



**POLITECHNIKA
GDAŃSKA**

WYDZIAŁ CHEMICZNY



Imię i nazwisko autora rozprawy: mgr inż. Bartłomiej Ferra
Dyscyplina naukowa: nauki chemiczne - biotechnologia

ROZPRAWA DOKTORSKA

Tytuł rozprawy w języku polskim: „Antygeny chimeryczne *Toxoplasma gondii* – konstrukcja, produkcja oraz badanie użyteczności diagnostycznej i szczepionkowej”

Tytuł rozprawy w języku angielskim: „*Toxoplasma gondii* chimeric antigens – construction, production, diagnostic and vaccine utility examination”

Promotor:
<i>podpis</i>
prof. dr hab. Józef Kur
Promotor pomocniczy:
<i>podpis</i>
dr inż. Lucyna Holec-Gąsior

Gdańsk, 2015

Rodzicom i Dziadkom

Składam serdeczne podziękowania mojemu Promotorowi Panu prof. dr hab. Józefowi Kur za przekazanie mi tematu pracy oraz cennej i bogatej wiedzy. Dziękuję bardzo za opiekę, udzieloną mi pomoc oraz wskazówki przydatne w czasie powstawania niniejszej pracy.

Składam serdeczne podziękowania mojej Promotor Pani dr inż. Lucynie Holec-Gąsior za przekazanie cennej i bogatej wiedzy oraz doświadczenia naukowego. Dziękuję bardzo za życzliwość, cierpliwość, wyrozumiałość, wspierającą atmosferę pracy oraz sugestie podczas powstawania sprawozdań jak i niniejszej pracy.

Dziękuję bardzo Pani dr Justynie Gatkowskiej za opiekę podczas odbywania stażu naukowego oraz przekazanie cennej i bogatej wiedzy.

Dziękuję koleżankom i kolegom z Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej za miłą atmosferę pracy.

Dziękuję moim przyjaciółom za wsparcie w chwilach zwątpienia, wspólne wyjazdy i spotkania. Szczególnie dziękuję Annie, Marcie, Jackowi, Kowciowi i Misiom.

Za trud wykształcenia i wiarę we mnie z całego serca dziękuję moim Rodzicom i Dziadkom.

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE.....	8
ABSTRACT	10
1. WSTĘP.....	12
1.1. Ogólna charakterystyka <i>T. gondii</i>	12
1.1.1. Taksonomia.....	12
1.1.2. Cykl rozwojowy	12
1.1.3. Budowa komórki	14
1.1.4. Przebieg inwazji <i>T. gondii</i> do komórek żywiciela.....	16
1.2. Charakterystyka wybranych antygenów <i>T. gondii</i>	17
1.2.1. Rodzaje antygenów	17
1.2.2. Antygeny mikronem	19
1.2.3. Antygen MIC1	21
1.2.4. Antygen MIC3	23
1.2.5. Antygen MAG1.....	24
1.2.6. Antygen SAG1	24
1.2.7. Antygen SAG2	26
1.2.8. Antygen ROP1.....	26
1.2.9. Antygeny granul o dużej gęstości GRA1, GRA2 i GRA6.....	27
1.3. Toksoplazmoza u ludzi	29
1.3.1. Epidemiologia	29
1.3.2. Podział toksoplazmozy.....	30
1.3.3. Objawy kliniczne toksoplazmozy	30
1.4. Toksoplazmoza u zwierząt	31
1.4.1. Epidemiologia	31
1.4.2. Objawy toksoplazmozy u zwierząt	33
1.5. Diagnostyka toksoplazmozy	34
1.5.1. Wykrywanie przeciwciał antytoksoplazmowych u ludzi.....	34
1.5.2. Metody wykorzystywane w diagnostyce toksoplazmozy	35
1.6. Antygeny rekombinantowe	37
1.6.1. Zastosowanie antygenów rekombinantowych w diagnostyce toksoplazmozy u ludzi ..	37
1.6.2. Zastosowanie antygenów rekombinantowych w diagnostyce toksoplazmozy u zwierząt	38
1.6.3. Zastosowanie rekombinantowych antygenów chimerycznych.....	44
1.7. Szczepionki antytoksoplazmowe.....	45
1.7.1 Zastosowanie antygenów chimerycznych w szczepionkach	54
2. CEL PRACY	56
3. MATERIAŁY	57
3.1. Szczepy bakteryjne.....	57
3.2. Pasożyt <i>T. gondii</i>	57
3.3. Zwierzęta doświadczalne.....	57
3.4. Materiał genetyczny	57
3.4.1. Wektory	57
3.4.2. Plazmidy rekombinantowe	57
3.5. Antygeny rekombinantowe	58
3.6. Pożywki i podłoża bakteriologiczne	59

3.7.	Antybiotyki.....	59
3.8.	Enzymy i bufory	59
3.8.1.	Polimeraza i odczynniki do reakcji PCR.....	59
3.8.2.	Enzymy restykcyjne i bufory do trawienia	62
3.8.3.	Ligaza i odczynniki do reakcji ligacji.....	62
3.9.	Markery wielkości	62
3.9.1.	Markery wielkości DNA	62
3.9.2.	Markery białkowe.....	63
3.10.	Roztwory i bufory do elektroforezy agarozowej.....	63
3.11.	Roztwory i odczynniki do elektroforezy poliakrylamidowej.....	63
3.12.	Bufoy stosowane do oczyszczania białek metodą chromatografii metalopowinowactwa oraz do regeneracji złoża	63
3.13.	Zestawy do izolacji DNA	64
3.14.	Bufoy i odczynniki stosowane do techniki Western blotting.....	64
3.15.	Bufoy i odczynniki stosowane do testu ELISA	64
3.16.	Inne roztwory i bufory	66
3.17.	Aparaty.....	66
4.	METODY	67
4.1.	Hodowle bakteryjne	67
4.2.	Amplifikacja fragmentów genów kodujących poszczególne białka <i>T.gondii</i>	67
4.2.1.	Standarowa reakcja PCR.....	67
4.2.2.	Otrzymywanie matrycy DNA do reakcji PCR podczas składania genów	68
4.2.3.	Właściwa amplifikacja DNA podczas składania genów	68
4.3.	Techniki wykorzystywane przy klonowaniu fragmentów DNA	69
4.3.1.	Izolacja plazmidowego DNA	69
4.3.2.	Izolacja fragmentu DNA z żelu agarozowego lub z próbki po obróbce enzymatycznej	69
4.3.3.	Reakcja trawienia DNA (insertów, plazmidów rekombinantowych, wektorów) enzymami restykcyjnymi	69
4.3.4.	Reakcja ligacji	70
4.4.	Techniki elektroforetyczne.....	70
4.4.1.	Elektroforeza w żelu agarozowym.....	70
4.4.2.	Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących	70
4.5.	Transformacja komórek <i>E. coli</i>	71
4.6.	Ekspresja genów kodujących poszczególne białka rekombinantowe w układzie Tabora-Studiera w odpowiednim szczepie <i>E. coli</i>	71
4.7.	Oczyszczanie rekombinantowych białek metodą chromatografii metalopowinowactwa ...	71
4.7.1.	Regeneracja złoża:	71
4.7.2.	Oczyszczanie białek rekombinantowych:.....	71
4.8.	Oznaczanie stężenia białek metodą Bradforda.....	72
4.9.	Test Western blotting	72
4.10.	Test ELISA	73
4.11.	Doświadczenia na zwierzętach	74
4.11.1.	Pasaż <i>in vivo</i> cyst słabo zjadliwego szczepu DX <i>T. gondii</i>	74
4.11.2.	Immunicacja myszy	74
4.11.3.	Zarażenie immunizowanych myszy cystami słabo zjadliwego szczepu DX <i>T. gondii</i>	75

4.11.4. Ocena właściwości immunoprotekcyjnych.....	75
5. WYNIKI.....	76
5.1. Konstrukcja plazmidów rekombinantowych kodujących antygeny chimeryczne	77
5.1.1. Konstrukcja plazmidów pUET1/MIC1-MAG1-SAG1 _M oraz pUET1/MIC1-MAG1-SAG1 _D	77
5.1.1.1. Amplifikacja fragmentów genów.....	78
5.1.1.2. Klonowanie DNA fragmentów genów <i>mic1-mag1-sag1_M</i> oraz <i>mic1-mag1-sag1_D</i> do DNA wektora pUET1.....	78
5.1.2. Konstrukcja plazmidów pET30/SAG1 _M -MIC1-MAG1 oraz pET30/SAG1 _D -MIC1-MAG1	80
5.1.2.1. Amplifikacja fragmentów genów.....	81
5.1.2.2. Klonowanie fragmentów genów <i>sag1_M-mic1-mag1</i> oraz <i>sag1_D-mic1-mag1</i> do DNA wektora pET30 Ek/LIC	82
5.1.3. Konstrukcja plazmidu pET30/MAG1-MIC3-ROP1.....	84
5.1.3.1. Amplifikacja fragmentów genów.....	85
5.1.3.2. Klonowanie DNA fragmentu genu <i>mag1-mic3-rop1</i> do DNA wektora pET30 Ek/LIC.....	85
5.1.4. Konstrukcja plazmidów pET30/SAG2-GRA1-ROP1 _M oraz pET30/SAG2-GRA1-ROP1 _D	86
5.1.4.1. Amplifikacja fragmentów genów.....	87
5.1.4.2. Klonowanie DNA fragmentów genów <i>sag2-gra1-rop1_M</i> oraz <i>sag2-gra1-rop1_D</i> do DNA wektora pET30 Ek/LIC	87
5.1.5. Konstrukcja plazmidu pET30/GRA1-GRA2-GRA6.....	88
5.1.5.1. Amplifikacja fragmentów genów.....	89
5.1.5.2. Klonowanie DNA fragmentu genu <i>gra1-gra2-gra6</i> do DNA wektora pET30 Ek/LIC.....	89
5.1.6. Podsumowanie	90
5.2. Analiza sekwencji aminokwasowej antygenów chimerycznych.....	92
5.3. Optymalizacja ekspresji genów kodujących antygeny chimeryczne	94
5.4. Immunoidentyfikacja	97
5.5. Oczyszczanie.....	98
5.6. Test IgG ELISA z wykorzystaniem surowic ludzkich	100
5.6.1. Miareczkowanie stężenia antygenów rekombinantowych oraz rozcieńczenia przeciwciał przeciw ludzkim immunoglobulinom klasy IgG	100
5.6.2. Wyznaczanie współczynników odcięcia	101
5.6.3. Oszacowanie przydatności rekombinantowych antygenów chimerycznych <i>T. gondii</i> w serodiagnostyce toksoplazmozy u ludzi	102
5.7. Test IgG ELISA w serodiagnostyce toksoplazmozy u zwierząt.....	109
5.7.1. Miareczkowanie stężenia antygenów rekombinantowych oraz rozcieńczenia przeciwciał anty-kocich, anty-końskich, anty-owczych i anty-świńskich IgG	109
5.7.2. Wyznaczanie współczynników odcięcia.....	109
5.7.3. Oszacowanie przydatności rekombinantowych antygenów chimerycznych <i>T. gondii</i> w serodiagnostyce toksoplazmozy u zwierząt.....	110
5.7.3.1. Oszacowanie przydatności rekombinantowych antygenów chimerycznych w serodiagnostyce toksoplazmozy u kotów	111
5.7.3.2. Oszacowanie przydatności rekombinantowych antygenów chimerycznych w serodiagnostyce toksoplazmozy u koni.....	112
5.7.3.3. Oszacowanie przydatności rekombinantowych antygenów chimerycznych w serodiagnostyce toksoplazmozy u owiec	114

5.7.3.4. Oszacowanie przydatności rekombinantowych antygenów chimerycznych w serodiagnostyce toksoplazmozy u świń	115
5.7.4. Podsumowanie	117
5.8. Ocena właściwości immunoprotekcyjnych wybranych antygenów chimerycznych na modelu mysiej toksoplazmozy.....	118
5.8.1. Ocena właściwości immunoprotekcyjnych.....	118
6. DYSKUSJA	121
6.1. Konstrukcja plazmidów rekombinantowych oraz produkcja antygenów.....	122
6.2. Użyteczność antygenów chimerycznych w serodiagnostyce toksoplazmozy u ludzi	123
6.3. Użyteczność antygenów chimerycznych w serodiagnostyce toksoplazmozy u zwierząt....	128
6.3.1. Przydatność antygenów chimerycznych w serodiagnostyce toksoplazmozy u kotów.	129
6.3.2. Przydatność antygenów chimerycznych w serodiagnostyce toksoplazmozy u koni ...	131
6.3.3. Przydatność antygenów chimerycznych w serodiagnostyce toksoplazmozy u owiec..	132
6.3.4. Przydatność antygenów chimerycznych w serodiagnostyce toksoplazmozy u świń ...	134
6.3.5. Podsumowanie	137
6.4. Właściwości immunoprotekcyjne wybranych antygenów chimerycznych.....	140
7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI KOŃCOWE	144
8. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	145
9. LITERATURA	147
10. DOROBEK NAUKOWY, STYPENDIA, GRANTY, ITP.	159

STRESZCZENIE

Wewnątrzkomórkowy pasożyt *Toxoplasma gondii* posiada zdolność do zarażania szerokiego spektrum zwierząt stałocieplnych, w tym i człowieka. Z medycznego punktu widzenia prawidłowe rozpoznanie inwazji *T. gondii* ma ogromne znaczenie w przypadku kobiet ciężarnych ze względu na duże ryzyko przejścia tachyzoitów poprzez łożysko do płodu, co może prowadzić do poronień lub powodować wady rozwojowe u noworodków. Wykrywanie zarażenia pasożytem jest również istotne w przypadku pacjentów z niedoborami odporności, dla których nawet przewlekła faza toksoplazmozy może być niebezpieczna. Jak pokazują liczne badania epidemiologiczne toksoplazmoza jest szeroko rozpowszechniona wśród różnych populacji zwierząt hodowlanych. Choroba przyczynia się przede wszystkim do strat reprodukcyjnych oraz wad rozwojowych u młodych osobników, co stanowi poważny problem ekonomiczny. Z drugiej strony jedną z głównych dróg transmisji pasożyta do organizmu człowieka jest spożywanie niedogotowanego lub surowego mięsa oraz nieodpowiednio przetworzonych produktów mlecznych pochodzących od zwierząt hodowlanych.

