

Postępy w opracowywaniu szczepionek przeciwko robakom pasożytniczym

Progress in the development of vaccines against helminths

Monika Kozak, Marta Kołodziej-Sobocińska

Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN, ul. Twarda 51/55, 00-818 Warszawa;
E-mail: mkozak@twarda.pan.pl

ABSTRACT. Helminth infections are an important health problem for both humans and animals worldwide. The most sought for prophylactic strategy is vaccination due to the increasing incidence of anthelmintic resistance with little progress towards the discovery of novel drugs. However, the development of efficient anti-parasitic vaccines was proven to be a far greater challenge than in the case of bacteria or viruses. This is partly a result of the complex immunological interactions occurring during helminth infections, which are not yet fully understood, especially regarding the immune mechanisms conveying protection. Another problem is progressing from the research phase of vaccine development to commercial production and marketing. The advances made so far in developing efficient vaccines against helminth vary among the different classes, with a wide spectrum of both native and recombinant vaccine candidates. This review aims at presenting the current status and most important achievements in the field of helminth vaccine development, as well as the main obstacles and difficulties standing in the way of progress and practical applications.

Key words: helminths, vaccines, immunology, cestodes, trematodes, nematodes

Wstęp

Helmintozy stanowią poważny problem zdrowotny u ludzi i zwierząt na całym świecie. Liczne prace szacują, że setki milionów ludzi jest zarażonych robakami pasożytniczymi [1–3]. Wysoka prevalencja dotyczy zwłaszcza regionów rozwijających się w Afryce, Azji i Amerykach. Osoby zamieszkujące ubogie rejony stref tropikalnych i subtropikalnych są zwykle przewlekle zarażone więcej niż jednym gatunkiem helmintów [4, 5]. Najczęściej występuje zarażenie glistami, włosogłówkami i tęgoryjcami, a następnie schistosomami i filariami [6]. Skutki tych parazytoz są poważne, ponieważ najbardziej podatne są na nie dzieci i młodzież w wieku szkolnym, co prowadzi do ich nieprawidłowego rozwoju fizycznego oraz intelektualnego, a w konsekwencji do gorszych wyników w nauce i mniejszych szans na podwyższenie standardu życia. [7–11]. Obecność helmintów u zwierząt hodow-

lanych prowadzi zaś do poważnych strat ekonomicznych w hodowli na całym świecie. Straty te wynikają zarówno z obniżonej produktywności zwierząt (obniżenie przyrostów masy ciała, gorsza jakość mleka, wełny) jak i z wysokich kosztów zwalczania i leczenia. Najlepszym sposobem uniknięcia niepożądanych skutków chorób pasożytniczych byłaby immunoprofilaktyka, zwłaszcza, że obserwuje się narastanie zjawiska lekooporności [12–14], a postępy w opracowywaniu nowych generacji leków przeciworobaczych są niewielkie [15]. Opracowanie skutecznych szczepionek przeciw pasożytniczym okazało się zadaniem dużo trudniejszym niż w przypadku bakterii czy wirusów. Jedynie dwie szczepionki przeciwrobacze, jakie zostały wprowadzone na rynek były przeciw *Dictyocaulus viviparus* oraz *Ancylostoma caninum* i w obu przypadkach zastosowano atenuowane larwy [16]. Szczepionka przeciwko *D. viviparus*, nicieniowi płucnemu bydła, pojawiła się w latach 50. XX w.

pod nazwą handlową Dictol lub Huskvac i jest obecna na rynku do dziś. Szczepionka ta charakteryzowała się bardzo wysoką skutecznością, ale do podtrzymania efektu jej działania niezbędne były kolejne kontakty z pasożytem. Jeśli u zwierząt stosowano antyhelminthyki, tym samym hamowano efekt szczepienia i z czasem stawały się one ponownie, całkowicie podatne na zarażenie. Ponadto, szczepienie nie prowadziło do zwalczania choroby i usunięcia pasożyta ze środowiska, a zatem konieczne było coroczne szczepienie każdego nowego pokolenia cieląt. Powyższe wady tej szczepionki wraz z jej małą stabilnością sprawiły, że od lat 70. XX w. jej sprzedaż malała, wraz ze wzrastającym użyciem preparatów przeciwoznacznych, a obecnie istnieje potrzeba na opracowanie bardziej trwałego i długotrwale skutecznego preparatu [17]. W przypadku *A. caninum*, tęgoryjca psów, skuteczność szczepionki opracowanej w latach 70. polegała na obniżeniu intensywności zarażenia, a tym samym na zmniejszeniu skutków patologicznych choroby [18]. Nie powodowała ona pełnej odporności, a więc psy pozostawały podatne na zarażenie, nadal wykazując obecność jaj w kale. Te cechy preparatu wraz z krótką trwałością i dużymi kosztami produkcji sprawiły, że szczepionka została wycofana z rynku po około 2 latach od wdrożenia [19]. Podstawowymi problemami szczepionek wykorzystujących atenuowane pasożyty są ich krótka trwałość (zawierają całe organizmy pasożytów) i wysokie koszty produkcji. Bardziej praktycznym rozwiązaniem byłyby szczepionki oparte na zdefiniowanych antygenach pasożytniczych. Jak dotąd sukcesy z zastosowaniem takiej strategii są nikłe. Wynika to z większej złożoności organizmów pasożytniczych – z reguły kilku stadiów rozwojowych, strategii i różnych miejsc wnikania do żywicieli oraz z bardzo skomplikowanych interakcji z układem odpornościowym żywiciela, które nie są w pełni jak dotąd poznane [6, 19]. Zrozumienie zjawisk immunologicznych zachodzących podczas infekcji pasożytniczej, a zwłaszcza jaki rodzaj odpowiedzi zapewnia odporność, jest niezbędne do odniesienia sukcesów na polu immunoprofilaktyki [6].

