnętrznej PV i przekazywanie składników odżywczych z komórki żywiciela do jej wnętrza. Scharakteryzowano dotychczas czternaście specyficznych białek granul o dużej gęstości (GRA1-14) u *T. gondii*. Spośród antygenów GRA, pod względem ochronnym, najintensywniej były badane antygeny GRA1 oraz GRA7. W przypadku białka GRA1 zdecydowanie bardziej obiecujące wyniki uzyskano przy zastosowaniu szczepionek DNA niż antygeny rekombinantowego produkowanego w bakteryjnym układzie ekspresyjnym, wykorzystującym komórki *E. coli* (Tabela 6). Ponieważ wyniki badań były zachęcające, dlatego też szeroko stosowano białka GRA w mieszankach z innymi antygenami w celu zwiększenia skuteczności szczepionek (Tabela 7).

### Mieszanki antygenowe

Po pierwszych sukcesach i porażkach z zastosowaniem pojedynczych antygenów *T. gondii* do wzbudzania odporności, która mogłaby w pełni chronić przed rozwojem zarażenia tym pasożytem, zaczęto stosować mieszanki antygenów. Do tego celu doskonała okazała się technologia szczepionek DNA, które umożliwiają immunizację kilkoma antygenami (każdy w niezależnym konstrukcie lub konstrukcie multiantygenowym) [34].

Większość badanych mieszanek wzbudzała u myszy rozwój swoistej odpowiedzi zarówno humoralnej, jak i komórkowej, a myszy immunizowane przeżywały zdecydowanie dłużej po zarażeniu pasożytem niż myszy nieszczepione (Tabela 7). Jednakże, żadna z zastosowanych dotychczas mieszanek nie indukowała pełnej ochrony. W przypadku np. zastosowania plazmidowego DNA kodującego fragmenty antygenowe białek MIC2, MIC3, SAG1

i GRA7 uzyskano redukcję liczby cyst mózgowych o 79% (Tabela 7). Z drugiej strony, użycie mieszanek konstruktów plazmidowych kodujących różne antygeny może doprowadzić do osłabienia odpowiedzi immunologicznej, na przykład wskutek kompetycji antygenowej (ROP2 + GRA4) [35].

## Podsumowanie

Jedyna zaaprobowana i wytwarzana komercyjnie szczepionka przeciw toksoplazmozie, zawierająca żywe atenuowane tachyzoity *T. gondii*, jest przeznaczona dla owiec i stosowana tylko w niektórych krajach świata. Od dziesięcioleci prowadzone są intensywne badania nad konstrukcją nowej, bezpieczniejszej niż atenuowana szczepionki, która mogłaby być stosowana nie tylko u zwierząt, ale także u ludzi. Bezpieczna szczepionka powinna być łatwa i relatywnie tania w produkcji. Dlatego też wykorzystanie technologii rekombinantowego DNA wydaje się najbardziej realistycznym podejściem.

Biorąc pod uwagę ogromny wysiłek włożony w badania prowadzone od wielu lat z zastosowaniem antygenów rekombinantowych *T. gondii*, jak również szczepionek DNA nie osiągnięto dotychczas w pełni zadowalających wyników, a przyczyny tego stanu rzeczy są wielorakie. Między innymi, ogromną większość badań przeprowadzono tylko na modelu doświadczalnej toksoplazmozy u myszy. Natomiast niewiele eksperymentów wykonano na dużych zwierzętach, takich jak np. owce, u których, podobnie jak u ludzi, toksoplazmoza może prowadzić do poronień, poważnych uszkodzeń płodów lub ich obumarcia. Dotychczasowe doświadczenia przy opracowywaniu nowych szczepionek przeciw toksoplazmozie wskazują, że szanse na stworzenie efektywnej szczepionki wydają się wzrastać wraz z coraz lepszym zrozumieniem natury odporności ochronnej przeciwko *T. gondii* oraz patogenezie toksoplazmozy.

Dzięki prowadzonym szeroko badaniom udało się stwierdzić, że kilka zdefiniowanych molekularnie antygenów dawało częściową ochronę zarówno w strategii opartej na DNA, jak i na białkach. Jednakże często, uzyskanie silnej redukcji liczby cyst, wymagało równoczesnego wprowadzenia plazmidu kodującego cytokiny, takie jak GM-CSF czy IL-12, wzmacniających immunogenne działanie szczepionki (Tabela 5, 7) [36]. Ponadto bardzo istotną okazała się również droga podania szczepionki oraz zastosowanie adiuwantów nasilających odpowiedź immunologiczną.

