

## Szczepionki przeciw toksoplazmozie — aktualny stan badań

### The vaccines against toxoplasmosis — current status of the studies

Henryka Długońska<sup>1</sup>, Justyna Gatkowska<sup>1</sup>, Józef Kur<sup>2</sup> i Artur Gašior<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Immunoparazytologii, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

<sup>2</sup>Katedra Mikrobiologii, Politechnika Gdańska, ul. Narutowicza 11/12, 80-952 Gdańsk

Adres do korespondencji: Henryka Długońska, Zakład Immunoparazytologii, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; E-mail:hdlugo@biol.uni.lodz.pl

**ABSTRACT.** The article presents current studies on the development of effective vaccines against toxoplasmosis — new approaches and strategies to construct prophylactic and therapeutic vaccines using recombinant microorganisms expressing protective *T. gondii* antigens, parasite DNA or RNA and recombinant antigens.

**Key words:** *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis, vaccines.

Współczesne metody uodparniania przeciw chorobom pasożytniczym są częściowo oparte na podstawach racjonalnych, a częściowo wynikają z doświadczenia. Przegląd dokonań współczesnej wakcynologii wskazuje, że zarówno w medycynie ludzkiej, jak i weterynaryjnej skuteczne programy zostały opracowane metodą prób i błędów.

Kaufmann [1], a za nim Brake [2] wskazują na teoretyczne przesłanki skonstruowania dobrej szczepionki. Po pierwsze, antygen musi dotrzeć do właściwego przedziału komórki, aby mógł być prezentowany w kontekście cząsteczek MHC klasy I lub II (major histocompatibility complex: główny układ zgodności tkankowej). Po drugie, wprowadzenie antygeny powinno indukować wytworzenie odpowiedniego naturalnego środowiska cytokinowego i chemokinowego, które zainicjuje rozwój odporności swoistej. Po trzecie, antygen powinien wzbudzić silną ekspresję cząsteczek kostymulacyjnych na komórkach prezentujących antygen i limfocytach T. Spełnienie tych trzech warunków, po wprowadzeniu preparatu szczepionkowego do organizmu wrażliwego żywiciela, okazuje się wyjątkowo trudne, czego świadectwem jest niezbyt długa lista skutecznych szczepionek, co w szczególności dotyczy szczepionek przeciw pasożytniczym. Licz-

ne przyczyny trudności i niepowodzeń w opracowywaniu szczepionek przeciw pasożytom wypunktowano i skomentowano we wcześniejszej literaturze przedmiotu [3, 4].

Pierwotniak *Toxoplasma gondii* jest kosmopolitycznym pasożytem, który z dużą częstotliwością zaraża liczne gatunki zwierząt endotermicznych i człowieka. Naturalna transmisja toksoplazmy zachodzi głównie na drodze pokarmowej, przez cysty tkankowe zawierające bradyzoity lub wysporulowane oocysty ze sporozoitami, wydalone przez koty — ostatecznych żywicieli tego pasożyta. Pod wpływem wytworzonej odporności pierwotna ostra toksoplazmoza, cechująca się rozsianiem w organizmie tachyzoitów, ulega wygaszeniu. Agresywne i szybko namnażające się tachyzoity przekształcają się w bradyzoity, a te zamykają się w cystach, umiejscowionych głównie w mięśniach, mózgu i gałkach ocznych — rozpoczyna się faza toksoplazmozy przewlekłej. Zараżenie tym pierwotniakiem stanowi szczególne zagrożenie dla osobników z obniżoną odpornością (płody, chorzy na AIDS, biorcy przeszczepów itp.) [5]. Biorąc to pod uwagę należy stwierdzić, że potrzebne są zarówno szczepionki profilaktyczne do masowego stosowania w celu ochrony przed rozwojem pierwotnej inwazji, jak