Odpowiedź immunologiczna na infekcje robaków

Większość z helmintów wywołuje w organizmie żywiciela ten sam rodzaj odpowiedzi immunologicznej [20]. Jest to odpowiedź typu drugiego (Th2) i wydaje się, że wyewoluowała ona właśnie, jako

mechanizm obronny przeciwko tej grupie patogenów. Najważniejszymi cechami tego typu odpowiedzi są: różnicowanie limfocytów T pomocniczych (CD4+) w komórki typu Th2, mobilizacja makrofagów, eozynofików, bazofików i mastocytów oraz indukcja produkcji przeciwciał klasy IgE i IgG1 przez limfocyty B. Dla odpowiedzi tej, charakterystyczne jest także wydzielanie cytokin: IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 oraz niedawno wykrytych IL-21 i IL-25 [21, 22]. Ważnym aspektem odpowiedzi typu Th2 jest aktywacja makrofagów drogą alternatywną. Fenotyp makrofagów aktywowanych pod wpływem cytokin Th2, jak IL-4 czy IL-13 różni się od klasycznie aktywowanych podczas odpowiedzi typu Th1. Przede wszystkim ekspresji ulega arginaza, która metabolizuje argininę, prowadząc do powstania L-ornityny i mocznika, blokując wytwarzanie tlenku azotu (NO) przez syntazę NO [23]. Obraz interakcji między różnymi populacjami komórek zaangażowanych w ten typ odpowiedzi nie jest jednak jeszcze w pełni poznany. Niedawno został obalony klasyczny schemat polaryzacji komórek pomocniczych na Th1 i Th2. Wykazano, że istnieje dodatkowo subpopulacja Th17, charakteryzująca się wydzielaniem IL-17 [24, 25]. Choć ich funkcja nie została w pełni poznana to wiadomo, że pobudzają mobilizację i wytwarzanie neutrofilów w odpowiedzi na czynniki pochodzenia bakteryjnego i grzybiczego. Rola limfocytów Th17 w zakażeniach robaczych pozostaje do ustalenia, ale uważane są one za pomost pomiędzy odpornością swoistą i nieswoistą [26]. Ponadto w ten obraz włączają się limfocyty regulatorowe (supresorowe) oraz Th3 (wydzielające immunosupresyjne cytokiny: IL-10 oraz TGF-β) [27]. Skutkiem rozwoju odpowiedzi typu Th2 jest uaktywnienie mechanizmów mających na celu zwalczanie pasożytów – aktywacja układu dopełniacza, cytotoksyczności zależnej od przeciwciał, wydzielanie reaktywnych form tlenu przez makrofagi i neutrofile czy głównego białka zasadowego przez eozynofile, przyspieszanie perystaltyki jelit i zwiększona produkcja śluzu [28]. Wiele badań wykazało własności immunogenne substancji wydzielanych przez helminty, które kierują odpowiedź immunologiczną na typ Th2, poprzez oddziaływanie na komórki dendrytyczne (prezentującymi antygeny naiwnym limfocytom T) [29–31], czy z receptorami Toll-podobnymi [32–35]. U niektórych gatunków odpowiedź ta jest skuteczna, zwłaszcza przy powtórnej infekcji, a także widać wyraźny spadek podatności na helminty wraz z wiekiem. Natomiast w wielu przypadkach helminty wytworzyły mecha-

nizmy unikania odpowiedzi immunologicznej żywiciela czyniąc ją nieskuteczną. Mogą one zaburzać funkcjonowanie układu dopełniacza [36], rozkładać immunoglobuliny żywiciela [37], czy wykorzystywać mimikrę molekularną – utrzymywać na powierzchni ciała cząsteczki żywiciela bądź produkować czynniki immunoregulujące takie jak cytokiny, które zaburzają przebieg procesów immunologicznych [38]. Pomimo ciągłych postępów w poznaniu złożonych zależności i mechanizmów regulujących odpowiedź immunologiczną nadal nie rozumiemy w pełni, jakie mechanizmy warunkują powstawanie odporności na zarażenie helmintami [39]. Pełniejsze poznanie tych mechanizmów immunologicznych, które prowadzą do powstania odporności żywiciela, ułatwiłoby pracę nad opracowaniem skutecznych szczepionek.

Strategie szczepionkowe

W opracowaniu szczepionek przeciw pasożytniczym konieczne jest ustalenie jaki cel ma zostać osiągnięty. Jak dotąd nie wydaje się, aby możliwe było uzyskanie całkowitego zwalczania czy też bliskiej 100% skuteczności w przeciwdziałaniu infekcjom pasożytniczym, jak to jest przy zastosowaniu szczepionek przeciwbakteryjnych i przeciwwirusowych [40]. W przypadku helmintów możemy rozważać cele takie jak: redukcja ekstensywności zarażenia, zmniejszenie skutków patologicznych czy zablokowanie transmisji. Osiągnięcie każdego z tych celów może mieć znaczący wpływ na obniżenie znaczenia epidemiologicznego chorób pasożytniczych [40]. W odniesieniu do infekcji pasożytniczych możemy oddzielnie rozważać stopień rozwoju zmian patologicznych i poziom parazytemii [20]. W większości przypadków uszkodzenia wynikające z przewlekłego zarażenia są przynajmniej częściowo konsekwencją niekorzystnych skutków toczących się reakcji obronnych (immunopatologii) w odpowiedzi na infekcję pasożytniczą [41], która nie zawsze jest wprost proporcjonalna do liczby pasożytów. Zablokowanie rozwoju pewnych szkodliwych aspektów odpowiedzi immunologicznej może okazać się wystarczające do zmniejszenia skutków choroby i zwiększenia komfortu życia żywiciela. Również zablokowanie transmisji pasożyta w środowisku może przynieść wyraźne korzyści. Według obliczeń Barnes i wsp. [42] szczepionka przeciwko *Trichostrongylus* o 80% skuteczności, działająca u 80% osobników w stadzie już dawałaby korzyści większe niż tradycyjny program zwalczania oparty

na lekach przeciworobaczych. Podobnie obliczono, że szczepionka redukująca produkcję jaj *Ostertagia ostertagii* o 60% przez pierwsze 2 miesiące wypasu cieląt byłaby wystarczająca do kontrolowania oster-tagiozy w Europie północno-zachodniej [43].