Obecnie diagnostyka toksoplazmozy opiera się głównie na wykorzystaniu antygenów natywnych w testach immunoenzymatycznych pozwalających na wykrywanie przeciwciał klas IgG, IgM oraz IgA jednak w niektórych przypadkach przeprowadzone badania dają niejednoznaczne wyniki. Ponadto, komercyjnie dostępne testy diagnostyczne ze względu na swoją cenę nie znajdują powszechnego zastosowania w serodiagnostyce toksoplazmozy u zwierząt, która wymaga analizy dużej ilości prób. Z tego powodu poszukuje się nowych narzędzi diagnostycznych, głównie antygenów rekombinantowych, które zdecydowanie łatwiej, taniej, szybciej i bezpieczniej produkować niż antygeny natywne. Dodatkową zaletą wykorzystania tego typu preparatów antygenowych w serodiagnostyce toksoplazmozy jest łatwiejsza standaryzacja testów, jak również możliwość doboru białek charakterystycznych dla danej formy rozwojowej pasożyta, co może pozwolić na różnicowanie faz choroby. Antygeny rekombinantowe testowane są również pod kątem ich potencjalnego zastosowania, jako podjednostkowych szczepionek antytoksoplazmozowych.

W niniejszej pracy, która stanowi kontynuację badań prowadzonych od kilkunastu lat w Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej, konstruowano wydajne systemy ekspresyjne *Escherichia coli* do produkcji różnych wariantów rekombinantowych antygenów chimerycznych składających się z trzech wybranych fragmentów immunodominujących antygenów GRA1, GRA2, GRA6, MAG1, MIC1, MIC3, ROP1, SAG1 oraz SAG2 pasożyta *T. gondii*. W kolejnych etapach pracy oszacowano przydatność diagnostyczną uzyskanych preparatów białkowych do wykrywania zarażenia pasożytem w teście IgG ELISA

z wykorzystaniem surowic ludzkich oraz zwierzęcych (kocich, końskich, owczych i świńskich). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż nowo wyprodukowane antygeny chimeryczne mogą stanowić alternatywę dla poliwalentnego antygeny natywnego w wykrywaniu swoistych przeciwciał IgG anty-*T. gondii* zawartych w surowicach pacjentów ze stwierdzoną toksoplazmozą, o czym świadczy czułość opracowanych w niniejszej pracy testów IgG ELISA wynosząca od 88,4% do 100%. Ponadto przeprowadzone badania wykazały, iż antygen chimeryczny SAG2-GRA1-ROP1_D charakteryzujący się wysoką reaktywnością w testach IgG ELISA z wykorzystaniem surowic zwierzęcych (od 93,3% do 100%) może zostać wykorzystany do opracowania uniwersalnego testu serodiagnostycznego do wykrywania swoistych przeciwciał antytoksoplazmowych w surowicach pochodzących od różnych gatunków zwierząt. W ostatnim etapie pracy oceniono właściwości immunoprotekcyjne wybranych preparatów rekombinantowych antygenów chimerycznych *T. gondii* na modelu mysiej toksoplazmozy. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, iż antygen chimeryczny SAG2-GRA1-ROP1_D charakteryzuje się wysokim potencjałem szczepionkowym i pozwala na częściową ochronę przed przewlekłą toksoplazmozą (86,2% redukcja liczby cyst w mózgowiu immunizowanych myszy).

ABSTRACT

The intracellular parasite *Toxoplasma gondii* has the ability to infect a wide range of warm-blooded animals, including humans. From a medical point of view, the correct recognition of *T. gondii* invasion is very important in the case of pregnant women. This is associated with a significant risk of tachyzoites transmission via the placenta to the fetus, which may lead to miscarriages or to cause malformations in newborns. Detection of parasite invasion is also significant for patients with immunodeficiency, for whom even the chronic phase of toxoplasmosis can be a serious threat. As shown by numerous epidemiological studies toxoplasmosis is widespread among different populations of animals. Toxoplasmosis in farm animals, especially contributes to the loss of reproductive and malformations in young individuals, which is a serious economic problem. On the other hand, one of the main transmission routes of the parasite in the human is the consumption of undercooked or raw meat and improperly processed milk products derived from animals.

Currently, diagnosis of toxoplasmosis is based mainly on the use of the native antigens in enzyme immunoassay which allow for detection of IgG, IgM and IgA antibody classes. However, in some cases the performed studies give the ambiguous results. Moreover, the commercially available diagnostic tests due to its price are not generally applicable in the serodiagnosis of toxoplasmosis in animals, which requires the analysis of a large number of samples. For this reason, many research groups are currently working on new diagnostic tools, which are mainly recombinant antigens. Compared to the native antigens their production is much easier, cheaper, faster and safer. An additional advantage of the recombinant antigens is easier way to standardize assays as well as the possibility of proteins selection characteristic for the development form of the parasite, which may allow for differentiation phases of the disease. Recombinant antigens are also tested for their potential use as a subunit vaccine against toxoplasmosis.

In this work, which is the continuation of the research carried out in the Department of Molecular Biotechnology and Microbiology at Gdańsk University of Technology for several years, the efficient *Escherichia coli* expression systems for the production of different variants of recombinant chimeric antigens composed of the immunodominant regions of three selected *T. gondii* antigens GRA1, GRA2, GRA6, MAG1, MIC1, MIC3, ROP1, SAG1 and SAG2 has been constructed. In the next part of the work the diagnostic usefulness of obtaining proteins for detection of anti-*T. gondii* antibodies were evaluated in the IgG ELISA assay using human and animal (feline, horses, ovine, and pigs) sera. The results show that the newly produced chimeric antigens could be an alternative to the native polyvalent antigen for the detection of anti-*T. gondii* IgG antibodies found in the sera of patients with diagnosed toxoplasmosis

(sensitivity of IgG ELISA assays between 88.4% to 100%). In addition, the chimeric antigen SAG2-GRA1-ROP1_D characterized by a high reactivity in the IgG ELISA assays using animal sera (from 93.3% to 100%) could be used to develop a universal serodiagnostic assay for the detection of specific anti-*T. gondii* antibodies in sera derived from different animal species. In the last stage of the work the immunoprotective properties of selected *T. gondii* recombinant chimeric antigens were evaluated in a murine model of toxoplasmosis. The results of this study show that the chimeric antigen SAG2-GRA1-ROP1_D has a high vaccine potential and allows for partial protection against chronic toxoplasmosis (86.2% reduction in the number of cysts in the brain of immunized mice).

1. WSTĘP

1.1. Ogólna charakterystyka *T. gondii*

1.1.1. Taksonomia

Toxoplasma gondii jest bezwzględny wewnątrzkomórkowym pasożytem zwierząt stałocieplnych i człowieka. Pasożyta tego początkowo nazywanego *Leishmania gondii* jako pierwsi opisali w 1908 roku Nicolle i Manceaux u północnoafrykańskiego gryzonia *Ctenodactylus gondii*. Tego samego roku także Splendore wykrył tego pasożyta u królika w Brazylii. Po niedługim okresie zorientowano się, iż jest to zupełnie nowy organizm i nazwano go *Toxoplasma gondii*, co nawiązywało do nazwy żywiciela oraz kształtu pierwotniaka (gr. *tokson* – łuk oraz gr. *plasma* – forma). Cechy morfologiczne i biologiczne były podstawą włączenia pasożyta do działu Protozoa, a w nim do typu Apicomplexa, do którego należą także inne pasożyty wewnątrzkomórkowe takie jak: *Plasmodium*, *Cryptosporidium*, *Eimeria*, *Babesia*, *Theileria* i *Sarcocystis*. Poznanie złożonego cyklu rozwojowego pozwoliło na jego sklasyfikowanie w obrębie gromady Coccidea (Tab. 1) [Cox, 1998, 2002; Weiss i Kim, 2007].

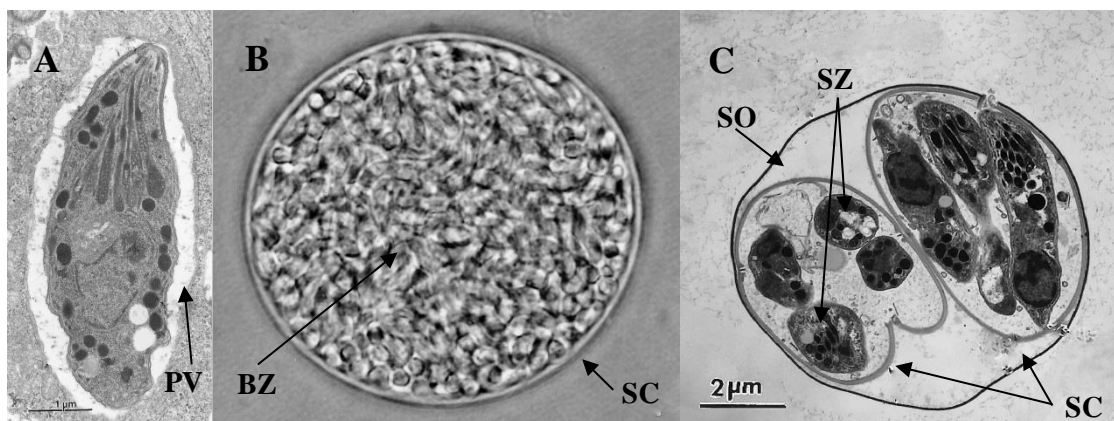
Tab. 1. Pozycja taksonomiczna pasożyta *T. gondii* [Niewiadomska i wsp., 2001].

Nadkrólestwo	Eucaryota
Królestwo	Protista = Protoctista
Dział	Protozoa
Typ	Apicomplexa = Sporozoa = Telosporidia
Gromada	Coccidea
Rząd	Eimerida
Rodzina	Eimeriidae
Rodzaj	<i>Toxoplasma</i>
Gatunek	<i>Toxoplasma gondii</i>

1.1.2. Cykl rozwojowy

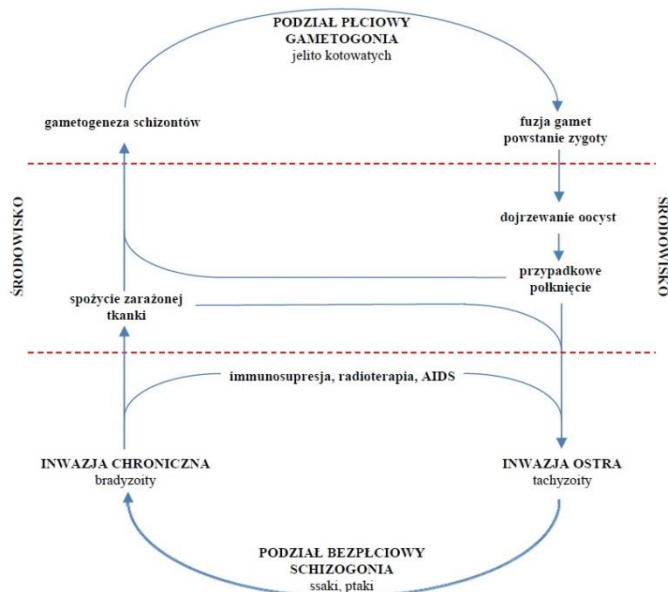
Do pełnego cyklu rozwojowego *T. gondii* wymaga dwóch żywicieli: pośredniego – ptaki, ssaki, w tym człowiek (rozmnażanie bezpłciowe) i ostatecznego – ssaki kotowate (rozmnażanie płciowe). W cyklu tym wyróżnia się trzy następujące formy rozwojowe (Rys. 1) [Dubey i wsp., 1998]:

- tachyzoity (gr. *tachys* – szybko) – formy szybko namnażające się wegetatywnie;
- cysty tkankowe zawierające bradyzoity (gr. *bradys* – wolno) – formy przetrwalne, wolno namnażające się wegetatywnie;
- oocysty powstające podczas rozmnażania płciowego – formy przetrwalne zawierające sporozoity.