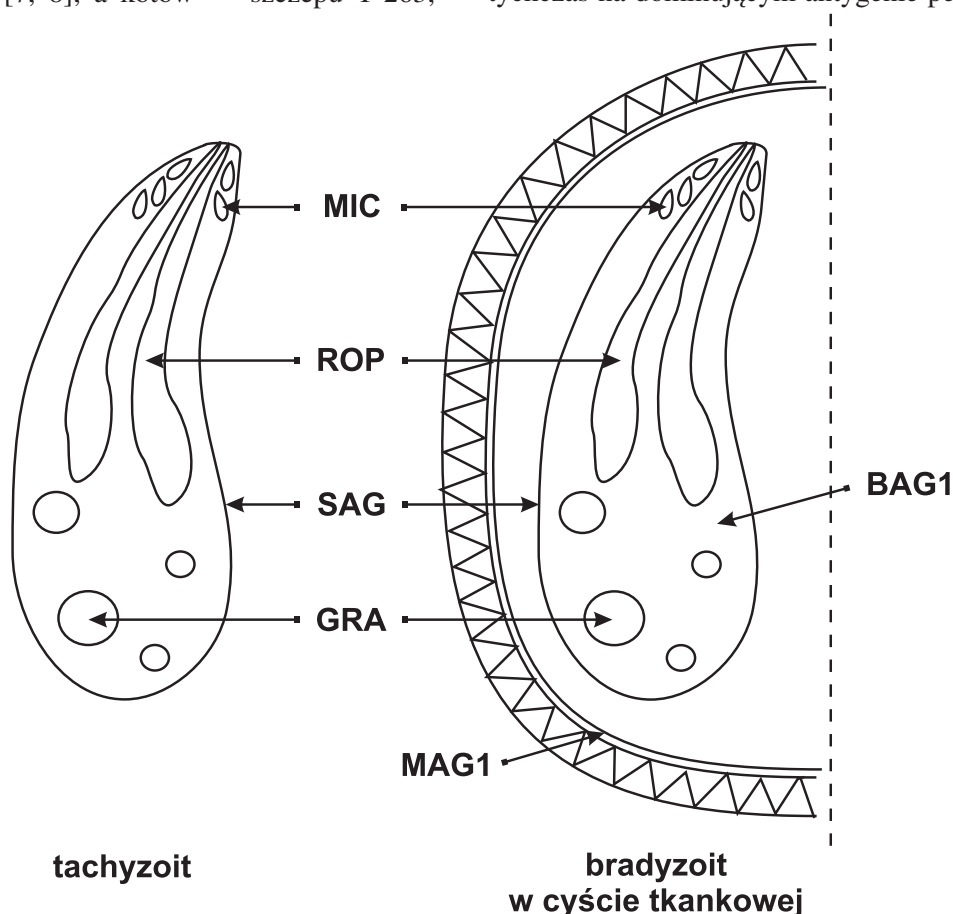
i terapeutyczne, które powodują eradykację pasożyta z organizmu zarażonych żywicieli, wykluczając możliwość reaktywacji przewlekłego zarażenia w przypadku długotrwałego lub przejściowego załamania odporności.

### Szczepionki konwencjonalne

Jedyna zaakceptowana i wprowadzona do użycia w Europie i Nowej Zelandii szczepionka przeciw toksoplazmozie przeznaczona jest dla owiec. Szczepionka ta (Toxovax, Ovilis Toxovac) zawiera żywe tachyzoity atenuowanego szczepu S48, który nie ma zdolności tworzenia cyst tkankowych i w populacjach szczepionych zwierząt powoduje obniżenie częstości poronień wywołanych wewnątrzmacicznym zarażeniem płodu [6]. Prowadzone są również badania nad wykorzystaniem innych szczepów pasożyta w uodparnianiu zwierząt, w przypadku świń szczepu TS-4 [7, 8], a kotów — szczepu T-263,

który może indukować odporność, ale nie jest zdolny do wytwarzania męskich gamet, a tym samym nie jest zdolny do zakończenia swojego cyklu płciowego i rozprzestrzeniania [9]. Jednakże z powodu możliwości rewersji pasożyta do postaci zjadliwej, żadna atenuowana szczepionka nie może być rozważana jako potencjalna szczepionka dla ludzi. Z kolei, zabite tachyzoity *T. gondii* lub ich lizaty, użyte jako materiał szczepionkowy, okazały się mało skuteczne. Brak ochronnego działania wiąże się najprawdopodobniej z niedostateczną stymulacją wytwarzania IFN- $\gamma$ , kluczowej cytokiny odpowiedzialnej za eliminację *T. gondii* z organizmu [10].