Trudności w opracowaniu skutecznych szczepionek

Poszukiwanie antygenów mających zastosowania jako szczepionki odbywa się dwiema zasadniczymi drogami: frakcjonowanie antygenów natywnych bądź selekcja i produkcja antygenów rekombinowanych. Pierwsza droga stwarza trudności w identyfikacji białka oraz właściwym oczyszczeniu kandydata o potencjalnych właściwościach immunogennych. Ograniczeniem drugiej strategii jest fakt, że wersje rekombinowane antygenów mogą nie mieć właściwości immunogennych antygeny natywnego ze względu na niewłaściwą konformację bądź obróbkę post-translacyjną, zwłaszcza w zakresie glikozylacji. Dlatego w przypadku braku efektu ochronnego nie mamy pewności, czy jest to wynik niewłaściwej selekcji kandydata czy też niewłaściwej jego struktury III- czy IV-rzędowej lub obróbki post-translacyjnej. Uważa się, zatem, że najlepszą drogą jest wstępna ocena formy natywnej antygeny, a następnie podjęcie próby uzyskania wersji rekombinowanej. Jednakże, antygen rekombinowany często nie pozwala na uzyskanie tych samych wyników, co natywny odpowiednik, co może być wynikiem niewłaściwego systemu ekspresji bądź też tego, że forma natywna zawierała dodatkowe czynniki kontaminujące, które miały swój udział w stymulacji odpowiedzi immunologicznej [44]. Choć więcej sukcesów uzyskano przy zastosowaniu antygenów natywnych to ich wykorzystanie niesie za sobą ograniczenia natury praktycznej, ponieważ produkcja takich antygenów na skalę przemysłową jest właściwie niemożliwa, stąd większość wysiłków skupiona jest na uzyskaniu odpowiedniej jakości form rekombinowanych w rozmaitych systemach ekspresyjnych. Kolejnym wyzwaniem jest dobór odpowiedniego adiuwantu, który, jak wykazano, w przypadku antygenów pasożytów jest niezbędnym elementem skutecznej szczepionki, kierującym odpowiedzi immunologiczną na właściwe tory [45]. Dobór właściwego adiuwantu zależy nie tylko od gatunku pasożyta oraz żywiciela, ale także od rodzaju samego antygeny [40, 45]. Zróżnicowanie genetyczne żywicieli również stanowi problem w tworzeniu szczepionek. Liczne badania wykazały, że

skuteczność antygeny może się znacznie różnić w zależności od rasy czy szczepu zwierzęcia doświadczalnego [39]. Większość helmintów zmienia stadia rozwojowe i lokalizację tkankową w trakcie swojego rozwoju w organizmie żywicielskim, co sprawia, że trudne może być znalezienie jednego antygeny, który zapewni pełną ochronę, a raczej konieczne będzie dobranie odpowiedniego koktajlu antygenowego [39, 40, 46]. Wstępne badania nad skutecznością kandydatów szczepionkowych prowadzone są zwykle na zwierzętach laboratoryjnych, które w ograniczonym zakresie odzwierciedlają reakcje właściwych żywicieli. Często obiecujące wyniki badań nad skutecznością antygeny uzyskane u zwierząt laboratoryjnych nie mogą być odtworzone u żywicieli docelowych [39]. Ponadto próby szczepionkowe przeprowadzone w warunkach eksperymentalnych mogą dać zupełnie inne wyniki w terenie, przy zarażeniach naturalnych. Przykładem może być motyllica wątrobowa, w przypadku której w większości badań nad skutecznością antygenów szczepionkowych stosuje się jednorazową dawkę około 200 metacerkarii. Jednak w warunkach naturalnych żywiele nigdy nie otrzymują takiej dawki, natomiast wielokrotnie otrzymują małe ilości form inwazyjnych, przez co dynamika infekcji jest zupełnie inna, łącznie z przebiegiem procesów immunologicznych [47, 48]. W przypadku niektórych antygenów niemożliwe jest przejście ze skali laboratoryjnej na produkcję przemysłową, ponieważ wpływa to na wydajność, koszty produkcji, stabilność, czystość czy trwałość produktu [45]. Ostatnią przeszkodą w wyprodukowaniu szczepionki, gdy badania wstępne wskazują na potencjalny sukces, są aspekty finansowe związane z komercjalizacją produktu. Potencjalne zyski uzyskane ze sprzedaży produktu końcowego muszą uzasadniać nakłady i ryzyko związane z wdrożeniem produkcji. Jeśli potencjalne zyski nie są zachęcające nawet wysoce skuteczna szczepionka może nigdy nie doczekać się wprowadzenia na rynek. Zwłaszcza, jeżeli produkt ma zastosowanie u żywicieli pośrednich, ale skutki ochrony dotyczą żywicieli ostatecznych, czego przykładem może być szczepienie zwierząt gospodarskich przeciwko larwom tasiemców aby chronić ludzi. Ciężar finansowy spoczywa wówczas na grupie konsumpcyjnej, która nie uzyskuje wymiernych korzyści z poniesionych nakładów, a zatem pozyskanie inwestorów do wdrożenia produktu na rynek może być bardzo trudne [49].

Tasiemce

Największe sukcesy w opracowywaniu szczepionek przeciw pasożytniczych zostały odniesione w przypadku tasiemców. Szczepionka 45W przeciwko *Taenia ovis* u owiec jest pierwszą wysoce skuteczną rekombinowaną szczepionką przeciwko infekcji pasożytniczej i kamieniem milowym w rozwoju nauk parazytologicznych [50]. Szczepionka zawiera antygen To45W, białko pochodzące z otoczek onkosfer. Szczepionka ta przeszła wszystkie etapy aż do rejestracji na użytek komercyjny w Nowej Zelandii. Jednakże, nie doczekała się nigdy wdrożenia na rynek ze względu na brak zainteresowania ze strony przemysłu na finansowanie tego przedsięwzięcia [49]. Sukces tej szczepionki zapoczątkował badania nad podobnymi antygenami u innych gatunków tasiemców. Antygeny analogiczne do 45W sklonowano z *T. saginata*, co doprowadziło do wytworzenia szczepionki TSA9/TSA18, chroniącej bydło z ponad 95% skutecznością [51]. Los tej szczepionki jest jednak podobny jak poprzedniczki. W przypadku *T. solium*, pośród zidentyfikowanych homologów TSOL18 i TSOL45-1A [52, 53], ten pierwszy wykazał 99% skuteczność u świń w pięciu różnych próbach szczepionkowych ale stopień zaawansowania prac jest niewielki i wymaga dalszych badań [54, 55]. Z pomocą homologów 45W nie udało się uzyskać odporności przeciw *Echinococcus granulosus*, natomiast strategia frakcjonowania antygenów natywnych pozwoliła na zidentyfikowanie, sklonowanie i ekspresję antygeny EG95 wykazującego wysoką skuteczność przeciwko doświadczalnemu zarażeniu jajami tasiemca u owiec [56, 57]. Szczepionka ta jest w trakcie przygotowania do produkcji i wdrażania, ale nie jest pewne czy uda się przeprowadzić jej pełną komercjalizację [49].