Rys. 1. Formy rozwojowe *T. gondii*: A) tachyzoit w wakuoli pasożytniczej (PV); B) cysta tkankowa zawierające tysiące bradyzoitów (BZ – bradyzoity; SC – ściana cysty tkankowej); C) oocysta (SO – ściana oocyty; SC – sporocysty; SZ – sporozoity) [Dubey i wsp., 1998].

W organizmie żywicieli pośrednich pasożyt namnaża się wewnątrzkomórkowo przez podział bezpłciowy (schizogonia) (Rys. 2) [Black i Boothroyd, 2000; Dytnerka i wsp., 2004]. Po zarażeniu z oocyst uwalniane są sporozoity, które penetrują nabłonek oraz ścianę jelita cienkiego, a następnie z fagocytami drogą naczyń krwionośnych i limfatycznych docierają do ośrodkowego układu nerwowego, mięśni, płuc i gałki ocznej. W wyniku inwazji do komórek żywiciela pasożyt namnaża się bardzo szybko w wakuolach pasożytniczych, tworząc pseudocysty zawierające wiele tachyzoitów. Uwalniane ze zniszczonych komórek żywiciela tachyzoity atakują następnie kolejne komórki. W przypadku pierwotnego zarażenia jest to tak zwana ostra faza inwazji. Na skutek zmiany warunków takich jak pH, stan zapalny, podwyższona temperatura, itp., a także odpowiedzi immunologicznej układu odpornościowego, tachyzoity w tkankach i narządach przechodzą w formy spoczynkowe (bradyzoity), które zamknięte są w cystach tkankowych. Oznacza to, że faza ostra inwazji przeszła w przewlekłą i namnażanie pasożyta nie jest już tak dynamiczne i po pewnym czasie zostaje całkowicie zahamowane. U osobników z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym cysty utrzymują się w organizmie żywiciela aż do śmierci nie wywołując żadnych zmian czy zaburzeń. W momencie obniżenia odporności u żywiciela na skutek immunosupresji, zespołu nabytego niedoboru odporności AIDS (ang. Acquired Immunodeficiency Syndrome), czy radioterapii może dojść do reaktywacji zarażenia i ponownej inwazji do komórek żywiciela.

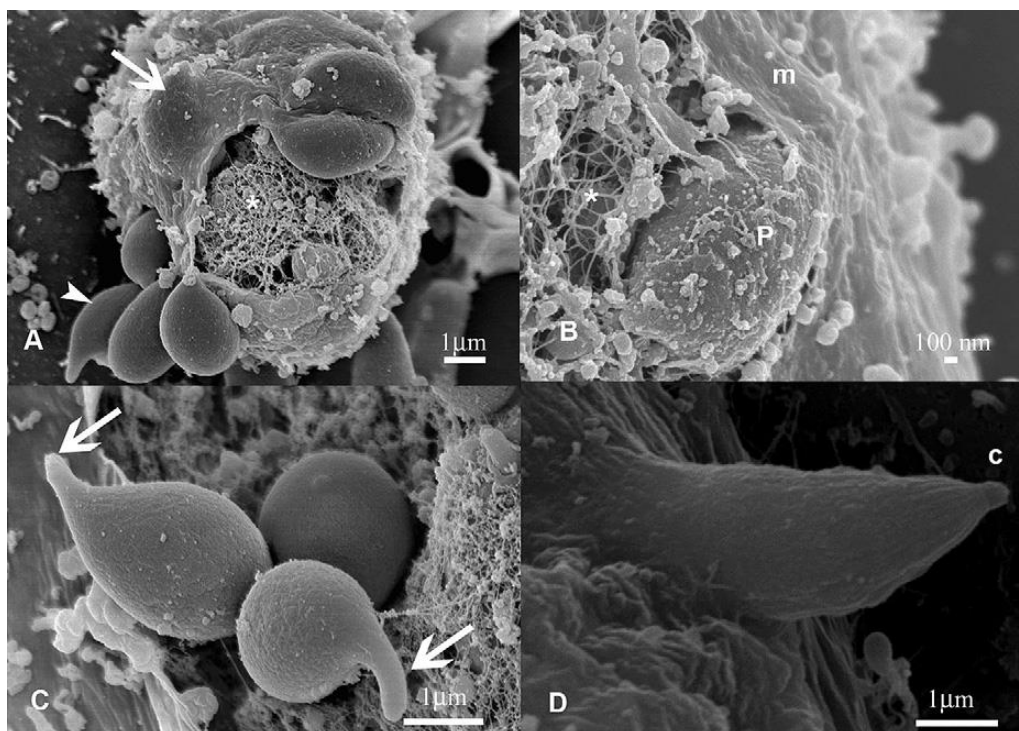


Rys. 2. Schemat cyklu rozwojowego *T. gondii* [Black i Boothroyd, 2000].

Żywicielem ostatecznym pasożyta są kotowate, które zarażają się najczęściej poprzez spożycie mięsa zawierającego cysty tkankowe. Podobnie jak u żywicieli pośrednich również dla kotowatych wszystkie formy rozwojowe są zdolne do wywołania inwazji. U żywiciela ostatecznego *T. gondii* penetruje komórki nabłonkowe jelita cienkiego, gdzie powstają schizonty, które na skutek podziałów tworzą merozoity, a te po kolejnych podziałach przechodzą w gametocyty. Następnie z gametocytów powstają makro- i mikrogamety, które po fuzji tworzą zygoty (oocysty), które następnie wydalane są przez okres 2-3 tygodni wraz z kałem w liczbie ok. 10 milionów dziennie. Wydalone oocysty w kolejnych dniach przekształcają się w sporocysty, w których w wyniku sporogonii powstają cztery sporozycyty. Oocysty wydalane wraz z kałem, mimo wpływu czynników zewnętrznych i zmiennych warunków środowiskowych, potrafią zachować właściwości inwazyjne nawet przez okres dwóch lat [Black i Boothroyd, 2000; Dytnerska i wsp., 2004].

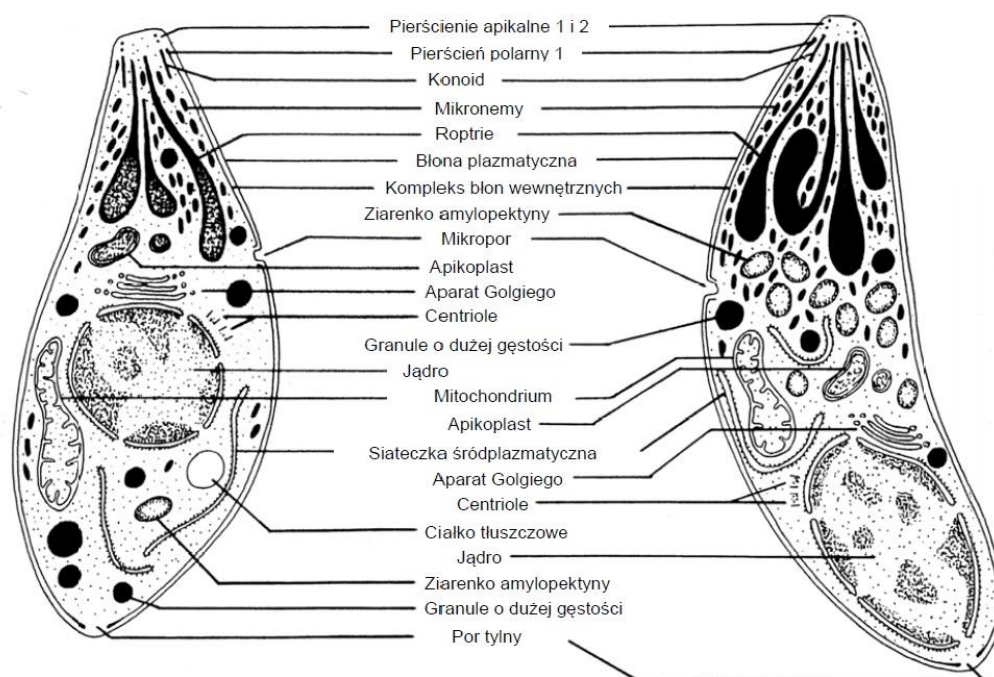
1.1.3. Budowa komórki

Komórki pasożyta mają asymetryczny, półksiężycowaty kształt, przypominający rogalika. Biegun apikalny jest lekko wydłużony i zaokrąglony, natomiast biegun tylny wyraźnie zaokrąglony (Rys. 3).



Rys. 3. Pasożyty *T. gondii* widziane przy użyciu mikroskopu elektronowego podczas opuszczania komórki żywiciela. A) Tachyzoit pod błoną komórki żywiciela (strzałka), tachyzoit na zewnątrz komórki żywiciela (grot), pęknięta błona komórki żywiciela (gwiazdka). B) Pasożyt (P), którego połowa komórki wysunęła się już z błony komórki żywiciela (m), cytoszkieleł błony komórki żywiciela (gwiazdka). C) Grupa pasożytów o wydłużonych konoidach (strzałki), która podczas opuszczania komórki żywiciela zniszczyła jej błonę. D) Pojedyncza komórka pasożyta próbująca przebić błonę komórki żywiciela, posiadająca wyróżniający się biegun apikalny (c) [Caldas i wsp., 2010].

Komórki pasożyta *T. gondii* posiadają trzy błony – pierwsza z nich to zewnętrzna błona plazmatyczna, a następne dwie tworzą tak zwany kompleks błon wewnętrznych. Na apikalnym biegunie komórki znajdują się pierścienie polarne. Pierwszy z nich odpowiedzialny jest za wzmacnianie kompleksu błon wewnętrznych, natomiast drugi łączy się z mikrotubulami tworzącymi uzębrowanie komórki pasożyta. Na biegunie tym znajduje się też konoid zbudowany z sześciu mikrotubul biorący udział w inwazji pasożyta do komórek żywiciela. Na apikalnym końcu komórki umieszczone są charakterystyczne dla typu Apicomplexa organelle wydzielnicze takie jak roprotrie, których szyjki umiejscowione są w konoidzie oraz mikronemy (Rys. 4). Ponadto w komórce pasożyta znajdują się także granule o dużej gęstości, których ilość i lokalizacja uzależniona jest od formy rozwojowej. Wymienione powyżej trzy organelle komórkowe podczas inwazji pasożyta do komórek żywiciela wydzielają odpowiednie białka, których zadaniem jest umożliwienie przyłączenia się do receptorów komórkowych, sfaldowanie błony komórkowej w określonym miejscu, utworzenie kompleksów budujących połączenie ruchome tzw. „moving junction” oraz wakuoli pasożytniczej. W komórkach *T. gondii* znajdują się także charakterystyczne dla wszystkich Eucaryota organelle takie jak aparat Golgiego, siateczka śródplazmatyczna i mitochondria [Black i Boothroyd, 2000; Dubey i wsp., 1998].



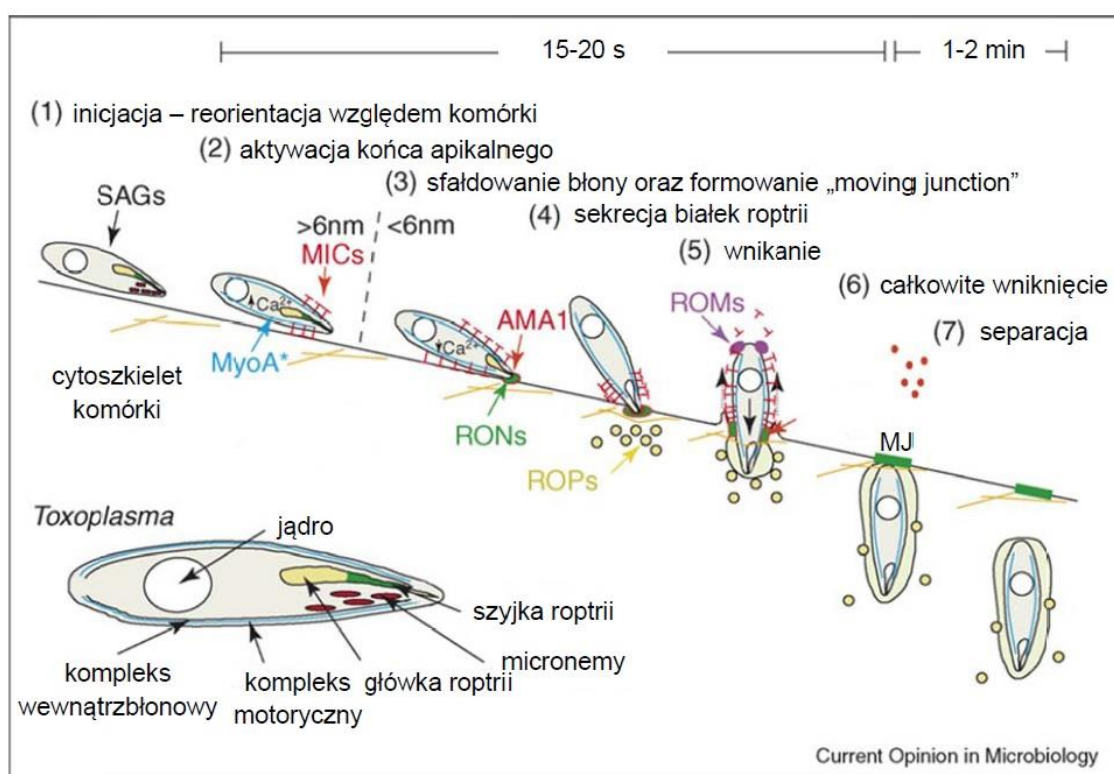
Rys. 4. Budowa morfologiczna komórki *T. gondii* z uwzględnieniem organelli wydzielniczych. Po lewej – tachyzoit, po prawej – bradyzoit [Dubey i wsp., 1998].