Istotnym elementem prac nad opracowywaniem nowych szczepionek przeciw toksoplazmozie jest wyjaśnienie udziału poszczególnych komponentów pasożyta w patogenezie zarażenia toksoplazmą oraz w indukcji odporności ochronnej w organizmie żywiciela. Szczególne zainteresowanie skupiono dotychczas na dominującym antygenie pelikuli paso-



Rys. 1. Antygeny ochronne *T. gondii* używane do przygotowania szczepionek przeciw toksoplazmozie; MIC — antygeny mikronem, ROP — antygeny roptrii, GRA — antygeny granul o dużej gęstości, SAG — antygeny powierzchniowe, MAG1 — antygen macierzy cyst 1, BAG1 — antygen bradyzoitów 1

Fig. 1. The protective *T. gondii* antigens used in development of the vaccines against toxoplasmosis; MIC — microneme antigens, ROP — rhoptry antigens, GRA — granule antigens, SAG — surface antigens, MAG1 — matrix antigen 1, BAG1 — bradyzoite antigen 1

żyta SAG1 (surface antigen 1), oraz na antygenach organelli wydzielniczych, zaangażowanych w penetrację (antygeny mikronem, MIC), biogenezę (antygeny roptrii, ROP) i funkcje wakuoli pasożytniczej (antygeny granul o dużej gęstości, GRA) jako mikrośrodowiska wewnątrzkomórkowej replikacji toksoplazmy. Rzadziej badane są właściwości innych antygenów np. BAG1 (bradyzoite antigen 1) — markera antygenowego postaci bradyzoitu czy MAG1 (matrix antigen 1) — antygenu macierzonego cyst [11] (Rys. 1). Głównym modelem doświadczalnym, na którym sprawdza się efektywność nowo opracowanych szczepionek, pozostają nadal myszy laboratoryjne, ze względu na liczne szczepy wsojne o zróżnicowanej naturalnej odporności na toksoplazmozę, dostępność i stosunkowo niskie koszty. W artykule przedstawiono najnowsze dane dotyczące badań nad konstrukcją szczepionek nowej generacji przeciw toksoplazmozie.

## Szczepionki nowej generacji

### Szczepionki żywe rekombinowane

Droga pokarmowa wielu infekcji naturalnych stała się podstawą prób wykorzystania niepatogennych bakterii jelitowych jako potencjalnych nośników materiału szczepionkowego. Takie rekombinowane drobnoustroje z genami antygenów pasożyta, podane drogą pokarmową wywołują, obok odpowiedzi ogólnej, silną odporność miejscową [12], która może okazać się bardzo skuteczną ochroną m.in. w przypadku toksoplazmozy, nabywanej z reguły na drodze pokarmowej. Cong i wsp. [13] zastosowali w badaniach na mysim modelu doświadczalnym szczep *S. typhimurium* do wprowadzenia eukariotycznego plazmidu z wbudowanymi genami kodującymi dwa powierzchniowe antygeny pasożyta nadrodziny antygenów SAG: SAG1 i SAG2 oraz podjednostki A2/B toksyny przecinkowców cholery jako adiuwant. Ta doustna szczepionka wykazała sporą skuteczność: 40% myszy szczepionych 3-krotnie przeżyło zarażenie wysoce zjadliwym szczepem toksoplazmy (RH), a wytworzona odporność wykazała typowy ochronny profil — z przewagą swoistych przeciwciał izotypu IgG2 nad IgG1, silną aktywnością proliferacyjną i cytotoksyczną limfocytów oraz wzmożonym wytwarzaniem przez nie kluczowej ochronnej cytokiny — IFN- $\gamma$

Technika rekombinacji DNA pozwoliła na ekspresję antygenów pasożytów w mikobakteriach. Supply i wsp. [14] wprowadzili do *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guérin) plazmid z wbudowa-

nym genem kodującym antygen GRA1, który jest antygenem grupy ESA (excreted/secreted antigen) najczęściej rozpoznawanym przez przeciwciała obecne w surowicach ludzi z toksoplazmozą [15]. Rekombinowane prątki BCG-GRA1 jako szczepionka okazały się stosunkowo słabym induktorem odporności ochronnej zarówno u myszy, jak i owiec [14].

Interesujące podejście przedstawiają Caetano i wsp. [16]. Wykorzystali oni rekombinowane adenowirusy, niezdolne do replikacji, niosące geny zmodyfikowanych antygenów powierzchniowych: SAG1, SAG2 i SAG3. Nie zaobserwowano co prawda ochrony przed silnie zjadliwym szczepem RH, ale stwierdzono bardzo silne zahamowanie wytwarzania cyst tkankowych po zarażeniu cystotwórczym szczepem *T. gondii* P-Br.