Przywry

Najważniejszymi gatunkami do opracowywania szczepionek wśród przywr są *Schistosoma* i *Fasciola* spp., jednak dotychczasowe sukcesy w opracowywaniu skutecznych szczepionek są dużo mniejsze niż przeciwko tasiemcom. W przypadku schistosom stosowane są strategie mające na celu nie tylko zmniejszenie liczby przywr, lecz także obniżenie płodności pasożyta, ponieważ to właśnie jaja są odpowiedzialne za patologię i transmisję. Rekombinowana transferaza S-glutationu *S. japonicum* – Sj26GST, enzym odpowiedzialny za detoksykację

lipofilowych cząsteczek, wykazywała nieznaczną zdolność do redukcji liczby przywr oraz około 50% obniżenie produkcji jaj u myszy, owiec, bydła i świń [58]. Rekombinowane GST *S. mansoni* – Sh28GST chroniło zarówno przeciwko *S. mansoni* jak i *S. haematobium*, ze skutecznością 75–80% u naczelnych oraz 85–94% u cieląt, prowadząc jednocześnie do radykalnego obniżenia produkcji jaj [59–61]. Obecnie białko to, wytworzone w komórkach drożdży, przechodzi pierwszy etap prób klinicznych u ludzi [62]. Przy zarażeniu *F. hepatica* GST wywoływało bardzo zmienne i niepowtarzalne efekty uodpornienia od 0% do 65% u owiec oraz od 19% do 69% u bydła [63, 64]. Ze względu na tak duże zróżnicowanie w uzyskiwanych wynikach, dalsze badania nad tymi antygenami zostały porzucone. Paramiozyna, wielofunkcyjne białko, zarówno w postaci natywnej i rekombinowanej (Sj97) wykazywała właściwości uodparniające przeciwko *S. japonicum* u myszy, bawołów i innych ssaków [58]. Inhibitor proteaz serynowych został wskazany jako potencjalny kandydat na szczepionkę przy poszukiwaniu białek o właściwościach immunogennych w bibliotece ekspresyjnej *S. japonicum* za pomocą surowic *Microtus fortis*, żywiciela posiadającego naturalną odporność na zarażenia przywrą. Próby na myszach dały 36% uodpornienie oraz 39% redukcją liczby wydalanych jaj. Enzym glikolityczny, izomeraza triozofosforanowa w postaci szczepionki DNA powodowała redukcję liczby przywr u świń o 48,3%, liczby jaj w wątrobie o 49,4% oraz tworzenie ziarniniaków o 42% [65]. Grupa białek wiążących kwasy tłuszczowe (FABP) jest szeroko badana jako kandydaci na szczepionki ze względu na ich istotną rolę w pobieraniu kwasów tłuszczowych z krwi żywiciela, ważnych dla przywr składników odżywczych, ponieważ nie są one zdolne do ich syntezy *de novo* [39, 64]. Wariant 14kDa *S. japonicum*, otrzymany w formie rekombinowanej z GST jako partnerem fuzyjnym pozwolił na uzyskanie 34,3% uodpornienie u myszy, 31,9% u szczurów i 59,2% u owiec [66]. Rekombinowany odpowiednik FABP 12 kDa u *Fasciola hepatica* chronił króliki przed eksperymentalnym zarażeniem w 40 do 76% w poszczególnych próbach. Antygen ten w podobnym stopniu powodował redukcję wielkości przywr, produkcji jaj i zmian patologicznych [67, 68]. Niestety u owiec nie udało się już uzyskać tak dobrych wyników, natomiast badania te pokazały duży wpływ rodzaju adiuwantu na wynik szczepienia – od 0 przy użyciu adiuwantu Freund'a do 23,5% przy zastosowaniu adiuwantu Montanide

[69, 70]. Ciekawym kandydatem do zastosowania jako szczepionka jest antygen Sm14, FABP pochodzący z *S. mansoni*, który wywoływał odporność u myszy zarówno przeciwko *S. mansoni* jak i *F. hepatica*, w przypadku tej drugiej uzyskano redukcję o 59% [71]. Kolejnym antygenem z tej grupy jest białko o bardzo niskiej gęstości wiążące lipoproteiny (SVLBP), również odgrywające ważną rolę w pobieraniu lipidów przez pasożyta [72]. Immunizacja rekombinowaną formą tego białka prowadziła do redukcji liczby przywr w wątrobach i naczyniach żylnych u myszy odpowiednio o 33,5% i 47,6% [73]. Dużą grupą białek, wśród której poszukiwano potencjalnych szczepionek, są proteazy cysteinowe. Należą tu enzymy biorące udział w odżywianiu, penetracji, unikaniu odpowiedzi immunologicznej i immunomodulacji [74, 75]. Najszerzej badanymi są katepsyny L, które w kolejnych próbach u bydła dawały uodpornienie od 38,2% do 68,5%, a w połączeniu z innym antygenem – hemoglobina motyliczą poziom odporności osiągnął od 51,9% do 72,4%, przy jednoczesnym obniżeniu produkcji jaj o 80–98% [74, 77]. Natomiast u owiec, wyniki te były bardziej rozbieżne, zależne od rasy – od braku efektu do 34% redukcji liczby przywr [64, 76]. Aminopeptydaza leucynowa to metaloproteaza o masie 54kDa, wydzielana w jelicie motylicy wątrobowej odpowiedzialna za trawienie pokarmu [76, 78]. W połączeniu z katepsyną L1 i L2 prowadziła do uzyskania uodpornienia dochodzącego do 79%, a samodzielnie nawet do 89,6%. Forma rekombinowana wywoływała 80% uodpornienie królików [79].