Podsumowując warto także nadmienić, iż przy projektowaniu szczepionki przeciwko *T. gondii* (zapobiegającej poronieniom, uszkodzeniom płodu, a także zdolnej do obniżenia poziomu cyst u żywiciela pośredniego) należałoby zdecydowanie zwrócić uwagę na mechanizmy regulacji odporności, która jest swoista dla każdej z faz rozwojowych *T. gondii*.

## Literatura

- [1] Cox F.E. 1997. Designer vaccines for parasitic diseases. *International Journal for Parasitology* 27: 1147–1157.
- [2] Liddell S., Jenkins M.C., Collica C.M., Dubey J.P. 1999. Prevention of vertical transfer of *Neospora caninum* in BALB/c mice by vaccination. *Journal of Parasitology* 85: 1072–1075.
- [3] Woollard D.J., Gauci C.G., Lightowers M.W. 1999. Synthetic peptides induce antibody against a host-protective antigen of *Echinococcus granulosus*. *Vaccine* 18: 785–794.
- [4] Sharma R.L., Bhat T.K., Dhar D.N. 1988. Control of sheep lungworm in India. *Parasitology Today* 4: 33–36.
- [5] Eberl M., Langermans J.A., Vervenne R.A., Nyame A.K., Cummings R.D., Thomas A.W., Coulson P.S., Wilson R.A. 2001. Antibodies to glycans dominate the host response to schistosome larvae and eggs: is their role protective or subversive? *The Journal of Infectious Diseases* 183: 1238–1247.
- [6] Beláková J., Horynová M., Krupka M., Weigl E., Raska M. 2007. DNA vaccines: are they still just a powerful tool for the future? *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 55: 387–398.
- [7] Nielsen H.V., Di Cristina M., Beghetto E., Spadoni A., Petersen E., Gargano N. 2006. *Toxoplasma gondii*: DNA vaccination with bradyzoite antigens induces protective immunity in mice against oral infection with parasite cysts. *Experimental Parasitology* 112: 274–279.
- [8] Wolff J.A., Malone R.W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A., Felgner P.L. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247: 1465–1468.
- [9] Ganley-Leal L.M., Guarner J., Todd C.W., Da'Dara A.A., Freeman G.L. Jr, Boyer A.E., Harn D.A., Secor W.E. 2005. Comparison of *Schistosoma mansoni* irradiated cercariae and Sm23 DNA vaccines. *Parasite Immunology* 27: 341–349.
- [10] Kamath A.T., Groat N.L., Bean A.G., Britton W.J. 2000. Protective effect of DNA immunization against mycobacterial infection is associated with the early emergence of interferon-gamma (IFN-gamma)-secreting lymphocytes. *Clinical Experimental Immunology* 120: 476–482.