### Kwasy nukleinowe jako szczepionki

Ten rodzaj szczepionek cieszy się ostatnio szczególnie dużym zainteresowaniem i budzi ogromne nadzieje, chociaż trudno określić te szczepionki jako idealne [17, 18]. W pierwszej fazie prac nad skonstruowaniem efektywnej szczepionki przeciw toksoplazmozie skupiono się na genach tych antygenów pasożyta, które ulegają ekspresji (wyłącznie lub głównie) w tachyzoitach, formach rozwojowych odpowiedzialnych za parazytemię w ostrej toksoplazmozie, a więc: antygenie SAG1 [19] oraz antygenach organelli wydzielniczych: granul o dużej gęstości, roptrii i mikronem. Natura szczepionek genetycznych umożliwia dowolne komponowanie składu, czyli tworzenie preparatów koktajlowych (szczepionki wielogenowe) o większej skuteczności. Na przykład, mieszanka plazmidów z wbudowanym genem SAG1 i sekwencją ROP2 (196-561 aa) okazała się ochronna u myszy zarażonych letalną dawką *T. gondii* RH, podczas gdy każdy z tych genów z osobna takiej aktywności nie wykazał [20]. Beghetto i wsp. [21] zastosowali mieszankę DNA kodującego fragmenty antygenów mikronem, organelli odpowiedzialnych za penetrację toksoplazmy do komórek żywiciela. Wybór odpowiednich fragmentów oparty był na analizie repertuaru swoistości przeciwciał i limfocytów krwi obwodowej dzieci z wrodzoną toksoplazmozą i kobiet z nabytą toksoplazmozą. Immunizacja myszy spowodowała wytworzenie silnej ochronnej odporności, wskutek czego, po zarażeniu toksoplazmą, liczba cyst w mózgu u myszy szczepionych była aż o 84% niższa niż u myszy nieszczepionych (kontrolnych).

W plazmidy można też wbudować geny wspierające rozwój odporności poszczepiennej, np. gen kodujący czynnik wzrostu stymulujący rozwój kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor). Mévélec i wsp. [22] wykazali na modelu mysim, że gen GM-CSF skojarzony z genem SAG1 i GRA4 zwiększa przeżywalność wrażliwego na toksoplazmozę szczepu wsobnych myszy C57Bl/6 z 75 do 87%. Ci sami autorzy zaobserwowali także obniżenie intensywności wytwarzania cyst tkankowych oraz zwiększenie przeżywalności potomstwa myszy outbred (Swiss OF1) zarażonych podczas ciąży, chociaż szczepionka nie chroniła przed transmisją pasożyta z organizmu matki na płód drogą łożyskową. Nie bez znaczenia wydaje się także adiuwantowe działanie niemetylowanych par zasad CpG, ale w tej kwestii brakuje jednoznacznych wyników [23, 24]. Ostatnio zwrócono uwagę na dwa antygeny charakterystyczne dla fazy przewlekłej: BAG1 — marker bradyzoitów i MAG1 — antygen macierzo- wy cyst. Jak wykazała analiza swoistości odpowiedzi immunologicznej zarażonych toksoplazmą ludzi, oba wykazują silne właściwości immunogenne, wzbudzając reakcję limfocytów T i B, zarówno w fazie ostrej, jak i przewlekłej infekcji [25]. Nielsen i wsp. [26] immunizowali domięśniowo myszy plazmidami z wklonowanymi genami BAG1 lub MAG1. Profil wytworzonej humoralnej odpowiedzi immunologicznej (IgG2a > IgG1), jak i obniżony o 62% poziom cyst tkankowych w mózgu, potwierdziły, że oba geny SAG1 i MAG1 są poważnymi kandydatami do wykorzystania w swoistej immunoprofilaktyce toksoplazmozy.

Próby wykorzystania kwasów nukleinowych w wakcynologii dotyczą zwykle DNA, ale ostatnie dane wskazują też na RNA jako materiał szczepionkowy. Chociaż preparatyka RNA jest trudna i jest on mniej stabilny niż plazmidowy DNA, to istotnym walorem RNA jest brak możliwości jego integracji z chromosomami komórek żywicieli poddawanym szczepieniom. Biorąc pod uwagę znaczenie w toksoplazmozie odporności miejscowej na błonach śluzowych przewodu pokarmowego, sprawdzono skuteczność szczepionki zawierającej RNA pasożyta po jej wprowadzeniu do nosa (dwukrotnie w odstępnie dwutygodniowym) myszom szczepu C57Bl/6, wysoce wrażliwym na toksoplazmozę. Szczepionka chroniła przed śmiercią 50% myszy zarażonych letalną dawką cyst tkankowych *T. gondii* 76K oraz obniżała poziom wytwarzanych w mózgu cyst po podaniu dawki subletalnej [27].