Nicenie

Najważniejszymi gatunkami nicieni spotykanyymi u ludzi są *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Ancylostoma* spp. oraz *Necator americanus* będące przyczyną infekcji odpowiednio 1221, 795 i 740 milionów ludzi [80]. Wśród nich, tęgoryjce charakteryzują się większą chorobotwórczością w porównaniu z pozostałymi helmintozami pochodzenia glebowego [81]. Stąd największe wysiłki skupione są na opracowywaniu szczepionki przeciwko tej grupie nicieni. Celem takiej szczepionki jest: redukcja penetracji larw L3, zaburzenie rozwoju L3 do postaci dorosłych, upośledzenie odżywiania osobników dorosłych oraz obniżenie płodności [82]. Poszukiwania rozpoczęto od produktów ekskrecyjno-sekrecyjnych larw L3, spośród których zidentyfikowano ASP-1 (*Ancylostoma secreted pro-*

tein-1) i ASP-2. Największy poziom ochrony zapewniał ASP-2, zarówno u psowatych [78] jak i chomików – modeli tęgoryjczy [83, 84] i jest uważany za najbardziej obiecujący spośród antygenów larwalnych. U przeżuwaczy największe zagrożenie stanowi *Haemonchus contortus*, krwio pijny nicien z rodziny Trichostrongylidae i to jemu poświęcono najwięcej wysiłku w opracowywaniu szczepionek. W przypadku *H. contortus*, natywny homolog ASP-2 pozwolił na uzyskanie 85% odporności u jagniąt [85]. Inny antygen larwalny, Hc-sL3 występujący na powierzchni osłonek larw L3 *H. contortus*, powodował redukcję liczby pasożytów o 45–55% oraz produkcji jaj o 64–69% [86]. Ważną grupą antygenów szczepionkowych u krwio pijnych nicieni są występujące na powierzchni jelita enzymy biorące udział w trawieniu pokarmu [87]. Najbardziej skutecznym spośród nich jest białko H11, aminopeptydaza występująca na powierzchni mikrokosmków komórek jelitowych larw L4 i osobników dorosłych. Stosowana jako szczepionka powoduje poziom uodpornienia u owiec powyżej 90% [88]. Wywołanie odporności jest zależne od poprawnej konformacji białka, denaturacja znacznie obniża skuteczność szczepienia [89]. Hemoglobinaza aspartanowa pochodząca od *Ancylostoma caninum* (Ac-APR-1), odpowiedzialna za degradację hemoglobiny, w formie rekombinowanej, aktywnej enzymatycznie w sposób znaczący obniżała liczbę nicieni, liczbę wydalanych jaj, a co najważniejsze chroniła psy przed utratą krwi i zapobiegała rozwojowi anemii [90]. Jest to pierwsze doniesienie o szczepionce przeciwko krwio pijnemu pasożyтови, która skutecznie zapobiega utracie krwi i redukuje liczbę robaków. Kilka innych proteaz aspartylowych i metaloproteaz zostało wskazanych jako potencjalni kandydaci w postaci natywnej, natomiast jak dotychczas nie udało się uzyskać aktywnej formy rekombinowanej, co jest warunkiem wywołania odporności przez te antygeny. Przewiduje się, że w najbliższych latach zarówno APR-1 jak ASP-2 przejdą do fazy próbnej produkcji i prób klinicznych [40].

Podsumowanie

Postęp w pracach nad szczepionkami przeciwo-baczymi jest zróżnicowany u odmiennych grup helminatów. Jest wiele antygenów pasożytniczych, za pomocą których udało się uzyskać częściowe uodpornienie żywicieli, jednak zbyt małe aby wprowadzić je do produkcji. Istnieje wiele przeszkód

do pokonania zanim może pojawić się ogólnodostępny produkt, a nawet skuteczny antygen nie gwarantuje sukcesu komercyjnego, podlegając ograniczeniom związanym z produkcją na skalę przemysłową, czy też prawom rynkowym – popytu i podaży. Dodatkowo nakłady finansowe na badania nad helmintozami są coraz mniejsze i coraz trudniej jest uzyskać fundusze oraz publikować wyniki badań nad częściowo skutecznymi antygenami w renomowanych czasopismach [91]. To prowadzi do zmniejszenia zainteresowania tą dziedziną badań, zniechęcenia do kontynuowania pracy w kierunku celu, który w tej chwili wydaje się mało realny. Jednakże konieczne jest podtrzymywanie badań w zakresie immunoprofilaktyki, ponieważ warunkuje to dalsze sukcesy, a zdobyta wiedza i doświadczenia, zwłaszcza dotyczące immunologii zakażeń i mechanizmów warunkujących odporność jest bezcenna i może prowadzić do skuteczniejszej ochrony zdrowia ludzi i zwierząt.

Literatura

- [1] de Silva N.R., Brooker S., Hotez P.J., Montresor A., Engels D., Savioli L. 2003. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends in Parasitology* 19: 547–551.
- [2] Steinmann P., Keiser J., Bos R., Tanner, M., Utzinger, J. 2006. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, metaanalysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infectious Diseases* 6: 411–425.
- [3] Ottesen E.A. 2006. Lymphatic filariasis: treatment, control and elimination. *Advances in Parasitology* 61: 395–441.
- [4] Hotez P.J., Molyneux D.H., Fenwick A., Ottesen E., Ehrlich Sachs S., Sachs J.D. 2006. Incorporating a rapid impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. *PLoS Medicine* 3: e102.
- [5] Hotez P.J., Molyneux D.H., Fenwick A., Kumaresan J., Sachs S.E., Sachs J.D., Savioli L. 2007. Control of neglected tropical diseases. *New England Journal of Medicine* 357: 1018–1027.
- [6] Hotez P.J., Brindley P.J., Bethony J.M., King C.H., Pearce E.J., Jacobson J. 2008. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *The Journal of Clinical Investigation* 118: 1311–1321.
- [7] Crompton D.W., Nesheim M.C. 2002. Nutritional impact of intestinal helminthiasis during the human life cycle. *Annual Review of Nutrition* 22: 35–59.
- [8] Miguel, E.A., Kremer, M. 2003. Worms: identifying impacts on education and health in the presence of treatment externalities. *Econometrica* 72: 159–217.
- [9] Nokes C., Grantham-McGregor S.M., Sawyer A.W.,