- [11] Dumonteil E., Maria Jesus R.S., Javier E.O., Maria del Rosario G.M. 2003. DNA vaccines induce partial protection against *Leishmania mexicana*. *Vaccine* 21: 2161–2168.
- [12] Guo A., Jin Z., Zheng Y., Hai G., Yuan G., Li H., Cai X. 2007. Induction of protection against porcine cysticercosis in growing pigs by DNA vaccination. *Vaccine* 25: 170–175.
- [13] Alexander J., Hunter C.A. 1998. Immunoregulation during toxoplasmosis. *Chemical Immunology* 70: 81–102.
- [14] Lang C., Gross U., Lüder C.G. 2007. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Research* 100: 191–203.
- [15] Denkers E.Y. 1999. T lymphocyte-dependent effector mechanisms of immunity to *Toxoplasma gondii*. *Microbes and Infection* 1: 699–708.
- [16] Alexander J., Jebbari H., Bluethmann H., Satoskar A., Roberts C.W. 1996. Immunological control of *Toxoplasma gondii* and appropriate vaccine design. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 219: 183–195.
- [17] Nagel S.D., Boothroyd J.C. 1989. The major surface antigen, P30, of *Toxoplasma gondii* is anchored by a glycolipid. *Journal of Biological Chemistry* 264: 5569–5574.
- [18] Tomavo S., Schwarz R.T., Dubremetz J.F. 1989. Evidence for glycosyl-phosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. *Molecular Cell Biology* 9: 4576–4580.
- [19] Lekutis C., Ferguson D.J., Boothroyd J.C. 2000. *Toxoplasma gondii*: identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. *Experimental Parasitology* 96: 89–96.
- [20] Manger I.D., Hehl A.B., Boothroyd J.C. 1998. The surface of *Toxoplasma* tachyzoites is dominated by a family of glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens related to SAG1. *Infection and Immunity* 66: 2237–2244.
- [21] Lekutis C., Ferguson D.J., Grigg M.E., Camps M., Boothroyd J.C. 2001. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *International Journal for Parasitology* 31:1285–1292.
- [22] Debard N., Buzoni-Gatel D., Bout D. 1996. Intranasal immunization with SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection. *Infection and Immunity* 64: 2158–2166.
- [23] Bülow R., Boothroyd J.C. 1991. Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. *Journal of Immunology* 147: 3496–3500.
- [24] Petersen E., Nielsen H. V., Christiansen L., Spenter J. 1998. Immunization with *E. coli* produced recombinant *T. gondii* SAG1 with alum as adjuvant protect mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. *Vaccine* 16: 1283–1289.
- [25] Haumont M., Delhaye L., Garcia L., Jurado M., Mazzu P., Daminet V., Verlant V., Bollen A., Biemans R., Jacquet A. 2000. Protective immunity against congenital toxoplasmosis with recombinant SAG1 protein in a guinea pig model. *Infection and Immunity* 68: 4948–4953.
- [26] Biemans R., Grégoire D., Haumont M., Bosseloir A., Garcia L., Jacquet A., Dubeaux C., Bollen A. 1998. The conformation of purified *Toxoplasma gondii* SAG1 antigen, secreted from engineered *Pichia pastoris*, is adequate for serorecognition and cell proliferation. *Journal of Biotechnology* 66: 137–146.
- [27] Bradley P.J., Sibley L.D. 2007. Rhoptries: an arsenal of secreted virulence factors. *Current Opinion in Microbiology* 10: 582–587.
- [28] Dlugonska H. 2008. *Toxoplasma* rhoptries: unique secretory organelles and source of promising vaccine proteins for immunoprevention of toxoplasmosis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* ID 632424: 1–7.
- [29] Ossorio P.N., Schwartzman J.D., Boothroyd J.C. A 1992. *Toxoplasma gondii* rhoptry protein associated with host cell penetration has unusual charge asymmetry. *Molecular and Biochemical Parasitology* 50: 1–15.
- [30] Carruthers V.B. 1999. Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. *Parasitology International* 48: 1–10.
- [31] Fourmaux M.N., Achbarou A., Mercereau-Puijalon O., Biderre C., Briche I., Loyens A., Odberg-Ferragut C., Camus D., Dubremetz J.F. 1996. The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. *Molecular and Biochemical Parasitology* 83: 201–210.
- [32] Lourenço E.V., Bernardes E.S., Silva N.M., Mineo J.R., Panunto-Castelo A., Roque-Barreira M.C. 2006. Immunization with MIC1 and MIC4 induces protective immunity against *Toxoplasma gondii*. *Microbes and Infection* 8: 1244–1251.
- [33] Carruthers V.B., Sibley L.D. 1997. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *European Journal of Cell Biology* 73: 114–123.
- [34] Cui Y.L., He S.Y., Xue M.F., Zhang J., Wang H.X., Yao Y. 2008. Protective effect of a multiantigenic DNA vaccine against *Toxoplasma gondii* with co-delivery of IL-12 in mice. *Parasite Immunology* 30: 309–313.
- [35] Martin V., Supanitsky A., Echeverria P.C., Litwin S., Tanos T., De Roodt A.R., Guarnera E.A., Angel