Bardzo obiecującym podejściem w wakcynologii jest procedura „heterologous prime-boost immunization”, w której stosuje się różne wektory podczas szczepienia podstawowego i przypominającego, np. najpierw rekombinowany plazmid, a potem rekombinowany wirus, co prowadzi do rozwoju silnej odporności komórkowej [28].

### Szczepionki podjednostkowe naturalne

W szczepieniu zwierząt możliwe jest wykorzystanie białek izolowanych bezpośrednio z komórek *T. gondii*. Jednym z takich przykładów jest szczepionka oparta na surowej frakcji białek roptrii wyizolowanych ze szczepu LIV-5 pasożyta połączonych z adiuwantem ISCOM [29]. Jednakże szczepionki oparte na tego rodzaju pojedynczych białkach zazwyczaj dają tylko częściową ochronę przed infekcją. Dlatego prace w tym zakresie dotyczą prób określenia właściwości ochronnych wybranych antygenów naturalnych, użytych nie w postaci oczyszczonych pojedynczych antygenów, ale jako mieszanki antygenów. Stanley i wsp. [30] uodparniali owce wprowadzając im donosowo surowy poliwalentny antygen (lizat tachyzoitów), zamknięty w mikrokapsułkach z PLG (DL-lactide-co-glycolide). Śledząc krzywą temperatury oraz parametry serologiczne i komórkowe po zarażeniu zwierząt stwierdzili, że zastosowana droga immunizacji jest obiecującą alternatywą w immunoprofilaktyce toksoplazmozy u owiec. Z poliwalentnego lizatu *T. gondii* BK Lourenco i wsp. [31] wyizolowali chromatograficznie dwa antygeny mikronem: MIC1 oraz MIC4 i użyli je do immunizacji myszy, z wykorzystaniem adiuwantów Freund. Po zarażeniu drogą pokarmową 40 cystami szczepu *T. gondii* ME49 zaobserwowali spadek liczby wytwarzanych cyst ME49 o 68%, a po podaniu dawki letalnej pasożytów — ochronę przed śmiercią u 80% osobników. Odbiciem i wskaźnikiem ochronnego działania był brak zmian nekrotycznych w jelicie cienkim, słabsze roz-sianie pasożytów oraz profil cytokinowy Th1.

### Szczepionki podjednostkowe rekombinowane (biosyntetyczne)

Doświadczenia z użyciem antygenów rekombinowanych jako materiału szczepionkowego są dość liczne, ale wyniki niejednoznaczne. Ostatnio Liu i wsp. [32] potwierdzili silne właściwości ochronne antygeny SAG1. Dwukrotne podanie myszom tego antygeny z adiuwantami Freund indukowało silną

odpowieć ochronną u myszy, wyrażającą się znaczącym przedłużeniem czasu ich przeżycia po zarażeniu  $1 \times 10^5$  tachyzoitów RH; wszystkie myszy nieudopornione padły po 7 dniach, a uodpornione — po 15 dniach. Profil cytokinowy potwierdził silną reakcję limfocytów typu Th1. Mimo że odporność humoralna w toksoplazmozie ma drugorzędne znaczenie, to wytworzone przeciwciała mogą wspierać odporność komórkową w eradykacji pasożyta. Jak wykazali autorzy, przeciwciała anty-SAG1 powodują bezpośrednio destrukcję tachyzoitów: ich aglutynację i pęcznienie oraz powstawanie jam i dziur w pellikuli.

### Szczepionki podjednostkowe syntetyczne

Siachoque i wsp. [33] podjęli ostatnio próbę opracowania szczepionki opartej na syntetycznych peptydach i przetestowali właściwości ochronne 17 peptydów, obejmujących region od 1. do 336. aminokwasu antygeny SAG1 (16 peptydów o długości 20 aminokwasów, a ostatni od końca C-terminalnego — 16-aminokwasowy). Myszy immunizowane peptydami obejmującymi region pomiędzy 221. a 336. aminokwasem i zarażone letalnie wysoce zjadliwym szczepem RH przeżyły dłużej niż myszy kontrolne, a szczególne działanie ochronne wykazały dwa peptydy 281.–300. i 301.–320. ( $p < 0,00006$ ). Nie zaobserwowano korelacji między poziomem wytworzonych swoistych przeciwciał a czasem przeżycia myszy, co potwierdza liczne wcześniejsze obserwacje, że odporność ochronna w infekcjach wewnątrzkomórkowymi patogenami ma charakter komórkowy. Obecność i miano swoistych przeciwciał mogą służyć jedynie jako dowód kontaktu z drobnoustrojem, ale nie mają znaczenia prognostycznego.