- Cooper E.S., Robinson B.A., Bundy D.A. 1992. Moderate to heavy infections of *Trichuris trichiura* affect cognitive function in Jamaican school children. *Parasitology* 104: 539–547.
- [10] Bleakley H. 2003. Disease and development: evidence from the American South. *Journal of the European Economics Association* 1: 376–386.
- [11] Molneux D.H., Hotez P.J., Fenwick A. 2005. „Rapid impact” interventions: how a policy of integrated control for Africa’s neglected tropical diseases could benefit the poor. *PLoS Medicine* 2: e336.
- [12] Sangster N. 1999. Anthelmintic resistance: past, present and future. *International Journal for Parasitology* 29: 115–124.
- [13] Waller P.J. 1997. Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology* 72: 391–412.
- [14] Kaplan R.M. 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology* 20: 477–481.
- [15] Chirac P., Torreele E. 2006. Global framework on essential health R&D. *Lancet* 367: 1560–1561.
- [16] Hein W.R., Harrison G.B.L. 2005. Vaccines against veterinary helminths. *Veterinary Parasitology* 132: 217–222.
- [17] McKeand J.B. 2000. Vaccine development and diagnostics of *Dictyocaulus viviparus*. *Parasitology* 120: S17–S23.
- [18] Miller T.A. 1978. Industrial development and field use of the canine hookworm vaccine. *Advances in Parasitology* 16: 333–342.
- [19] Lightowers M.W. 1994. Vaccination against animal parasites. *Veterinary Parasitology* 54: 177–204.
- [20] van Riet E., Hartgers F.C., Yazdanbakhsh M. 2007. Chronic helminth infections induce immunomodulation: Consequences and mechanisms. *Immunobiology* 212: 475–490.
- [21] Fort M.M., Cheung J., Yen D., Li J., Zurawski S.M., Lo S., Menon S., Clifford T., Hunte B., Lesley R., Muchamuel T., Hurst S.D., Zurawski G., Leach M.W., Gorman D.M., Rennick D.M. 2001. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 15: 985–995.
- [22] Perrigoue J.G., Li J., Zaph C., Goldschmidt M., Scott P., de Sauvage F.J., Pearce E.J., Ghilardi N., Artis D. 2007. IL-31–IL-31R interactions negatively regulate type 2 inflammation in the lung. *The Journal of Experimental Medicine* 204: 481–497.
- [23] Modolell M., Corraliza I.M., Linka F., Soler G., Eichmann K. 1995. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *European Journal of Immunology* 25: 1101–1104.
- [24] Harrington L.E., Hatton R.D., Mangan P.R., Turner H., Murphy T.L., Murphy K.M., Weaver C.T. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology* 6: 1123–1132.
- [25] Park H., Li Z., Yang X.O., Chang S.H., Nurieva R., Wang Y.H., Wang Y., Hood L., Zhu Z., Tian Q., Dong C. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunology* 6: 1133–1141.
- [26] Stockinger B., Veldhoen M. 2007. Differentiation and function of Th17 T cells. *Current Opinion in Immunology* 19: 281–286.
- [27] Tato C.M., Laurence A., O’Shea J.J. 2006. Helper T cell differentiation enters a new era: Le Roi est mort; vive le Roi! *The Journal of Experimental Medicine* 203: 809–812.
- [28] Gołąb J., Stokłosa T., Grzesiowski P., Hryniewicz W. 2007. Odporność przeciwzakazna. W: *Immunologia*. (Red. J. Gołąb, M. Jakóbiński, W. Lasek, T. Stokłosa). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- [29] Cervi L., MacDonald, A.S., Kane, C., Dzierzinski, F., Pearce, E.J. 2004. Cutting edge: dendritic cells co-pulsed with microbial and helminth antigens undergo modified maturation, segregate the antigens to distinct intracellular compartments, and concurrently induce microbe-specific Th1 and helminth-specific Th2 responses. *Journal of Immunology* 172: 2016–2020.
- [30] Balic A., Harcus Y., Holland M.J., Maizels R.M. 2004. Selective maturation of dendritic cells by *Nippostrongylus brasiliensis*-secreted proteins drives Th2 immune responses. *European Journal of Immunology* 34: 3047–3059.
- [31] Jenkins S.J., Mountford A.P. 2005. Dendritic cells activated with products released by schistosome larvae drive Th2-type immune responses, which can be inhibited by manipulation of CD40 costimulation. *Infection and Immunity* 73: 395–402.
- [32] van der Kleij D., Latz E., Brouwers J.F., Kruize Y.C., Schmitz M., Kurt-Jones E.A., Espevik T., de Jong E.C., Kapsenberg M.L., Golenbock D.T., Tielens A.G.M., Yazdanbakhsh M. 2002. A novel host-parasite lipid crosstalk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates Toll like receptor 2 and affects immune polarization. *Journal of Biological Chemistry* 277: 48122–48129.
- [33] Thomas P.G., Carter M.R., Atochina O., Da’Dara A.A., Piskorska D., McGuire E., Harn D.A. 2003. Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth glycan uses a Toll-like receptor 4-dependent mechanism. *Journal of Immunology* 171: 5837–5841.
- [34] Goodridge H.S., Marshall F.A., Else K.J., Houston K.M., Egan C., Al Riyami L., Liew F.Y., Harnett W., Harnett M.M. 2005. Immunomodulation via novel use of TLR4 by the filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product, ES-62. *Journal of Immunology* 174: 284–293.
- [35] Aksoy E., Zouain C.S., Vanhoutte F., Fontaine J., Pavelka N., Thieblemont N., Willems F., Ricciardi-Castagnoli P., Goldman M., Capron M., Ryffel B.,