- S.O. 2004. Recombinant GRA4 or ROP2 protein combined with alum or the *gra4* gene provides partial protection in chronic murine models of toxoplasmosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11: 704–710.
- [36] Zhang J., He S., Jiang H., Yang T., Cong H., Zhou H., Zhang J., Gu Q., Li Y., Zhao Q. 2007. Evaluation of the immune response induced by multiantigenic DNA vaccine encoding SAG1 and ROP2 of *Toxoplasma gondii* and the adjuvant properties of murine interleukin-12 plasmid in BALB/c mice. *Parasitology Research* 101: 331–338.
- [37] Letscher-Bru V., Villard O., Risse B., Zauke M., Klein J., Kien T.T. 1998. Protective effect of vaccination with a combination of recombinant surface antigen 1 and interleukin-12 against toxoplasmosis in mice. *Infection and Immunity* 66: 4503–4506.
- [38] Letscher-Bru V., Pfaff A.W., Abou-Bacar A., Filisetti D., Antoni E., Villard O., Klein J.P., Candolfi E. 2003. Vaccination with *Toxoplasma gondii* SAG-1 protein is protective against congenital toxoplasmosis in BALB/c mice but not in CBA/J mice. *Infection and Immunity* 71: 6615–6619.
- [39] Siachoque H., Guzman F., Burgos J., Patarroyo M.E., Gomez Marin J.E. 2006. *Toxoplasma gondii*: Immunogenicity and protection by P30 peptides in a murine model. *Experimental Parasitology* 114: 62–65.
- [40] Angus C.W., Klivington-Evans D., Dubey J. P., Kovacs J.A., 1999. Immunization with a DNA plasmid encoding the SAG1 (P30) protein of *Toxoplasma gondii* is immunogenic and protective in rodents. *The Journal of Infectious Diseases* 181: 317–324.
- [41] Nielsen H., Lauemøller S., Christiansen L., Buus S., Fomsgaard A., Petersen E. 1999. Complete protection against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice immunized with a plasmid encoding the SAG1 gene. *Infection and Immunity* 67: 6358–6363.
- [42] Chen G., Chen H., Guo H., Zheng H. 2002. Protective effect of DNA-mediated immunization with combination of SAG1 and IL-12 gene adjuvant against infection of *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Chinese Medical Journal* 115: 1448–1452.
- [43] Couper K., Nielsen H.V., Petersen E., Roberts F., Roberts C.W., Alexander J. 2003. DNA vaccination with the immunodominant tachyzoite surface antigen (SAG-1) protects against adult acquired *Toxoplasma gondii* infection but does not prevent maternofetal transmission. *Vaccine* 21: 2813–2820.
- [44] Lundén A., Parmley S.F., Bengtsson K.L., Araujo F.G. 1997. Use of a recombinant antigen, SAG2, expressed as a glutathione-S-transferase fusion protein to immunize mice against *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Research* 83: 6–9.
- [45] Lau Y.L., Fong M.Y. 2008. *Toxoplasma gondii*: Serological characterization and immunogenicity of recombinant surface antigen 2 (SAG2) expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Experimental Parasitology* 119: 373–378.
- [46] Yang C., Chang G., Chao D. 2004. Protective immunity against *Toxoplasma gondii* in mice induced by a chimeric protein rSAG1/2. *Parasitology Research* 92: 58–64.
- [47] Lee Y., Shin D., Lee J., Nam H., Ahn M. 2007. Vaccination against murine toxoplasmosis using recombinant *Toxoplasma gondii* SAG3 antigen alone or in combination with Quil A. *Yonsei Medical Journal* 48: 396–404.
- [48] Guo H., Chen G., Lu F., Chen H., Zheng H. 2001. Immunity induced by DNA vaccine of plasmid encoding the rhoptry protein 1 gene combined with the genetic adjuvant of pcIFN-gamma against *Toxoplasma gondii* in mice. *Chinese Medical Journal* 114: 317–320.
- [49] Chen G., Guo H., Lu F., Zheng H. 2001. Construction of a recombinant plasmid harbouring the rhoptry protein 1 gene of *Toxoplasma gondii* and preliminary observations on DNA immunity. *Chinese Medical Journal* 114: 837–840.
- [50] Leyva R., Herion P., Saavedra R. 2001. Genetic immunization with plasmid DNA coding for the ROP2 protein of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Research* 87: 70–79.
- [51] Ismael A.B., Sekkai D., Collin C., Bout D., Ménélec M.N. 2003. The MIC3 gene of *Toxoplasma gondii* is a novel potent vaccine candidate against toxoplasmosis. *Infection and Immunity* 71: 6222–6228.
- [52] Dautu G., Munyaka B., Carmen G., Zhang G., Omata Y., Xuenan X., Igarashi M. 2007. *Toxoplasma gondii*: DNA vaccination with genes encoding antigens MIC2, M2AP, AMA1 and BAG1 and evaluation of their immunogenic potential. *Experimental Parasitology* 116: 273–282.
- [53] Scorza T., D'Souza S., Laloup M., Dewit J., De Braekeleer J., Verschuere H., Vercammen M., Huygen K., Jongert E. 2003. A GRA1 DNA vaccine primes cytolytic CD8(+) T cells to control acute *Toxoplasma gondii* infection. *Infection and Immunity* 71: 309–316.
- [54] Bivas-Benita M., Laloup M., Verstehey S., Dewit J., De Braekeleer J., Jongert E., Borchard G. 2003. Generation of *Toxoplasma gondii* GRA1 protein and DNA vaccine loaded chitosan particles: preparation, characterization, and preliminary in vivo studies. *International Journal of Pharmaceutics* 266: 17–27.
- [55] Desolme B., Ménélec M.N., Buzoni-Gatel D., Bout D. 2000. Induction of protective immunity against toxoplasmosis in mice by DNA immunization with a plasmid encoding *Toxoplasma gondii* GRA4 gene. *Vaccine* 18: 2512–2521.
- [56] Jongert E., de Craeye S., Dewit J., Huygen K. 2007.