Zupełnie nowym podejściem do szczepionek jest wykorzystanie komórek dendrytycznych oraz egzosomów (pęcherzyków uwalnianych z komórek podczas egzocytozy). Tego rodzaju szczepionka powstaje w wyniku pobrania z organizmu komórek dendrytycznych, które następnie są aktywowane poprzez ich inkubację *in vitro* z antygenami pasożyta i tak zaktywowane komórki lub wydzielane przez nie egzosomy są wprowadzane ponownie do szczepionego organizmu. Wysoką skuteczność tego rodzaju szczepionek potwierdzono na modelach mysich, a przeprowadzone wstępne badania potwierdzają, że taka szczepionka może być wykorzystana w immunoprofilaktyce nie tylko zarażeń pasożytniczych ale także może to być szczepionka przeciwnowotworowa [34–36].

### Problemy

Znacznym problemem powszechnego użycia szczepionek jest zróżnicowana nie tylko międzygatunkowo, ale wewnątrzgatunkowo odpowiedź immunologiczna genotypowo zróżnicowanych osobników danej populacji. Zwracają na to uwagę Letscher-Bru i wsp. [37], którzy wykazali, że immunizacja antygenem SAG1 obniżała częstość transmisji przezłożyskowej toksoplazmy u myszy BALB/c (haplotyp H-2<sup>d</sup>), ale zwiększała u myszy CBA/J (haplotyp H-2<sup>k</sup>). Różne podłoże genetyczne żywicieli kształtowało różny profil odpowiedzi immunologicznej — u myszy BALB/c obserwowano profil mieszany typu Th1 + Th2, a u myszy CBA/2 dominował „nieochronny” typ Th2. Prócz podłoża genetycznego, istotny wpływ na profil i natężenie indukowanej przez szczepionki odporności mogą wywierać także czynniki zewnątrzpochodne, np. aktualnie przyjmowane leki. Nieoczekiwanie okazało się np., że salbutamol (ligand receptorów  $\beta_2$  na komórkach mięśni gładkich), używany w leczeniu astmy oskrzelowej i choroby obturacyjnej płuc, wykazuje działanie adiuwantowe w stosunku do antygeny SAG1 *T. gondii* [38].

Infekcje bezwzględnych wewnątrzkomórkowych patogenów, takich jak *T. gondii*, są wyjątkowo trudne do zwalczenia dla organizmu zarażonego żywiciela. Szczególna rola ochronna przypada swoistym cytotoksycznym limfocytom CD8+ zdolnym do zabicia komórek żywicielskich zarażonych patogenami oraz wytwarzającym ochronne cytokiny mobilizujące aktywność bójczą makrofagów. Jak więc indukować aktywność swoistych cytotoksycznych limfocytów CD8+?

Szczegółowych badań wymaga wybór skutecznej drogi wprowadzenia materiału szczepionkowego. Na modelu mysim wykazano ostatnio, że kilkakrotne wprowadzenie drogą pokarmową mieszaniny antygenów wydalniczo-wydzielniczych, samych lub skojarzonych z toksyną przecinkowców cholery jako adiuwantem, wzbudza silną swoistą odpowiedź humoralną [39]. Cytowane badania nie przynoszą informacji, czy wytworzona odporność ma charakter ochronny, ale gdyby tak było, byłaby to interesująca alternatywa. O ważności drogi wprowadzenia materiału szczepionkowego i jego formy świadczą wyniki badań Mohameda i wsp. [40]. Wytworzenie najsilniejszej odporności ochronnej obserwowali po iniekcji genu dla HSP70 (heat shock protein 70) techniką „gene gun vaccination”, mniej efektywna okazała się droga domięśniowa (mięśnie czworo-

głowe uda) i dootrzewnowa.

Warto też zwrócić uwagę, że zarówno same infekcje, jak i szczepionki mogą indukować procesy autoimmunizacyjne (głównie na zasadzie molekularnej mimikry) i powodować wakcynozy [41], a zatem ich działanie na organizm żywiciela powinno być wielostronnie zbadane przed wprowadzeniem do praktyki.