- Trottein F. 2005. Double-stranded RNAs from the helminth parasite *Schistosoma* activate TLR3 in dendritic cells. *Journal of Biological Chemistry* 280: 277–283.
- [36] Ouaisi M.A., Auriault C., Santoro F., Capron A. 1981. Interaction between *Schistosoma mansoni* and the complement system: role of IgG Fc peptides in the activation of the classical pathway by schistosomula. *Journal of Immunology* 127: 1556–1559.
- [37] Auriault C., Ouaisi M.A., Torpier G., Eisen H., Capron A. 1981. Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor of *Schistosoma mansoni* schistosomula. *Parasite Immunology* 3: 33–44.
- [38] Maizels R.M., Bundy D.A., Selkirk M.E., Smith D.F., Anderson R.M. 1993. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature* 365: 797–805.
- [39] McManus D.P., Dalton J.P. 2006. Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Parasitology* 133: S43–S61.
- [40] Bethony J.M., Loukas A., Hotez P.J., Knox D.P. 2006. Vaccines against blood-feeding nematodes of humans and livestock. *Parasitology* 133: S63–S79.
- [41] Maizels R.M., Balic A., Gomez-Escobar N., Nair M., Taylor M.D., Allen J.E. 2004. Helminth parasites – masters of regulation. *Immunological Reviews* 201: 89–116.
- [42] Barnes E.H., Dobson R.J., Barger I.A. 1995. Worm control and anthelmintic resistance: adventures with a model. *Parasitology Today* 11: 56–63.
- [43] Geldhof P., Vercauteren I., Vercruysse J., Knox D.P., Van Den Broeck W., Claerebout E. 2004. Validation of the protective *Ostertagia ostertagi* ES-thiol antigens with different adjuvantia. *Parasite Immunology* 26: 37–43.
- [44] Smith W.D., Zarlenga D.S. 2006. Developments and hurdles in generating vaccines for controlling helminth parasites of grazing ruminants. *Veterinary Parasitology* 139: 347–359.
- [45] Berquist R.N., Leonardo L.R., Mitchell G.F. 2005. Vaccine-linked chemotherapy: can schistosomiasis control benefit from an integrated approach? *Trends in Parasitology* 21: 112–117.
- [46] Hawdon J.M., Hotez P.J. 1996. Hookworm: developmental biology of the infectious process. *Current Opinions on Genetic Development* 6: 618–623.
- [47] Bossaert K., Jacquinet E., Saunders J., Farnir F., Losson B. 2000. Cell-mediated immune response in calves to single-dose, trickle, and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 88: 17–34.
- [48] Bossaert K., Farnir F., Leclipteux T., Protz M., Lonneux J.F., Losson B. 2000. Humoral immune response in calves to single-dose, trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 87: 103–23.
- [49] Lightowers M.W. 2006. Cestode vaccines: origins, current status and future prospects. *Parasitology* 133: S27–S42.
- [50] Cox F.E.G. 1993. Milestones in Parasitology. *Parasitology Today* 9: 347–348.
- [51] Lightowers M.W., Rolfe R., Gauci C.G. 1996. *Taenia saginata*: vaccination against cysticercosis in cattle with recombinant oncosphere antigens. *Experimental Parasitology* 84: 330–338.
- [52] Gauci C.G., Flisser A., Lightowers M.W. 1998. A *Taenia solium* oncosphere protein homologous to host-protective *Taenia ovis* and *Taenia saginata* 18 kDa antigens. *International Journal for Parasitology* 28: 757–760.
- [53] Gauci C.G., Lightowers M.W. 2001. Alternative splicing and sequence diversity of transcripts from the oncosphere stage of *Taenia solium* with homology to the 45W antigen of *Taenia ovis*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 112: 173–181.
- [54] Flisser A., Gauci C.G., Zoli A., Martinez-Ocana J., Garza-Rodriguez A., Dominguez-Alpizar J.L., Maravilla P., Rodriguez-Canul R., Avila G., Aguilar-Vega L., Kyngdon C., Geerts S., Lightowers M.W. 2004. Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. *Infection and Immunity* 72: 5292–5297.
- [55] Gonzalez A.E., Gauci C.G., Barber D., Gilman R.H., Tsang V.C., Garcia H.H., Verastegui M., Lightowers M.W. 2005. Vaccination of pigs to control human neurocysticercosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72: 837–839.
- [56] Lightowers M.W., Lawrence S.B., Gauci C.G., Young J., Ralston M.J., Maas D., Heath D.D. 1996. Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Parasite Immunology* 18: 457–462.
- [57] Lightowers M.W., Jensen O., Fernandez E., Iriarte J.A., Woolard D.J., Gauci C.G., Jenkins D.J., Heath D.D. 1999. Vaccination trials in Australia and Argentina confirm the effectiveness of the EG95 hydatid vaccine in sheep. *International Journal for Parasitology* 29: 531–534.
- [58] Wu Z.D., Lu Z.Y., Yu X.B. 2005. Development of a vaccine against *Schistosoma japonicum* in China: a review. *Acta Tropica* 96: 106–116.
- [59] Boulanger D., Warter A., Sellin B., Lindner V., Pierce R.J., Chippaux J-P., Capron A. 1999. Vaccine potential of a recombinant glutathione S-transferase cloned from *Schistosoma haematobium* in primates experimentally infected with an homologous challenge. *Vaccine* 17: 319–326.
- [60] Boulanger D., Warter A., Trottein F., Mauny F., Bremond P., Audibert F., Couret D., Kadri S., Godin C., Sellin E., Pierce R.J., Lecocq J.P., Sellin B., Capron A. 1995. Vaccination of patas monkeys experimentally infected with *Schistosoma haematobium* using a recombinant GST cloned from *S. mansoni*.