- GRA7 provides protective immunity in cocktail DNA vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunology* 29: 445–453.
- [57] Chen H., Chen G., Zheng H., Guo H. 2003. Induction of immune responses in mice by vaccination with Liposome-entrapped DNA complexes encoding *Toxoplasma gondii* SAG1 and ROP1 genes. *Chinese Medical Journal* 116: 1561–1566.
- [58] Xue M., He S., Zhang J., Cui Y., Yao Y., Wang H. 2008. Comparison of cholera toxin A2/B and murine interleukin-12 as adjuvants of *Toxoplasma* multi-antigenic SAG1-ROP2 DNA vaccine. *Experimental Parasitology* 119: 352–357.
- [59] Xue M., He S., Cui Y., Yao Y., Wang H. 2008. Evaluation of the immune response elicited by multi-antigenic DNA vaccine expressing SAG1, ROP2 and GRA2 against *Toxoplasma gondii*. *Parasitology International* 57: 424–429.
- [60] Mohamed R.M., Aosai F., Chen M., Mun H.S., Norose K., Belal U.S., Piao L.X., Yano A. 2003. Induction of protective immunity by DNA vaccination with *Toxoplasma gondii* HSP70, HSP30 and SAG1 genes. *Vaccine* 21: 2852–2861.
- [61] Mévélec M.N., Bout D., Desolme B., Marchand H., Magné R., Bruneel O., Buzoni-Gatel D. 2005. Evaluation of protective effect of DNA vaccination with genes encoding antigens GRA4 and SAG1 associated with GM-CSF plasmid, against acute, chronic and congenital toxoplasmosis in mice. *Vaccine* 23: 4489–4499.
- [62] Golkar M., Shokrgozar M.A., Rafati S., Musset K., Assmar M., Sadaie R., Cesbron-Delauw M.F., Mercier C. 2007. Evaluation of protective effect of recombinant dense granule antigens GRA2 and GRA6 formulated in monophosphoryl lipid A (MPL) adjuvant against *Toxoplasma* chronic infection in mice. *Vaccine* 25: 4301–4311.
- [63] Jongert E., Melkebeek V., De Craeye S., Dewit J., Verhelst D., Cox E. 2008. An enhanced GRA1–GRA7 cocktail DNA vaccine primes anti-*Toxoplasma* immune responses in pigs. *Vaccine* 26: 1025–1031.
- [64] Vercammen M., Scorza T., Huygen K., De Braekeleer J., Diet R., Jacobs D., Saman E., Verschuere H. 2000. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, and ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. *Infection and Immunity* 68: 38–45.
- [65] Igarashi M., Kano F., Tamekuni K., Kawasaki P.M., Navarro I.T., Vidotto O., Vidotto M.C., Machado R.Z., Garcia J.L. 2008. *Toxoplasma gondii*: cloning, sequencing, expression, and antigenic characterization of ROP2, GRA5 and GRA7. *Genetics and Molecular Research* 7: 305–313.
- [66] Jongert E., Verhelst D., Abady M., Petersen E., Gargano N. 2008. Protective Th1 immune responses against chronic toxoplasmosis induced by a protein–protein vaccine combination but not by its DNA–protein counterpart. *Vaccine* 26: 5289–5295.
- [67] Lundén A., Lövgren K., Ugglå A., Araujo F.G. 1993. Immune responses and resistance to *Toxoplasma gondii* in mice immunized with antigens of the parasite incorporated into immunostimulating complexes. *Infection and Immunity* 61: 2639–2643.
- [68] Stanley A.C., Buxton D., Innes E.A., Huntley J.F. 2004. Intranasal immunisation with *Toxoplasma gondii* tachyzoite antigen encapsulated into PLG microspheres induces humoral and cell-mediated immunity in sheep. *Vaccine* 22: 3929–3941.
- [69] Costa-Silva T.A., Meira C.S., Ferreira I.M., Hiramoto R.M., Pereira-Chioccola V.L. 2008. Evaluation of immunization with tachyzoite excreted-secreted proteins in a novel susceptible mouse model (A/Sn) for *Toxoplasma gondii*. *Experimental Parasitology* 120: 227–234.
- [70] Garcia J.L., Gennari S.M., Navarro I.T., Machado R.Z., Sinhorini I.L., Freire R.L., Marana E.R., Tsutsui V., Contente A.P., Begale L.P. 2005. Partial protection against tissue cysts formation in pigs vaccinated with crude rhoptry proteins of *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology* 129: 209–217.

Wpłynęło 30 listopada 2008

Zaakceptowano 3 lutego 2009