Zaprezentowany w artykule przegląd literatury wskazuje, że prace nad opracowaniem skutecznej szczepionki przeciw toksoplazmozie zostały w ostatnich latach zintensyfikowane, co pozwala żywić nadzieję, że podejmowane liczne próby konstrukcji dobrego preparatu szczepionkowego zakończą się pomyślnie.

## Literatura

- [1] Kaufmann S.H., Fensterle J., Hess J. 1999. The need for a novel generation of vaccines. *Immunobiology* 201: 272–282.
- [2] Brake D.A. 2002. Vaccinology for control of apicomplexan parasites: a simplified language of immune programming and its use in vaccine design. *International Journal for Parasitology* 32: 509–515.
- [3] Wędrychowicz H. 2000. Nowe rodzaje szczepionek przeciw pasożytniczych. *Wiadomości Parazytologiczne* 46: 21–27.
- [4] Vercruyse J., Knox D.P., Schettters T.P.M., Willadsen P. 2004. Veterinary parasitic vaccines: pitfalls and future directions. *Trends in Parasitology* 20: 488–492.
- [5] Petersen E., Dubey J.P. 2001. Biology of toxoplasmosis. In: *Toxoplasmosis. A comprehensive clinical guide* (Eds. D.H.M. Joynson, T.G. Wreghitt), Cambridge University Press, Cambridge: 1–42.
- [6] Buxton D. 1993. Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. *Parasitology Today* 9: 335–337.
- [7] Lindsay D.S., Blagburn B.L., Dubey J.P. 1993 r. Safety and results of challenge of weaned pigs given a temperature sensitive mutant of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology* 79: 71–76.
- [8] Dubey J.P., Baker D.G., Davis S.W., Urban J.F., Shen S.K. 1994. Persistence of immunity to toxoplasmosis in pigs vaccinated with a non-persistent strain of *Toxoplasma gondii*. *American Journal of Veterinary Research* 55: 982–987.
- [9] Cornelissen A.W.C.A., Shettters Th.P.M. 1996. Vaccines against protozoal diseases of veterinary importance. *FEMS Immunology Medical Microbiology* 15: 61–72.
- [10] Konopka E., Dzbeński T.H. 2001. Wytwarzanie interferonu- $\gamma$  i interleukiny-10 przez komórki śledzionowe myszy zarażonych *Toxoplasma gondii* lub immunizowanych antygenem zabitych pasożytów. *Wiadomości Parazytologiczne* 47 (supl.1): 71–75.
- [11] Długońska H., Dytnerska K. 1999. Antygeny *Toxoplasma gondii*. *Wiadomości Parazytologiczne* 45: 473–480.
- [12] Darji A., Lage Z.S., Garbe A.I., Chakraborty T., Weiss S. 2000. Oral delivery of DNA vaccines using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 27: 341–349.
- [13] Cong H., Gu Q.M., Jiang Y., He S.Y., Zhou H.Y., Yang T.T., Li Y., Zhag Q.L. 2005. Oral immunization with live recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* protects mice against *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunology* 27: 29–35.
- [14] Supply P., Sutton P., Coughlan S.N., Bilo K., Saman E., Trees A.J., Cesbron-Delauw M.-F., Loch C. 1999. Immunogenicity 6 of recombinant BCG producing GRA1 antigen from *Toxoplasma gondii*. *Vaccine* 17: 70–714.
- [15] Pietkiewicz H., Hiszczyńska-Sawicka E., Kur J., Petersen E., Nielsen H.V., Stankiewicz M., Andrzejewska I., Myjak P. 2004. Usefulness of *Toxoplasma gondii*-specific recombinant antigens in serodiagnosis of human toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 1779–1781.
- [16] Caetano B.C., Bruna-Romero O., Fux B., Mendes E.A., Penido M.L., Gazinelli R.T. 2006. Vaccination with replication-deficient recombinant adenoviruses encoding the main surface antigens of *Toxoplasma gondii* induces immune response and protection against infection in mice. *Human Gene Therapy* 17: 415–426.
- [17] Kofta W., Wędrychowicz H. 2001. c-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages. *Veterinary Parasitology* 100: 3–12.
- [18] Ivory C., Chadee K. 2004. DNA vaccines: designing strategies against parasitic infections. *Genetic Vaccines and Therapy* 2: 17.
- [19] Nielsen H.V., Lauemoller S.L., Christiansen L., Bus S., Foomsgard 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.
- [20] Fachado A., Rodriguez A., Angel S.O., Pinto D.C., Vila I., Acosta A., Amendoeira R.R., Lannes-Vieira J. 2003. Protective effect of naked DNA vaccine cocktail against lethal toxoplasmosis in mice. *Vaccine* 21: 1327–1335.
- [21] Beghetto E., Nielsen H.V., Del Porto P., Buffolano W., Guglietta S., Felici F., Petersen E., Gargano N. 2005. A combination of antigenic regions of *Toxoplasma gondii* microneme proteins induces protective immunity against oral infection with parasite cysts. *The Journal of Infectious Diseases* 191: 637–645.
- [22] Méveléc 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 GRA1 and SAG1 associated