1.1.4. Przebieg inwazji *T. gondii* do komórek żywiciela

Pasożyt *T. gondii* posiada zdolność inwazji do szerokiego spektrum komórek i do aktywnej penetracji wykorzystuje aktynowo-miozynowy kompleks motoryczny. Sugeruje to, iż pierwotniak wykształcił mechanizm pozwalający na adhezję do wielu receptorów komórkowych lub też sam posiada receptor, który ułatwia mu przyłączanie do wszystkich komórek jądrzastych. Wiązaniu komórek pasożyta sprzyja obecność na powierzchni komórek żywiciela lamininy, heparyny oraz innych glikozaminoglikanów i proteoglikanów. Umożliwia to adhezję do komórek poprzez tworzenie wiązań z lektyną i antygenami powierzchniowymi rodziny SAG (ang. surface antigens), znajdującymi się na powierzchni komórek *T. gondii* [Carruthers, 2002; Carruthers i Boothroyd, 2007].

Pierwszym etapem kaskady prowadzącej do wniknięcia komórki pasożyta jest jego ustawienie w odpowiedniej orientacji względem komórki żywiciela i następnie rozpoznanie przez białka SAG receptorów powierzchniowych (Rys. 5). W następstwie tego procesu wzrasta stężenie jonów Ca^{2+} w komórkach pasożyta, co powoduje rozpoczęcie produkcji białek mikronem i ich akumulację w mikronemach w apikalnym końcu komórki [Carruthers i wsp., 1999; Caldas i wsp., 2010]. W wyniku nagromadzenia tych białek na powierzchni pasożyta pojawiają się dwa główne kompleksy adhezyjne: pełniący zasadniczą rolę w adhezji kompleks MIC6-MIC1-MIC4, a następnie kompleks MyoA (ang. myosin A motor complex) zbudowany z białek mikronem MIC2 i M2AP (związany z aldolazą wiążącą filamenty aktynowe).

W konsekwencji przemian, które zaszły w komórce pasożyta wydzielane są białka mikronem AMA1 oraz białka pochodzące z szyjki roptrii (RON, ang. rhotry neck protein) tworzące stabilne kompleksy budujące strukturę ruchomego połączenia (MJ, ang. moving junction). Następnie przy udziale miozyny oddziałującej z kompleksem MyoA rozpoczyna się wsuwanie komórki pasożyta, czemu towarzyszy również sekrecja pozostałych białek roptrii (ROP, ang. rhotry antigens), do cytoplazmy komórki żywiciela. Komórka pasożyta aktywnie penetruje w głąb na zasadzie „ciągnięcia”, kolejne białka mikronem odcinane są przez romboido-podobne proteazy. Gdy cała komórka *T. gondii* przejdzie przez strukturę MJ, błona zewnętrzna zamyka się za tylnym biegunem pasożyta tworząc wakuolę pasożytniczą, w której dochodzi do sekrecji kolejnych białek i namnażania pierwotniaka [Carruthers i wsp., 2000; Carruthers i Boothroyd, 2007].



Rys. 5. Schemat adhezji i inwazji pasożyta *T. gondii* do komórki żywiciela [Carruthers i Boothroyd, 2007].

1.2. Charakterystyka wybranych antygenów *T. gondii*

1.2.1. Rodzaje antygenów

Od kilkadziesiąt lat prowadzone są badania mające na celu poznanie pełnej budowy antygenowej *T. gondii*. Na podstawie uzyskanych dotychczas wyników określono jakie antygeny biorą udział w poszczególnych etapach inwazji pasożyta do komórek żywiciela. Daje to możliwość stworzenia leków blokujących mechanizmy komórkowe kluczowe dla początkowych etapów inwazji oraz szczepionek, które będą stymulowały wytwarzanie swoistych przeciwciał skierowanych przeciw antygenom

powierzchniowym pasożyta bądź na ich fragmenty, pozostające na zarażonych komórkach żywiciela po inwazji. W stosowanych obecnie testach diagnostycznych do wykrywania zarażenia *T. gondii* stosuje się głównie antygeny natywne, których otrzymanie wymaga hodowli pasożyta na liniach komórkowych lub zwierzętach laboratoryjnych. Poznanie pełnej struktury antygenowej *T. gondii* umożliwi zatem również bezpieczną produkcję antygenów rekombinantowych, które mogą być zastosowane jako nowe narzędzia diagnostyczne.

Antygeny *T. gondii* znajdują się na powierzchni błony komórkowej, w cytozolu a także w organellach wydzielniczych takich jak roptrie, mikronemy oraz granule o dużej gęstości skąd uwalniane są podczas inwazji pasożyta do komórki żywiciela. Budują i wypełniają one także wnętrze wakuoli pasożytniczej i cysty tkankowej. Przeprowadzone do tej pory badania pozwoliły poznać już znaczną część antygenów pasożyta [Długońska i Dytnerka, 1999; 2003], które podzielono na cztery główne grupy:

1. Antygeny powierzchniowe SAG (ang. surface antigens)

Grupa antygenów powierzchniowych zakotwiczonych w błonie zewnętrznej pasożyta za pomocą reszt glikozylofosfatydilinozytolu (GPI, ang. glycosylphosphatidylinositol), do której zalicza się najwięcej jak do tej pory poznanych białek tachyzoitów. Główną funkcją tych antygenów jest rozpoznawanie i przyłączanie się do receptorów powierzchniowych komórek żywiciela.

2. Antygeny mikronem MIC (ang. microneme antigens)

Grupa antygenów, których produkcja uzależniona jest od wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. Antygeny MIC tworzą kompleksy adhezyjne lub występują w postaci pojedynczych białek, których sekrecja odbywa się z organelli wydzielniczych mikronem. Do ich funkcji należą adhezja i zaburzenie integralności błony komórkowej żywiciela oraz umożliwienie penetracji do wnętrza komórek.

3. Antygeny roptrii ROP (ang. rhoptry antigens)

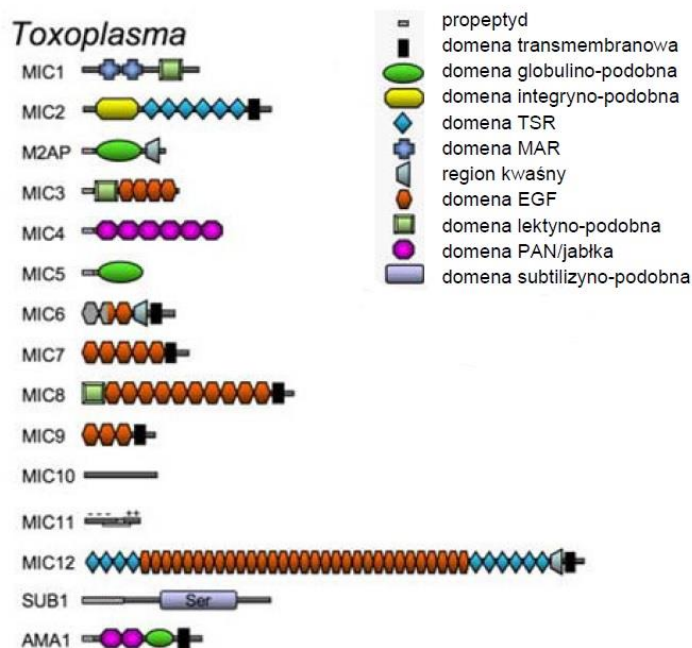
Grupa białek wydzielanych z szyjki lub główki roptrii, które umożliwiają odpowiednio sfałdowanie błony komórkowej żywiciela oraz formowanie wakuoli pasożytniczej.

4. Antygeny granul o dużej gęstości GRA (ang. dense granule antigens)

Antygeny wydzielane przez granule o dużej gęstości zaliczane są do antygenów sekrecyjno-wydzielniczych ESA (ang. excreted-secreted antigens), które stanowią do 80% antygenów wykrywanych we wczesnej fazie toksoplazmozy. Białka te pełnią rolę w budowaniu wnętrza wakuoli pasożytniczej.

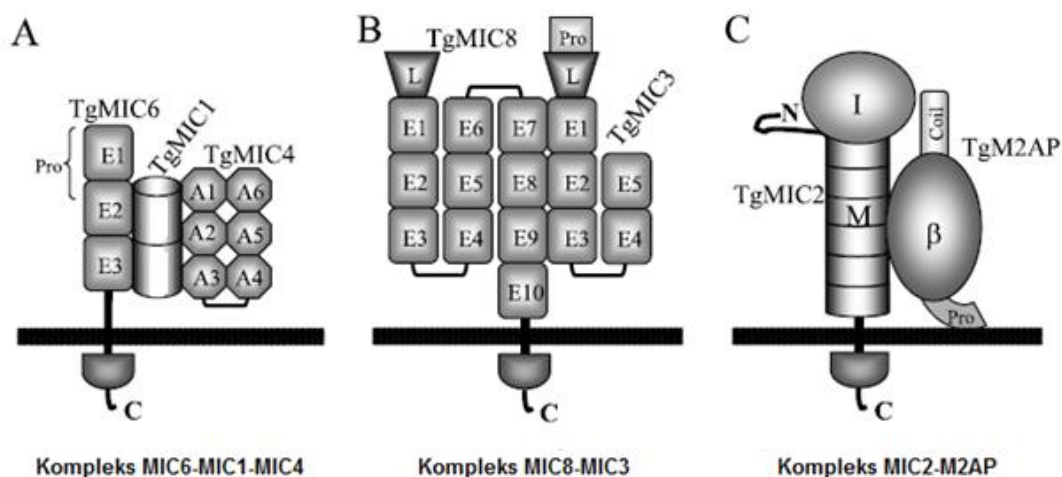
1.2.2. Antygeny mikronem

Pasożyt *T. gondii* w apikalnym końcu komórki posiada liczne owalne organelle wydzielnicze (mikronemy), z których odbywa się sekrecja wielu białek MIC. Przeprowadzone w ostatnich latach badania pozwoliły na scharakteryzowanie kilkunastu antygenów mikronem [Dowse i Soldati, 2004]. W zależności od formy rozwojowej pasożyta poziom ekspresji genów kodujących dane białka mikronem jest zróżnicowany (charakterystyczny dla określonej formy), na przykład białko MIC6 produkowane jest przez tachyzoity, a białka MIC7 i MIC9 przez bradyzoity [Meissner i wsp., 2002]. Wszystkie białka mikronem posiadają charakterystyczną budowę złożoną z sekwencji sygnałnej, domeny odpowiedzialnej za adhezję oraz C-końcowego fragmentu cytoplazmatycznego. Struktura białek mikronem (Rys. 6) bogata jest w różnego typu domeny wpływające w pośredni lub bezpośredni sposób na zdolność adhezji i penetracji pasożyta do komórek żywiciela. Są to między innymi domeny transmembranowe (TM, ang. transmembrane domain) występujące w białkach MIC2, MIC6-MIC9, MIC12 oraz AMA1 (pozwalające na kotwiczenie antygenów w błonie zewnętrznej komórki pasożyta). Innymi przykładami są liczne domeny EGF (ang. Epidermal Growth Factor-like domain), domeny tworzące tak zwane ogony cytoplazmatyczne, sekwencje trombospondyno-podobne typu 1 (TSP-1, ang. thrombospondine-like sequence/domain type-1), domeny TSR-1 (ang. thrombospondin type-1 repeats) zbudowane z trzech powtórzeń TSP-1, domeny lektyno-podobne, domeny glikozylofosfatydyloinozytolo-podobne (ang. glycosylphosphatidylinositol-like domain) i wiele innych. Produkcja białek mikronem uzależniona jest od wysokiego wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} , które zostaje osiągnięte w momencie gdy antygeny SAG rozpoznają receptory powierzchniowe komórek żywiciela [Carruthers i Sibley, 1999; Caldas i wsp., 2010]. Podczas poszczególnych etapów szlaku sekrecyjnego białka mikronem ulegają modyfikacjom proteolitycznym w retikulum endoplazmatycznym oraz aparacie Golgiego, skąd w postaci pojedynczych antygenów lub złożonych kompleksów adhezyjnych trafiają do mikronem, z których odbywa się ich sekrecja na powierzchnię komórki.



Rys. 6. Schematyczne struktury domenowe białek mikronem [Carruthers i Tomley, 2008].