- Parasite Immunology* 17: 361–369.
- [61] Grzych, J.M., De Bont J., Liu J., Neyrinck J.-L., Fontaine J., Vercruyse J., Capron A. 1998. Relationship of impairment of schistosome 28-kilodalton GST activity to expression of immunity to *Schistosoma matthei* in calves vaccinated with recombinant *Schistosoma bovis* 28-kilodalton GST. *Infection and Immunity* 66: 1142–1148.
- [62] Capron A., Capron M., Riveau G. 2002. Vaccine development against schistosomiasis from concepts to clinical trials. *British Medical Bulletin* 62: 139–148.
- [63] Dalton J.P., Spithill T. 1998. Approaches towards the development of a vaccine against liver fluke disease. *Parasitology Today* 14: 224–228.
- [64] Spithill T.W., Smooker P.M., Sexton J.L., Bozas E., Morrison C.A., Creaney J., Parsons J.C. 1999. Development of vaccines against *Fasciola hepatica*. In: *Fasciolosis* (Ed. J.P. Dalton). CAB International, London: 377–410.
- [65] Zhu Y., Ren J., Da'dara A., Harn D., Xu M., Si J., Yu C., Liang Y., Ye P., Yin X., He W., Xu Y., Cao G., Hua W. 2004. The protective effect of a *Schistosoma japonicum* Chinese strain 23 kDa plasmid DNA vaccine in pigs is enhanced with IL-12. *Vaccine* 23: 78–83.
- [66] Liu J.M., Cai X.Z., Lin J.J., Fu Z.Q., Yang G.Z., Shi F.H., Cai Y.M., Shen W., Taylor M.G., Wu X.F. 2004. Gene cloning, expression and vaccine testing of *Schistosoma japonicum* SjFABP. *Parasite Immunology* 26: 351–358.
- [67] Muro A., Ramajo V., Lopez J., Simon F., Hillyer G.V. 1997. *Fasciola hepatica*: vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid binding proteins. *Veterinary Parasitology* 69: 219–229.
- [68] Casanueva P., Hillyer G.V., Ramajo V., Oleaga A., Espinoza E.Y., Munro A. 2001. Immunoprophylaxis against *Fasciola hepatica* in rabbits using a recombinant Fh15 fatty acid-binding protein. *Journal of Parasitology* 87: 697–700.
- [69] Ramajo V., Oleaga A., Casanueva P., Hillyer G.V., Muro A. 2001. Vaccination of sheep against *Fasciola hepatica* with homologous fatty acid binding proteins. *Veterinary Parasitology* 97: 35–46.
- [70] Martinez-Fernandez A.R., Nogal-Ruiz J.J., Lopez-Aban J., Ramajo V., Oleaga A., Manga-Gonzalez Y., Hillyer G.V., Muro A. 2004. Vaccination of mice and sheep with Fh12FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD. *Veterinary Parasitology* 126: 287–298.
- [71] Almeida M.S., Torloni H., Lee-Ho P., Vilar M.M., Taumayturgo N., Simpson A.J., Tendler M. 2003. Vaccination against *Fasciola hepatica* using a *Schistosoma mansoni* defined recombinant antigen, Sm14. *Parasite Immunology* 25: 135–137.
- [72] Fan J., Gan X., Yang W., Shen L., McManus D.P., Brindley P.J. 2003. A *Schistosoma japonicum* very low-density lipoprotein-binding protein. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 35: 1436–1451.
- [73] Gan X.X., Zeng X.P., Wang Y., Ding J.Z., Shen L.Y., McManus D.P., Brindley P.J., Fan J.J. 2006. Recombinant tegumental protein *Schistosoma japonicum* very low density lipoprotein binding protein as a vaccine candidate against *Schistosoma japonicum*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 101: 9–13.
- [74] Dalton J.P., O'Neill S.M., Stack C., Collins P., Walsh A., Sekiya M., Doyle S., Mulcahy G., Hoyle D., Khaznadji E., Moire N., Brennan G., Mousley A., Kreshchenko N., Maule A., Donnelly S. 2003. *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *International Journal for Parasitology* 33: 1173–1181.
- [75] Dalton J.P., Mulcahy G. 2001. Parasite vaccines – a reality? *Veterinary Parasitology* 98: 149–167.
- [76] Piacenza L., Acosta D., Basmadjian I., Dalton J.P., Carmona C. 1999. Vaccination of sheep with cathepsin L proteases and with leucine aminopeptidase induces high levels of protection against fasciolosis. *Infection and Immunity* 67: 1954–1961.
- [77] Dalton J.P., McGonigle S., Rolph T., Andrus S. 1996. Induction of protective immunity in cattle against infection with *Fasciola hepatica* by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin. *Infection and Immunity* 64: 5066–5074.
- [78] Acosta D., Goni F., Carmona C. 1998. Characterization and partial purification of a leucine aminopeptidase from *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology* 84: 1–7.
- [79] Carmona C. 2005. *Fasciola hepatica* recombinant leucyl aminopeptidase functionally expressed in *Escherichia coli* induced high levels of protection in rabbits. In: *Materials of 20th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*. Christchurch, New Zealand.
- [80] DeSilva N., Brooker S., Hotez P., Montresor A., Engels D., Savioli L. 2003. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends in Parasitology* 12: 547–551.
- [81] World Health Organization 2002. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiases. WHO Technical Report Series no 912, Geneva.
- [82] Bethony J.M., Loukas A., Smout M.J., Mendez S., Wang Y., Bottazzi M.E., Zhan B., Williamson A.L., Lustigman S., Correa-Oliveira R., Xiao S.H., Hotez P.J. 2005. Antibodies against a secreted protein from hookworm larvae reduce the intensity of infection in humans and vaccinated laboratory animals. *FASEB Journal* 19: 1743–1755.
- [83] Goud G.N., Bottazzi M.E., Zhan B., Mendez S., Deumic V., Plieskatt J., Liu S., Wang Y., Bueno L., Fujiwara R., Samuel A., Ahn S.Y., Solanki M., Aso-

- jo O.A., Wang J., Bethony J.M., Loukas A., Roy M., Hotez P.J. 2005. Expression of the *Necator americanus* hookworm larval antigens Na-ASP-2 in *Pichia pastoris* and purification of the recombinant protein for use in human clinical trials. *Vaccine* 23: 4754–4764.
- [84] Mendez S., Zhan B., Goud G., Ghosh K., Dobardzic A., Wu W.H., Liu S., Deumic V., Dobardzic R., Liu Y.Y., Bethony J., Hotez P.J. 2005. Effect of combining the larval antigens *Ancylostoma* secreted protein 2 (ASP-2) and metalloprotease 1 (MTP-1) in protecting hamsters against hookworm infection and disease caused by *Ancylostoma ceylanicum*. *Vaccine* 23: 3123–3130.
- [85] Schalling H.D., van Leeuwen M.A. 1997. Protective immunity to the blood-feeding nematode *Haemonchus contortus* induced by vaccination with parasite low molecular weight antigens. *Parasitology* 114: 293–299.
- [86] Jacobs H.J., Wiltshire C., Ashman K., Meeusen E.N. 1999. Vaccination against the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*, using a purified larval surface antigen. *Vaccine* 17: 362–368.
- [87] Knox D.P., Redmond D.L., Newlands G.F., Skuce P.J., Pettit D., Smith W.D. 2003. The nature and prospects for gut membrane proteins as vaccine candidates for *Haemonchus contortus* and other ruminant trichostrongyloids. *International Journal for Parasitology* 33: 1129–1137.
- [88] Newton S.E., Munn E.A. 1999. The development of vaccines against gastrointestinal nematode parasites, particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitology Today* 15: 116–122.
- [89] Munn E.A., Smith T.S., Smith H., James F.M., Smith F.C., Andrews S.J. 1997. Vaccination against *Haemonchus contortus* with denatured forms of the protective antigen H11. *Parasite Immunology* 19: 243–248.
- [90] Loukas A., Bethony J.M., Mendez S., Fujiwara R.T., Goud G.N., Ranjit N., Zhan B., Jones K., Bottazzi M.E., Hotez P.J. 2005. Vaccination with recombinant aspartic hemoglobinase reduces parasite load and blood loss after hookworm infection in dogs. *PLoS Medicine* 2 e295: 1008–1017.
- [91] Pearce E.J. 2003. Progress towards a vaccine for schistosomiasis. *Acta Tropica* 86: 309–313.

Wpłynęło 21 listopada 2008

Zaakceptowano 2 lutego 2009