- with GM-CSF plasmid, against acute, chronic and congenital toxoplasmosis in mice. *Vaccine* 23: 4489–4499.
- [23] Spencer J.A., Smith B.H., Guarino A.J., Blagburn B.L., Baker H.J. 2004. The use of CpG as an adjuvant to *Toxoplasma gondii* vaccine. *Parasitology Research* 92: 313–316.
- [24] Saavedra R., Leyva R., Tenorio E.P., Haces M.L., Rodriguez-Sosa M., Terrazas L.I., Hérion P. 2004. CpG-containing ODN has limited role in the protection against *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunology* 26: 67–73.
- [25] Di Cristina M., Del Porto P., Buffolano W., Beghetto E., Spadoni A., Guglietta S., Piccolella E., Felici F., Gargano N. 2004. The *Toxoplasma gondii* bradyzoite BAG1 and MAG1 induce early humoral and cell-mediated immune responses upon human infection. *Microbes and Infection* 6: 164–171.
- [26] 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.
- [27] Dimier-Poisson I., Aline F., Bout D., Ménévec M.N. 2006. Induction of protective immunity against toxoplasmosis by immunization with *Toxoplasma gondii* RNA. *Vaccine* 24: 1705–1709.
- [28] Ramshaw I.A., Ramsay A.J. 2000. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunology Today* 21: 163–165.
- [29] 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.
- [30] Stanley A.C., Buxton D., Innes E.A., Huntley J.F. 2004. Intranasal immunization with *Toxoplasma gondii* tachyzoite antigen encapsulated into PLG microspheres induces humoral and cell-mediated immunity in sheep. *Vaccine* 22: 3929–3941.
- [31] Lourenco 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.
- [32] Liu K.-Y., Zhang D.-B., Wie Q.-K., Li J., Li G.-P., Yu J.-Z. 2006. Biological role of surface *Toxoplasma gondii* antigen in development of vaccine. *World Journal of Gastroenterology* 12: 2363–2368.
- [33] 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.
- [34] Flamand V., Sornasse T., Thielemans K., Demanet C., Bakkus M., Bazin H., Thielemans F., Leo O., Urban J., Moser M. 1994. Murine dendritic cells pulsed in vitro with tumor antigen induce tumor resistance in vivo. *European Journal of Immunology* 24: 605–610.
- [35] Flohe S.B., Bauer C., Flohe S., Moll H. 1998. Antigen-pulsed epidermal Langerhans cells protect susceptible mice from infection with the intracellular parasite *Leishmania major*. *European Journal of Immunology* 28: 3800–3811.
- [36] Aline F., Bout D., Amigorena S., Roingard P., Dimier-Poisson I. 2004. *Toxoplasma gondii* antigen-pulsed-dendritic cell-derived exosomes induce a protective immune response against *T. gondii* infection. *Infection and Immunity* 72: 4127–4137.
- [37] 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 is protective against congenital toxoplasmosis in BALB/c but not in CBA/J mice. *Infection and Immunity* 71: 6615–6519.
- [38] Fermin Z., Bout D., Ricciardi-Castagnoli P., Hoebecke J. 1999. Salbutamol as an adjuvant for nasal vaccination. *Vaccine* 17: 1936–1941.
- [39] Hafid J., Vincent N., Flori P., Belleste B., Raberin H., Sung R.T.M. 2005. Production of antibodies in murine mucosal immunization with *Toxoplasma gondii* excreted/secreted antigens. *Veterinary Parasitology* 128: 23–28.
- [40] 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.
- [41] Molina V., Schoenfeld Y. 2005. Infection, vaccines and other environmental triggers of autoimmunity. *Autoimmunity* 38: 235–245.

Wpłynęło 19 stycznia 2007

Zaakceptowano 12 lutego 2007