Białka mikronem biorą udział w pierwszym zasadniczym etapie inwazji pasożyta do komórek żywiciela. Do antygenów tych zaliczane są białka zakotwiczone w błonie oraz białka rozpuszczalne, wszystkie wykazujące do siebie wzajemnie powinowactwo, które umożliwia tworzenie stabilnych kompleksów adhezyjnych (Rys. 7). Kompleksy MIC6-MIC1-MIC4 oraz MIC8-MIC3 odpowiedzialne są za ukierunkowaną adhezję do receptorów powierzchniowych komórek żywiciela, co pozwala na stworzenie połączenia pomiędzy komórkami. Białka mikronem budujące kompleks MIC2-M2AP (Rys. 7C) pełnią również zasadniczą rolę w przemieszczaniu się oraz penetracji pasożyta w głąb komórek jądrzastych. Posiadają one bowiem zdolność do tworzenia połączenia z systemem aktynowo-miozynowym, który daje siłę napędową wykorzystywaną przez pasożyta do lokomocji [Carruthers i Sibley, 1997; Carruthers, 2002; Carruthers i Boothroyd, 2007; Soldati i Meissner, 2004]. Podczas penetracji pasożyta w kierunku od bieguna apikalnego do tylnego w głąb komórki żywiciela, pojawiające się na jego powierzchni kompleksy adhezyjne wiążą się z receptorami powierzchniowymi, a wykorzystane we wcześniejszych etapach wsuwania białka mikronem odcinane są za pomocą proteaz serynowych romboidopodobnych.

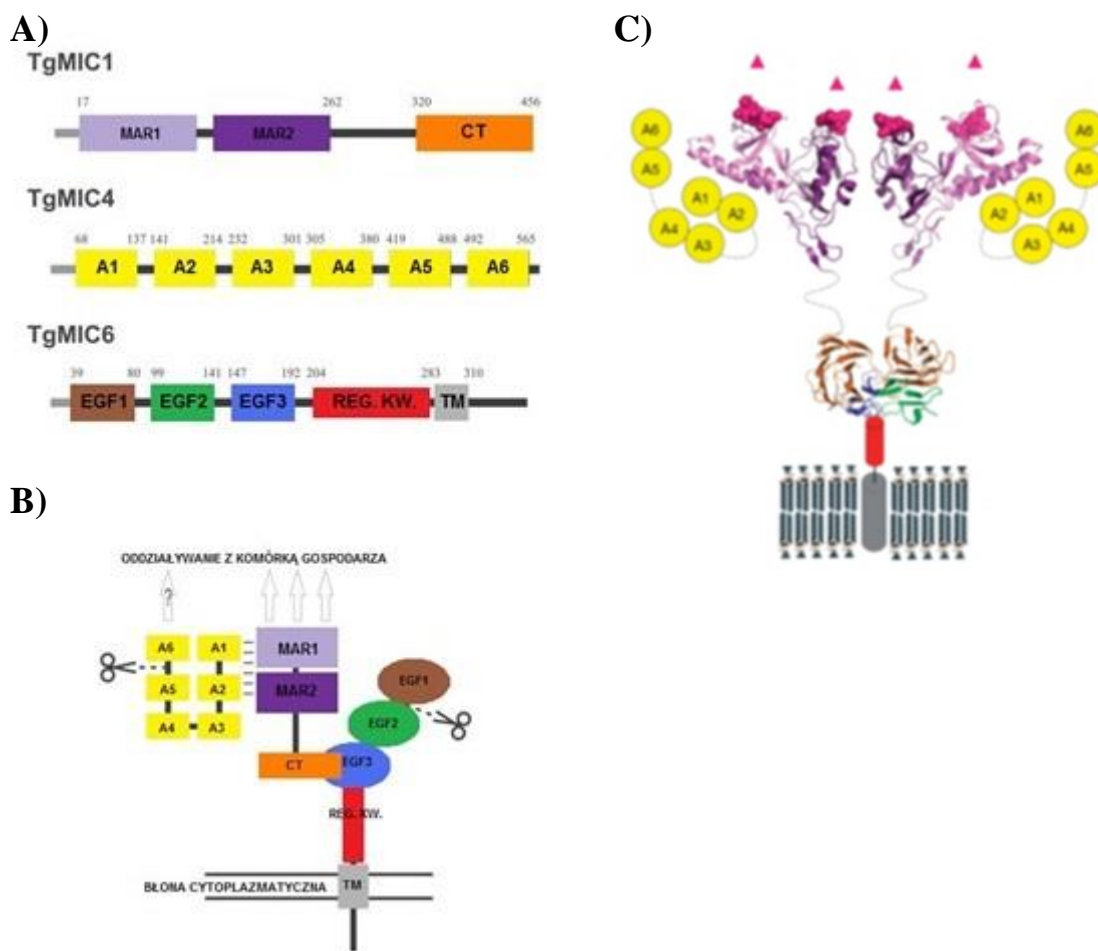


Rys. 7. Schematyczna budowa domenowa kompleksów adhezyjnych *T. gondii*: A) heterotrimeryczny kompleks adhezyjny zbudowany z antygenów MIC6, MIC1 i MIC4; B) kompleks adhezyjny zbudowany z antygenów MIC8 i MIC3; C) heterodimeryczny kompleks zbudowany z antygenów MIC2 i M2AP. Objasnienia: E – domena EGF, MAR – domena powtórzeń adhezyjnych mikronem, A – domena jabłka, L – domena lektynopodobna, I – domena integryno-podobna typu I, M – sześć powtórzeń sekwencji trombospondyno-podobnych, β – domena β -kartki, C – fragment C-końcowy białka, N – fragment N-końcowy białka, Pro i Coil – prodomeny ulegające usunięciu w aparacie Golgiego [Carruthers, 2002].

1.2.3. Antygen MIC1

Rozpuszczalne białko MIC1 o masie cząsteczkowej 49 kDa jest jednym z pierwszych odkrytych białek mikronem [Fourmaux i wsp., 1996]. Wykazano, iż w przypadku braku tego białka zdolność pasożyta do inwazji w głąb komórek żywiciela zostaje znacznie zredukowana [Cerede i wsp., 2005]. Jest to antygen wielofunkcyjny, oddziałujący z innymi białkami mikronem. Stanowi rdzeń prawdopodobnie najważniejszego kompleksu adhezyjnego MIC6-MIC1-MIC4 *T. gondii*. Oprócz wiązania się do receptorów komórkowych białko MIC1 pełni również zasadniczą rolę w tworzeniu i transporcie całego kompleksu na powierzchnię komórki pasożyta. Białko to określane jest mianem laktozo-specyficznej lektyny posiadającej zdolność do wiązania się z receptorami glikoproteinowymi zawierającymi laktozę, znajdującymi się na powierzchni komórek żywiciela [Lourenco i wsp., 2001]. Białko MIC1 (Rys. 8A) zawiera na C-końcu domenę galektyno-podobną, odpowiedzialną za prawidłowe złożenie antygeny oraz stabilizację białka transbłonowego MIC6 o masie 34 kDa. Antygen MIC6 składa się z trzech domen EGF, z których jedna odcinana jest podczas transportu kompleksu adhezyjnego z retikulum endoplazmatycznego poprzez aparat Golgiego do mikronem, zawiera tak zwany region kwaśny oraz domenę transmembranową stanowiącą zakotwiczenie w błonie zewnętrznej pasożyta [Reiss i wsp., 2001]. Do N-końcowej domeny białka MIC1 przyłączane jest białko MIC4 (będące rozpuszczalnym antygenem o masie 61 kDa, bogatym w cysteinę), którego domeny tworzą strukturę tak zwanego jabłka po utworzeniu mostków disiarczkowych.

Ze względu na fakt, iż antygen MIC1 pełni tak zróżnicowane funkcje przeprowadzono wiele badań aby poznać dokładny mechanizm tworzenia i działania kompleksu MIC6-MIC1-MIC4. Badania skupiły się w szczególności na N-końcowych domenach antygeny MIC1. Na początku sądzono, iż są to domeny składające się z sekwencji trombospondyno-podobnych TSP [Fourmaux i wsp., 1996; Reiss i wsp., 2001]. Po kilku latach dokładniejszych badań stwierdzono natomiast, że są to zdegenerowane powtórzenia sekwencji trombospondyno-podobnych typu 1 (TSR1) [Saouros i wsp., 2005]. W świetle badań opublikowanych w 2008 roku przez Sawmynaden i wsp. podaje się, iż N-końcowe domeny MIC1 stanowią zupełnie nowe, charakterystyczne tylko dla typu Apicomplexa struktury, składające się z tandemowych powtórzeń motywów wiążących [Sawmynaden i wsp., 2008]. Tą nową rodzinę domen nazwano powtórzeniami adhezyjnymi białek mikronem (MAR, ang. Micronem Adhesive Repeat) [Blumenschein i wsp., 2007; Hager i Carruthers, 2008; Sawmynaden i wsp., 2008]. Wykazano, iż domeny te posiadają homologię do domen trombospondyno-podobnych, jednakże ważniejszym odkryciem była ich zdolność do wiązania rozgałęzionych węglowodanów posiadających dwa lub więcej terminalnych kwasów sjałowych. Każda z domen MAR w swojej strukturze zawiera beczkę składającą się z pięciu β -nici. W strukturze beczek znajdują się tzw. kieszenie wiążące kwasy sjałowe, co umożliwia wiązanie receptorów powierzchniowych komórek żywiciela. Ponadto sekwencja domen MAR1 i MAR2 jest homologiczna tylko w 27%, natomiast sama budowa przestrzenna jest bardzo podobna. Domeny różnią się między sobą obecnością β -palca na C-końcu MAR2, który prawdopodobnie odpowiada za połączenie białka MIC1 z antygenem MIC4. W roku 2007 przebadano ok. 200 związków zawierających terminalne kwasy sjałowe, które wchodziły w skład receptorów komórkowych [Blumenschein i wsp., 2007]. Wyniki tych badań pozwoliły stwierdzić, że białko MIC1 wykazuje preferencje w szczególności do receptorów komórek nerwowych i komórek budujących istotę szarą mózgu. Tłumaczy to w pewnym stopniu obraz kliniczny choroby w przypadku objawowego zarażenia pasożytem oraz obecność cyst tkankowych w mózgu. Przeprowadzone badania pozwoliły także określić, iż domena MAR1 wykazuje mniejsze powinowactwo do receptorów powierzchniowych w porównaniu z MAR2. Najprawdopodobniej do związania receptorów wymagane są obie domeny MAR lub też kompleks MIC6-MIC1-MIC4 posiada bardziej skomplikowaną budowę niż sądzono do tej pory, jak przedstawiono na Rys. 8C. Stwierdzono ponadto, iż galektyno-podobna domena białka MIC1 może się wiązać zarówno z domeną EGF3 i EGF2 białka MIC6, co oznacza, iż dwa białka MIC1 łączą się z MIC6 [Carruthers, 2002].



Rys. 8. A) Schematyczna budowa domenowa białek MIC1, MIC4 oraz MIC6 *T. gondii* [Carruthers, 2002]. B) Budowa kompleksu adhezyjnego MIC6-MIC1-MIC4 [Carruthers, 2002]. C) Drugi model budowy kompleksu adhezyjnego MIC6-MIC1-MIC4 [Sawmynaden i wsp., 2008].

1.2.4. Antygen MIC3

Adhezyna MIC3 składa się z domeny lektyno-podobnej, pięciu domen EGF częściowo nachodzących na siebie (reszty aminokwasowe 118-159, 147-189, 190-236, 237-290 oraz 262-343) oraz sekwencji wiążącej chitynę (reszty aminokwasowe 83-129). Ponadto białko posiada jedno potencjalne miejsce N-glikozylacji oraz 12 miejsc fosforylacji i jest bogate w reszty cysteiny (34 reszty aminokwasowe), które tworzą mostki disiarczkowe [Cerede i wsp., 2002; Dowse i Soldati, 2004; Striepen i wsp., 2001]. Antygen MIC3 ekspresowany jest jako prekursor homodimeru o wielkości ok. 90 kDa, po proteolitycznym odcięciu N-końcowego fragmentu o wielkości 66 reszt aminokwasowych powstaje dojrzały antygen zbudowany z dwóch monomerów składających się z 329 reszt aminokwasowych połączonych mostkami disiarczkowymi. Antygen MIC3 wchodzi w skład kompleksu adhezyjnego MIC3-MIC8, w którym białko MIC8 pełni funkcję kierującą. Po wydzieleniu kompleksu MIC3-MIC8 z mikronem, kierowany jest on na powierzchnię komórek pasożyta i podobnie jak dwa pozostałe kompleksy adhezyjne mikronem pełni kluczową rolę w procesie inwazji do komórek żywiciela [Cerede i wsp., 2002; Dowse i Soldati, 2004; Soldati i wsp., 2001].

Homodimer MIC3 w kompleksie pełni rolę czynnika wiążącego się z białkami oraz węglowodanami występującymi na powierzchni receptorów komórek żywiciela. Zdolność do wiązania się z takimi receptorami komórkowymi sugeruje, iż pasożyt może wnikać praktycznie do wszystkich komórek żywiciela [Carruthers i Sibley, 1999; Soldati i wsp., 2001].

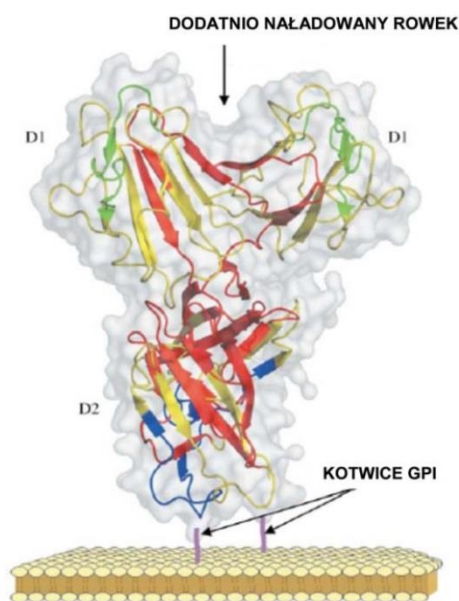
1.2.5. Antygen MAG1

Ważnym antygenem budującym macierz cysty pomiędzy komórkami bradyzoitów oraz jej ścianę jest białko MAG1 (ang. cyst matrix antigen) o masie 65 kDa [Parmley i wsp., 1995]. Natywny antygen MAG1 zawiera peptyd sygnałny zbudowany z 25 reszt aminokwasowych. Białko bogate jest w kwaśne reszty aminokwasowe stanowiące 18% (12% Glu oraz 6% Asp), zawiera również 12% aminokwasów zasadowych (6% Arg oraz 6% Lys). Antygen MAG1 posiada zbudowaną z 36 reszt aminokwasowych wewnętrzną hydrofobową domenę bogatą w reszty proliny. Na podstawie analizy komputerowej określono 12 miejsc fosforylacji oraz 2 miejsca mirystylacji w obrębie sekwencji aminokwasowej białka MAG1. Początkowo ze względu na lokalizację białka sadzono, iż jest to antygen, który można wykorzystać jako marker charakterystyczny dla formy rozwojowej bradyzoitów. Dlatego też szczególną uwagę poświęcono temu antygenowi, jednakże po kilku latach dalszych badań okazało się, że ekspresja genu kodującego białko MAG1 zachodzi na niższym poziomie również w tachyzoitach [Parmley i wsp., 1994]. Uznano, że białko to (w zależności od formy rozwojowej pasożyta) musi ulegać różnym modyfikacjom postranslacyjnym, co potwierdziły wyniki uzyskane po przeprowadzeniu testów Western blotting i testu immunoenzymatycznego ELISA (ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) z wykorzystaniem przeciwciał anti-MAG1. Okazało się bowiem, że w lizacie tachyzoitów znajdują się aż dwie formy tego białka, podczas gdy w ekstrakcie z cyst tkankowych tylko jedna. Obecność antygeny MAG1 u różnych form rozwojowych potwierdziły też badania przeprowadzone w innych ośrodkach naukowych, w których niezależne grupy według różnych schematów klonowały gen *mag1* i wyprodukowały rekombinantowe antygeny MAG1. Przeprowadzone następnie z ich wykorzystaniem testy immunoenzymatyczne zarówno w przypadku surowic od osób z wczesną i przewlekłą fazą choroby dawały wyniki dodatnie, co potwierdzało, iż swoiste przeciwciała anti-MAG1 muszą być syntetyzowane w niedługim czasie od momentu zarażenia danego pacjenta pasożytem [Di Cristina i wsp., 2004; Holec i wsp., 2007; Pfrepper i wsp., 2005].

1.2.6. Antygen SAG1

Antygen SAG1 (P30) jest głównym białkiem powierzchniowym tachyzoitów *T. gondii* należącym do tzw. super-rodziny białek SRS (ang. SAG1-related sequence

proteins) powiązanych z sekwencją SAG1. Wszystkie białka SRS są związane z błoną pasożyta przez kotwicę glikozylofosfatydyloinozytolową oraz charakteryzują się podobieństwem reszt aminokwasowych w granicach od 25-35%, a ich masa cząsteczkowa wynosi od 30-45 kDa [He i wsp., 2002]. Antygen SAG1 ma masę cząsteczkową 30 kDa, zbudowany jest z 336 reszt aminokwasowych, posiada sekwencję sygnałną na N-końcu, która odpowiada za jego lokalizację na powierzchni komórek pasożyta oraz krótki odcinek hydrofobowy na C-końcu [Nagel i Boothroyd, 1989]. Dzięki zawartości 12 reszt cysteiny natywny antygen SAG1 przybiera specyficzną strukturę trzeciorzędową poprzez wytworzenie mostków disiarczkowych, które powodują powstanie immunologicznie istotnych epitopów. Ponadto dzięki badaniom krystalograficznym ustalono, iż antygen SAG1 na powierzchni pasożyta występuje jako dimer (Rys. 9), zbudowany z 2 domen D1 oraz 2 domen D2. N-terminalne domeny (D1) składają się ze 129 reszt aminokwasowych, a C-terminalne domeny (D2) ze 126 reszt aminokwasowych. Domeny D1 i D2 zbudowane są z β -kanapek i pętli złączonych razem przez trzy mostki disiarczkowe. Dwie domeny D1 formują pomiędzy sobą rowek składający się z dodatnio naładowanych reszt aminokwasowych, który stanowi potencjalne miejsce wiązania ujemnie naładowanych proteoglikanów na powierzchni komórek żywiciela (zawierających reszty siarczanowe) np. siarczan heparyny lub czynnik wzrostu fibroblastów [Graille i wsp., 2005; He i wsp., 2002]. Antygen SAG1 odgrywa prawdopodobnie istotną rolę w inwazji pasożyta do komórek żywiciela oraz modulacji zarówno odpowiedzi immunologicznej żywiciela jak i zjadliwości pasożyta. Może również zapewniać pasożytowi ochronę niezbędną do przeżycia w środowisku [Lekutis i wsp., 2001].



Rys. 9. Schematyczna struktura homodimeru białka SAG1. Kolorem zielonym oznaczono fragmenty białka odpowiadające epitopom konformacyjnym, kolorem czerwonym oznaczono fragmenty białka stanowiące rusztowanie cząsteczki, kolorem niebieskim oznaczono fragmenty białka odpowiadające regionom skierowanym w kierunku błony pasożyta [Graille i wsp., 2005].

1.2.7. Antygen SAG2

Antygen SAG2 jest drugim antygenem powierzchniowym pasożyta *T. gondii* należącym do rodziny białek SRS [Jung i wsp., 2004]. W zależności od szczepu oraz formy rozwojowej pasożyta może dochodzić do ekspresji różnych wariantów białka z klastra genów. U tachyzoitów występują formy SAG2A oraz SAG2B, a u bradyzoitów formy SAG2C, SAG2D, SAG2X oraz SAG2Y [Cong i wsp., 2013]. Jednak najistotniejszą występującą formą tego antygeny jest białko SAG2A (P22) zbudowane ze 186 reszt aminokwasowych o masie 22 kDa [Santana i wsp., 2012]. Antygen SAG2A podobnie jak białko SAG1 występuje w formie homodimeru, połączonego za pomocą mostków disiarczkowych, posiada tylko jedną unikalną domenę, wykazującą pewne podobieństwo do domeny D1 antygeny SAG1 [He i wsp., 2002]. Nieuporządkowana sekwencja aminokwasów w obrębie tej domeny tworzy niespotykaną w innych białkach specyficzną pętlę na C-końcu antygeny o wysokim ładunku hydrofobowym, która wynika z obecności w pozycji 134 reszty argininy oraz w pozycji 137 kwasu asparaginowego, odpowiadającą prawdopodobnie za wiązanie do receptorów komórek żywiciela. W związku z w/w właściwościami antygen SAG2A został zakwalifikowany do grupy wewnątrznie nieustrukturyzowanych białek IUP (ang. intrinsically unstructured proteins), które uznawane są za czynniki wirulencji oraz czynniki powodujące występowanie chorób neurodegeneracyjnych, zdolne oddziaływać z różnymi cząsteczkami w komórkach lub na ich powierzchni [Macedo i wsp., 2013]. Antygen posiada również N-terminalną sekwencję sygnałną odpowiedzialną za kierowanie białka na powierzchnię komórki pasożyta oraz jej zakotwiczenie w błonie poprzez wiązanie pomiędzy GPI, a 169 resztą leucyny [Macedo i wsp., 2013]. Antygen SAG2A wspólnie z antygenem SAG1 podczas ostrej fazy choroby uznawane są za najbardziej immunogenne oraz wzbudzają najsilniejszą odpowiedź immunologiczną w obrębie grupy antygenów powierzchniowych. Dlatego też oba te antygeny uznawane są za specyficzne markery wczesnej fazy toksoplazmozy [Cunha-Junior i wsp., 2010; Lekutis i wsp., 2000; 2001].

1.2.8. Antygen ROP1

Antygen ROP1 należy do grupy antygenów roptrii, które pełnią prawdopodobnie kluczową rolę w inwazji pasożyta do komórek żywiciela. Antygen ROP1 o masie 61 kDa zbudowany jest z 396 reszt aminokwasowych, występuje u tachyzoitów, bradyzoitów oraz sporozoitów [Garcia i wsp., 2004]. Antygen ROP1 zaliczany jest do grupy antygenów wydalniczo-wydzielniczych ESA. Białko ROP1 należy do I klasy antygenów roptrii i bierze udział we wczesnej fazie procesu inwazji pasożyta do komórek żywiciela. O czym świadczy fakt, iż jest wydzielany do wnętrza formującej się wakuoli pasożytniczej podczas wnikania pasożyta do komórek żywiciela, po czym w ciągu kilku godzin od inwazji jego wydzielanie zostaje zahamowane [Bradley

i Boothroyd, 1999; 2001; Bradley i wsp., 2002; Saffer i wsp., 1992; Soldati i wsp., 1995; 1998]. Antygeny z grupy ESA podczas wydzielania z organelli ulegają proteolitycznej obróbce poprzez odcięcie propeptydu sygnałowego. W przypadku białka ROP1 ma to miejsce na N-końcu antygeny, pomiędzy 83 resztą kwasu glutaminowego, a 84 resztą alaniny [Bradley i Boothroyd, 1999]. Powstały w ten sposób dojrzały antygen ROP1 posiada charakterystyczny asymetryczny ładunek, wynikający z tandemowych ośmioaminokwasowych powtórzeń bogatych w reszty kwasu glutaminowego oraz proliny [Soldati i wsp., 1998]. Miejsca te odpowiadają prawdopodobnie za heterotypowe oddziaływania z innymi białkami. Wcześniejsze badania pokazały, iż wykorzystanie fragmentów antygeny ROP1 do konstrukcji szczepionek DNA (ang. deoxyribonucleic acid) indukuje ochronną odpowiedź immunologiczną. Antygen ROP1 jest również uznawany za specyficzny marker pozwalający na różnicowanie wczesnej i przewlekłej toksoplazmozy [Bradley i Boothroyd, 2001; Holec-Gąsior i wsp., 2009; Soldati i wsp., 1998].

1.2.9. Antygeny granul o dużej gęstości GRA1, GRA2 i GRA6

Grupa antygenów granul o dużej gęstości GRA, charakteryzuje się stosunkowo małą masą cząsteczkową białek w zakresie od 21-41 kDa [Cortez i wsp., 2008]. Wszystkie białka GRA wydzielane przez pęcherzyki granul o dużej gęstości należą do grupy antygenów ESA oraz pełnią ważną rolę w modyfikacjach strukturalnych wakuoli pasożytniczej, w której rozwija się pasożyt *T. gondii*, w szczególności w budowie wewnętrznej sieci mikrotubul MNN (ang. membranous nanotubular network) oraz membrany wakuoli pasożytniczej PVM (ang. parasitophorous vacuole membrane). Antygeny z grupy GRA stanowią rodzinę białek o nietypowej budowie. Wraz z rozwojem technik stosowanych w biologii molekularnej pojawiają się kolejne doniesienia na temat proponowanych struktur poszczególnych antygenów należących do tej rodziny oraz pełnionych przez nich funkcji.

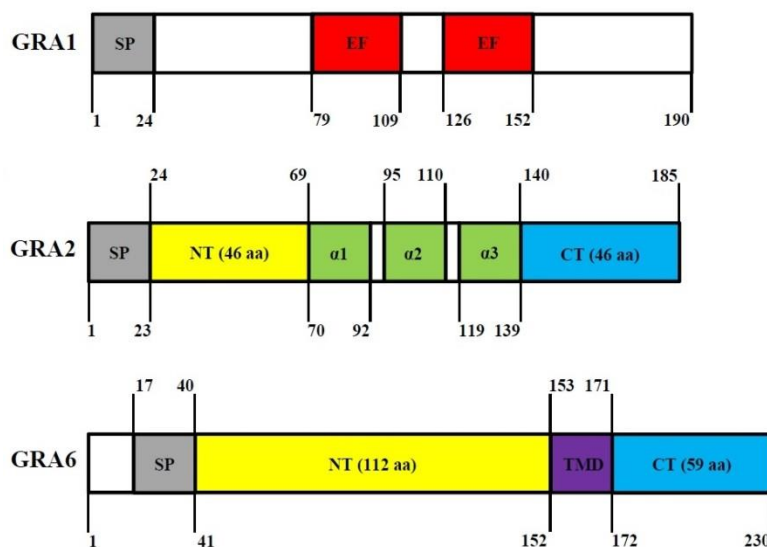
Antygen GRA1 (P24) o masie 24 kDa zbudowany jest z 190 reszt aminokwasowych i występuje zarówno u tachyzoitów jak i bradyzoitów. Białko GRA1 zawiera dwie domeny EF dłoni (ang. EF hand domain), które składają się z α -helisy(E)-pętli- α -helisy(F) pomiędzy resztami aminokwasowymi 79-109 oraz 126-152 (Rys. 10), które są odpowiedzialne za wiązanie jonów Ca^{2+} równomiernie wewnątrz całej wakuoli pasożytniczej. Antygen GRA1 może wpływać na wzrost stężenia jonów Ca^{2+} i modulować wewnątrzkomórkowe uwalnianie tych jonów, co sugeruje jego ważną rolę fizjologiczną w inwazji do komórek żywiciela [Cesbron-Deleuw i wsp., 1989; Coppens i wsp., 1999; Lin i wsp., 2010]. Białko GRA1 bierze udział w budowie wewnętrznej sieci mikrotubul MNN oraz membrany wakuoli pasożytniczej PVM [Cesbron-Deleuw i wsp., 1989; Coppens i wsp., 1999]. Oprócz wcześniej opisanych funkcji antygen GRA1 związany jest również z silną stymulacją układu odpornościowego żywiciela,

obecność w sekwencji białka epitopów rozpoznawanych przez limfocyty B sugeruje, iż antygen ten może być wykorzystany jako składnik potencjalnej szczepionki przeciwko toksoplazmozie oraz jako marker przewlekłej fazy choroby [Beghetto i wsp., 2001; Cesbron-Deleuw i wsp., 1989].

Antygen GRA2 o masie 28 kDa zbudowany jest ze 185 reszt aminokwasowych. Początkowo twierdzono, iż antygen GRA2 posiada 23 aminokwasowy, hydrofobowy peptyd sygnałny, dwie amfipatyczne α -helisy pomiędzy resztami aminokwasowymi 69-87 oraz 99-116 otoczone hydrofilowymi domenami zbudowanymi z 46 i 69 reszt aminokwasowych odpowiednio na N- i C-końcu [Mercier i wsp., 1993; 1998; Parmley i wsp., 1993; Sibley i wsp., 1995]. W świetle najnowszych badań przypuszcza się, iż zbudowany jest z trzech amfipatycznych α -helis pomiędzy resztami aminokwasowymi 70-92, 95-110 oraz 119-139 otoczonych hydrofilowymi domenami zbudowanymi z 46 reszt aminokwasowych zarówno na N- i C-końcu (Rys. 11) [Travier i wsp., 2008]. Uzyskane wyniki wskazują na nietypową budowę białka GRA2, amfipatyczne α -helisy występują powszechnie w białkach na N- lub C-końcu, w przypadku antygeny GRA2 są zlokalizowane w centralnej części. Posiadające dodatni ładunek amfipatyczne α -helisy obecne w białku GRA2 odpowiedzialne są prawdopodobnie za wiązanie ujemnie naładowanych fosfolipidów [Trevier i wsp., 2008]. Antygen GRA2 bierze udział w budowie wewnętrznej sieci mikrotubul MNN, która rozciąga się w świetle wakuoli pasożytniczej i odpowiada za stabilne połączenia komórek pasożyta z membraną wakuoli pasożytniczej PVM [Mercier i wsp., 1993; 1998; Sibley i wsp., 1995]. Prawdopodobnie tworzy z innymi antygenami granul kompleks białkowy GRA2-GRA4-GRA6, który buduje sieć mikrotubul MNN [Labruyere i wsp., 1999; Mercier i wsp., 2005]. Przypuszcza się, iż kompleks jest stabilizowany przez hydrofobowy charakter niektórych domen białek GRA2 i GRA6 oraz zdolność antygeny GRA4 do interakcji typu białko-białko. Wykazano, iż wprowadzenie mutacji w genie *gra2* w obrębie sekwencji kodujących poszczególne α -helisy limituje zdolność antygeny do tworzenia wewnętrznej sieci mikrotubul MNN, co może wpływać na zdolność pasożyta do dalszej inwazji [Travier i wsp., 2008].

Antygen GRA6 o masie 32 kDa zbudowany jest z 230 reszt aminokwasowych. Białko GRA6 posiada nietypową budowę, ponieważ hydrofobowy peptyd sygnałny nie jest zlokalizowany na samym N-końcu antygeny, znajduje się dopiero pomiędzy 17-40 resztą aminokwasową, hydrofobowa domena transmembranowa zawiera się między 153-171 resztą aminokwasową i otoczona jest dwoma hydrofilowymi regionami zbudowanymi z 112 i 59 reszt aminokwasowych odpowiednio na N- i C-końcu (Rys. 11). C-koniec antygeny bogaty jest w reszty glicyny (24%) i prawdopodobnie wpływa na funkcje strukturalne białka [Labruyere i wsp.; 1999, Lecordier i wsp., 1995]. Antygen GRA6 odpowiada za wiązanie się z membraną wakuoli pasożytniczej PVM oraz bierze udział w budowie wewnętrznej sieci mikrotubul MNN [Gendrin i wsp.,

2010]. Wykazano, iż nokaut genu *gra6* powoduje zmiany wewnętrznej sieci mikrotubul MNN, co sugeruje, że pełni on ważną rolę w modyfikacjach wewnątrz wakuoli pasożytniczej [Mercier i wsp., 2002]. Prawdopodobnie antygen GRA2 inicjuje powstawanie wewnętrznej sieci mikrotubul MNN, antygen GRA6 odpowiada za jej stabilizację, a oddziałujący z powyższymi białkami antygen GRA4 tworzy multimeryczny kompleks GRA2-GRA4-GRA6, który może brać udział w transporcie składników odżywczych oraz białek wewnątrz wakuoli pasożytniczej PV [Labruyere i wsp., 1999; Mercier i wsp., 2005].



Rys. 10. Schematyczne przedstawienie prawdopodobnej budowy antygenów GRA1, GRA2 oraz GRA6. Skróty: SP- peptyd sygnałowy; EF – domena EF dłoni; NT- region/domena N-końcowa; CT- region/domena C-końcowa; $\alpha 1$ - $\alpha 3$ – amfipatyczne α -helisy; TMD – domena transmembranowa [na podstawie Cesbron-Deleuw i wsp., 1989, Travier i wsp., 2008, Lecordier i wsp., 1995].

1.3. Toksoplazmoza u ludzi

1.3.1. Epidemiologia

Zarażenie *T. gondii* jest szeroko rozpowszechnione na całym świecie, zarówno w przypadku ludzi jak i zwierząt. Częstość występowania zarażenia jest uzależniona między innymi od regionu geograficznego, zwyczajów żywieniowych oraz warunków sanitarnych. Szacuje się, iż od 25-30% populacji świata jest zarażona *T. gondii* [Montoya i Liesenfeld, 2004]. W Stanach Zjednoczonych zarażonych jest od 20-30% populacji ludzkiej, 25% w Japonii, 60% w Holandii i Włoszech, 50% we Francji, 35% w Finlandii i od 50-60% w Polsce [Śpiewak i Małafiej, 1996; Umiński i wsp., 1994].

Człowiek zaraża się pasożytem najczęściej drogą pokarmową, poprzez spożycie surowego lub niedogotowanego mięsa zawierającego cysty tkankowe, czy też jedzenie nieumytych warzyw i owoców zanieczyszczonych kałem kota, w którym znajdują się oocysty. Niebezpieczeństwo stanowi także picie niepasteryzowanego mleka oraz zanieczyszczonej wody. Transmisja pasożyta może zająć również drogą łóżyskową, kiedy matka przekazuje do płodu tachyzoity obecne w leukocytach krwi pępowinowej.

Do innych dróg zarażenia, zaliczyć można przeszczepy narządów oraz transfuzję krwi od dawców, którzy są żywicielami pasożyta, człowiek zarazić może się również poprzez otwarte rany, np. podczas prac polowych lub w czasie prac z materiałem zakaźnym.

1.3.2. Podział toksoplazmozy

Toksoplazmozie nie towarzyszą charakterystyczne objawy pozwalające na szybkie i jednoznaczne postawienie diagnozy na podstawie obrazu klinicznego.

Ze względu na przyjęte kryteria toksoplazmozę dzieli się na odpowiednie jednostki chorobowe [Kruszewski i Miller, 2004]:

- moment zarażenia – wrodzona, nabyta;
- przebieg choroby – ostra, podostra, przewlekła, utajona;
- objawy kliniczne – bezobjawowa, objawowa w okresie narastania objawów, objawowa w okresie cofania się objawów;
- sposób zarażenia – pierwotna, nawrotowa;
- umiejscowienie zmian patologicznych – narządowa, układowa, uogólniona.

1.3.3. Objawy kliniczne toksoplazmozy

Obraz kliniczny toksoplazmozy może charakteryzować się objawami o różnym stopniu nasilenia, co w głównej mierze zależy od zjadliwości szczepu *T. gondii* i sposobu zarażenia oraz od zdolności do wywołania odpowiedzi humoralnej i komórkowej przez pobudzony układ immunologiczny. U osób z prawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym zarażenie przebiega zazwyczaj bezobjawowo. U niektórych pacjentów pojawiają się objawy typowe dla przeziębienia tzn. powiększenie węzłów chłonnych, bóle mięśni, gorączka i ogólne osłabienie. Choroba stanowi natomiast poważne zagrożenie dla osób z niedoborami odporności, w szczególności dla pacjentów poddanych transplantacji narządów, w przebiegu chorób nowotworowych, u chorych na AIDS lub u osób przyjmujących leki immunosupresyjne. W tych przypadkach objawy chorobowe to najczęściej skutek reaktywacji latentnego zarażenia. Do najczęstszych objawów toksoplazmozy u osób z obniżoną odpornością zalicza się gorączkę i silne bóle głowy, zapalenie płuc, zapalenie mięśnia sercowego, zapalenie spojówek lub naczyńówki, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie mięśni szkieletowych oraz uszkodzenia układu nerwowego [Paul, 2004].

Największe zagrożenie toksoplazmoza stanowi jednak dla kobiet w ciąży. Pierwotne zarażenie pasożytem u kobiet tuż przed zapłodnieniem lub w czasie trwania ciąży wiąże się z dużym ryzykiem przejścia tachyzoitów poprzez łożysko do płodu. W zależności od zaawansowania ciąży może to się wiązać z różnymi skutkami, zarażenie w pierwszym trymestrze wywołuje najczęściej poronienie lub przedwczesny

poród noworodka z uogólnioną toksoplazmozą przypominającą posocznicę bakteryjną. Do innych objawów toksoplazmozy wrodzonej wywołanej na skutek zarażenia pasożytem w pierwszym tryestrze zalicza się zajęcie ośrodkowego układu nerwowego tj. zapalenie mózgu, rdzenia kręgowego, mózgowie porażenie dziecięce, wodogłowie, małogłowie, zwapnienia wewnątrzczaszkowe, zaburzenia napięcia mięśniowego, zapalenie siatkówki i naczyńówki i opóźnienie w rozwoju psychoruchowym. Zarażenie pasożytem w późniejszych tryestrach prowadzi najczęściej do przyjścia na świat dziecka z wrodzoną toksoplazmozą, bez widocznych bezpośrednio objawów choroby. U niektórych noworodków stwierdza się tak zwaną triadę Sabina–Pinkertona (wodogłowie i małogłowie, zapalenie siatkówki i naczyńówki, zwapnienie śródmózgowe), u innych obserwuje się mózgowie porażenie dziecięce, powiększenie śledziony i wątroby. U dzieci z wrodzoną toksoplazmozą mimo, iż na początku w większości przypadków nie występują żadne objawy w późniejszym wieku stwierdza się uszkodzenia narządu wzroku i słuchu lub upośledzenie umysłowe [Paul, 2005].

1.4. Toksoplazmoza u zwierząt

1.4.1. Epidemiologia

Toksoplazmoza jest jednostką chorobową stanowiącą duże ryzyko dla ludzi, a jedną z głównych dróg transmisji pasożyta do organizmu człowieka jest spożywanie niedogotowanego lub surowego mięsa, a także nieodpowiednio przetworzonych produktów mlecznych pochodzących od zwierząt hodowlanych. Mimo, iż na terenie Unii Europejskiej zgodnie z dyrektywą 2003/99/EC powinno się monitorować sytuację epidemiologiczną chorób pasożytniczych u zwierząt hodowlanych, w wielu krajach nie ma regulacji prawnych, które narzucałyby kontrolę nad częstością występowania zarażenia *T. gondii* [Kijlstra i Jongert, 2009]. Z racji możliwości zarażenia szerokiego rezerwuaru zwierząt stałocięplnych toksoplazmoza stanowi również poważny problem weterynaryjny. Jest uważana za jedną z głównych przyczyn strat reprodukcyjnych w hodowli zwierząt w szczególności owiec, kóz, bydła oraz trzody chlewnej. Ryzyko występowania wspomnianej choroby u zwierząt jest praktycznie identyczne jak u ludzi i uwarunkowane jest głównie sposobem odżywiania, regionem geograficznym, jak również warunkami sanitarnymi w jakich bytują zwierzęta oraz typem hodowli. Spośród zwierząt hodowlanych cysty tkankowe *T. gondii* wykrywa się najczęściej u owiec, kóz, bydła i świń oraz z mniejszą częstotliwością u drobiu, królików i koni [Tenter i wsp., 2000]. Najczęstszym źródłem zarażenia dla zwierząt są sporulujące oocysty, które dostają się do środowiska bytowania zwierząt wraz z fekaliami zarażonego kota, bądź poprzez pożywienie lub wodę. Siano, słoma oraz zboże zanieczyszczone odchodami kota, które często stanowią zarówno źródło pokarmu jak

i ściółkę chlewną stanowią prawdopodobnie główne źródło zarażenia dla wielu zwierząt hodowlanych.

Koty ze względu na fakt, iż są żywicielami ostatecznymi pasożyta *T. gondii* stanowią interesującą grupę zwierząt do badań przesiewowych. Odsetek zarażonych kotów na całym świecie różni się w zależności od wieku, środowiska życia oraz rodzaju bytowania kota. W Stanach Zjednoczonych w największym badaniu diagnostycznym dotyczącym tej grupy zwierząt stwierdzono obecność swoistych przeciwciał przeciwko *T. gondii* u 31% badanej populacji [Dubey i Jones, 2008]. W porównaniu z krajami europejskimi, odsetek seropozytywnych kotów w USA jest niższy niż odnotowany np. we Francji - 43%, Szwecji - 42% czy Turcji - 43%. Porównywalne wyniki otrzymano we Włoszech - 9-33%, natomiast najwyższe odnotowano w Republice Czeskiej - 59%, Słowenii - 57% i w Niemczech - 34-51% [Sroka i wsp., 2007]. W badaniach serodiagnostycznych przeprowadzonych w Polsce na terenie Lubelszczyzny w 2007 roku stwierdzono obecność swoistych przeciwciał antytoksoplazmowych u 50,9% populacji badanych kotów [Sroka i wsp., 2007]. We wcześniejszych latach podobną seroprewalencję dla całego kraju wykazano w 2002 roku - 52,5% [Śmiełowska-Łoś i Pacoń, 2002], natomiast najwyższy odsetek wyników dodatnich na poziomie 70,6% odnotowano w 2004 roku [Michalski i Platt-Samoraj, 2004].

W wielu krajach mięso świń, należy do najczęściej spożywanych przez człowieka, w związku z tym wieprzowina zawierająca cysty tkankowe pasożyta może stanowić potencjalne źródło zarażenia. Szacuje się, iż średnia seroprewalencja toksoplazmozy u świń wynosi od 10-20% [Dubey, 2009a], jednakże częstość występowania pasożyta u osobników należących do tego gatunku zwierząt w poszczególnych krajach europejskich waha się od 0-64% [EFSA, 2007; Tenter i wsp., 2000]. W badaniach epidemiologicznych przeprowadzonych w Polsce obecność swoistych przeciwciał antytoksoplazmowych stwierdzono u 19,2% badanej populacji świń [Holec-Gąsior i wsp., 2010].

Spośród zwierząt, których mięso jest spożywane przez człowieka, owce są najbardziej podatne na zarażenie pierwotniakiem. Na świecie prowadzono wiele badań, mających na celu analizę czynników ryzyka związanych z występowaniem przeciwciał antytoksoplazmowych u owiec. Badania z Serbii pokazują, że u zwierząt hodowlanych w dużych stadach odnotowano więcej wyników seropozytywnych w porównaniu ze zwierzętami z małych, przydomowych gospodarstw [Dubey, 2009b]. W Europie średnia seroprewalencja toksoplazmozy u owiec oszacowana została na 35,9%, niemniej jednak częstość występowania w poszczególnych krajach waha się od 4-92% [EFSA, 2007; Tenter i wsp., 2000]. Według badań epidemiologicznych przeprowadzonych w Polsce, odsetek owiec zarażonych pasożytem wynosi ok. 50% [Górecki i wsp., 2008].

Spożycie koniny stanowi istotną część tradycji kulinarnych w krajach Azji Środkowej, Ameryki Południowej, a także w niektórych krajach Europy, takich jak

Francja i Włochy. Najczęściej świeżą koninę spożywa się pod postacią japońskiego basashi, włoskiego carpaccio czy tataru. W związku z powyższym jedzenie surowego końskiego mięsa stanowi potencjalne źródło transmisji pasożyta dla człowieka. W Europie średnia seroprewalencja toksoplazmozy u koni oszacowana została na 25,8%, niemniej jednak częstość występowania w poszczególnych krajach waha się od 0-80% [Tassi, 2007].

1.4.2. Objawy toksoplazmozy u zwierząt

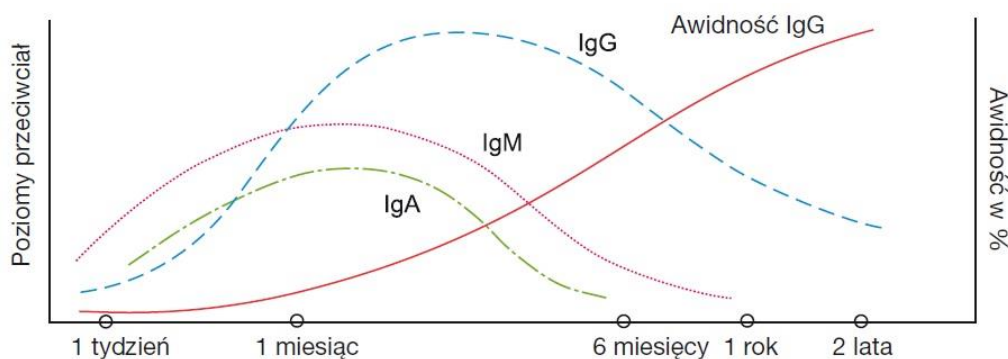
U zwierząt inwazja pierwotniaka *T. gondii* w wielu przypadkach przebiega bezobjawowo, a jedynym potwierdzeniem przebytego zarażenia jest obecność swoistych przeciwciał anti-*T. gondii*. Jeśli jednak objawy związane z toksoplazmozą występują, to najczęściej są niespecyficzne, np. brak apetytu, biegunka, wymioty, a także znaczny spadek masy ciała i osłabienie. Najpoważniejsze konsekwencje zarażenia obserwowane są u owiec, kóz, świń oraz bydła. Toksoplazmoza u tych zwierząt może nieść poważne konsekwencje kliniczne związane w szczególności z możliwościami reprodukcyjnymi. Analogicznie jak u człowieka, u ciężarnych zwierząt pasożyt może zostać przekazany od matki do płodu, co najczęściej prowadzi do ronień. We wczesnym okresie ciąży, połknięcie oocyst i rozwój pierwotnego zarażenia u ciężarnych samic, skutkuje najczęściej obumarciem embrionu, jego rozłożeniem i wchłonięciem wewnątrz macicy. W tej fazie ciąży oprócz poronień może również dochodzić do mumifikacji płodowej. Zwierzęta zarażone w późniejszych etapach ciąży mogą mieć słabsze potomstwo, młode mogą przetrwać, ale również umrzeć w ciągu kilku tygodni po porodzie. Ponadto, mogą się urodzić osobniki niezdolne do samodzielnego przyjmowania pokarmu. Niektóre dorosłe zwierzęta po zarażeniu w okresie ciąży mogą stać się niezdolne do dalszej reprodukcji [Buxton, 1998].

Niepożądane skutki zarażenia pasożytem można łatwo zobrazować na hodowli owiec, która jest bardzo istotna dla ekonomii wielu krajów, przede wszystkim ze względu na produkcję wełny owczej. Należy podkreślić, iż wełna owiec zarażonych pierwotniakiem znacznie traci na jakości w porównaniu z wełną zdrowych zwierząt. Toksoplazmoza stanowi przyczynę strat ekonomicznych dla hodowców owiec, także ze względu na spontaniczne roniecia u chorych, ciężarnych samic, czego bezpośrednią konsekwencją są straty liczebności owiec w danym stadzie. W 2003 roku odnotowano, że na terenie 15 krajów należących do Unii Europejskiej prowadzono hodowle 86 mln owiec, z czego $\frac{3}{4}$ w Wielkiej Brytanii, Hiszpanii, Włoszech i Francji. Badania wykazały, że w Wielkiej Brytanii choroba ta jest odpowiedzialna za 1-2% śmierci nowonarodzonych jagniąt rocznie. Rozprzestrzenienie niniejszej choroby sięga wielu krajów, a w roku 2003 stanowiła przyczynę ponad 1,25 milionów strat w hodowli owiec w krajach Unii Europejskiej [Dubey, 2009b].

1.5. Diagnostyka toksoplazmozy

1.5.1. Wykrywanie przeciwciał antytoksoplazmowych u ludzi

Właściwe zdiagnozowanie zarażenia *T. gondii* oraz fazy choroby ma szczególne znaczenie w przypadku kobiet w ciąży, płodów, noworodków z wrodzoną toksoplazmozą oraz osób z obniżoną odpornością. Wykorzystywane do tego celu testy opierają się głównie na określeniu miana przeciwciał klasy IgG i IgM oraz awidności przeciwciał klasy IgG (Rys. 11).



Rys. 11. Dynamika poziomów przeciwciał klasy IgA, IgM, IgG oraz wzrostu awidności przeciwciał IgG [www.abbottdiagnostics.pl].

Pierwszymi przeciwciałami pojawiającymi się w krwiobiegu w drugim tygodniu od momentu zarażenia są przeciwciała klasy IgM, których miano wzrasta przez następne cztery tygodnie [Lipska i wsp., 2000]. Przeciwciała te utrzymują się przez około cztery miesiące, po czym zanikają. Obecność przeciwciał tej klasy wskazuje w większości przypadków na wczesną fazę toksoplazmozy [Bessieres i wsp., 1992; Bitkowska i wsp., 1996]. U niektórych pacjentów immunoglobuliny IgM mogą jednak utrzymywać się w surowicy nawet przez kilkadziesiąt miesięcy od momentu pierwotnego zarażenia [Camargo i Leser, 1976].

W krążeniu po ok. 3-4 tygodniach od momentu zarażenia pojawiają się przeciwciała klasy IgG, których miano gwałtownie wzrasta przez następne dwa miesiące. Po tym okresie poziom przeciwciał IgG powoli spada przez kilka lat, po czym niskie miano przeciwciał utrzymuje się w krążeniu do końca życia [Nichthauser-Chajęcka, 1999; Pfrepper i wsp, 2005].

Na podstawie korelacji pomiędzy mianem przeciwciał IgM i IgG można ustalić w niektórych przypadkach fazę choroby np. dodatni wynik dla przeciwciał klasy IgM oraz wzrastający przy kolejnych badaniach poziom przeciwciał IgG może wskazywać na wczesną fazę choroby. Jednakże w większości przypadków konieczne jest przeprowadzenie dodatkowych testów na obecność przeciwciał klasy IgA lub/i IgE lub też wymagane jest określenie awidności przeciwciał IgG (co jest bardziej powszechne w rutynowej diagnostyce choroby). Przeciwciała IgA i IgE pojawiają się w ustroju mniej więcej w tym samym czasie co przeciwciała IgM, jednakże ich wykrycie wymaga

zastosowania bardzo czułych testów, które w niektórych przypadkach i tak nie pozwalają na poprawne zdiagnozowanie fazy choroby [Bitkowska i wsp., 1996; Sobieszkańska i wsp., 1997]. Test oznaczający awidność przeciwciał IgG określa siłę wiązania kompleksów antygen-przeciwciało, która wraz z rozwojem choroby wzrasta [Inouye i wsp., 1984; Radkowski i wsp., 1996]. Metoda ta pozwala na jednoznaczne określenie fazy choroby, w odniesieniu do wyników testów na obecność przeciwciał klasy IgM i IgG [Ashburn i wsp., 1998; Lappalainen i Hedman, 2004; Sobieszkańska, 2002]. Zaletą oznaczania awidności jest również możliwość poznania przybliżonego momentu zarażenia.

1.5.2. Metody wykorzystywane w diagnostyce toksoplazmozy

Główną rolę w diagnostyce toksoplazmozy odgrywają testy pośrednie, opierające się na badaniach serologicznych, pozwalające wykryć przeciwciała poszczególnych klas. Testy takie powinny charakteryzować się wysoką czułością i swoistością, uzyskiwaniem powtarzalnych wyników oraz prostotą wykonania. Pierwszym zastosowanym w diagnostyce toksoplazmozy testem był opracowany przez Sabina i Feldmana w 1948 roku tak zwany odczyn barwny DT (ang. dye test) [Sabin i Feldman, 1948]. Mimo wysokiej specyficzności i czułości, jest on obecnie stosowany tylko jako test referencyjny – głównie ze względu na ograniczenie jakim jest brak zdolności do różnicowania klas przeciwciał. Obecnie w diagnostyce toksoplazmozy wykorzystuje się głównie testy immunoenzymatyczne, z których najbardziej rozpowszechniony jest test ELISA. Stosowane do serodiagnostyki toksoplazmozy testy zostały zebrane w tabeli 2.

Tab. 2. Charakterystyka testów stosowanych w serodiagnostyce toksoplazmozy [Sroka i Ziomko, 2008].

METODA	ZALETY	WADY
Test barwny Sabina-Feldmana (antygen żywy)	<ul style="list-style-type: none"> • metoda referencyjna • wykrywanie wczesnych przeciwciał • wysoka czułość i swoistość • powtarzalność wyników 	<ul style="list-style-type: none"> • brak różnicowania klas przeciwciał • konieczność pracy z żywym pasożytem • konieczność stosowania świeżego dopełniacza
Odczyn immunofluorescencji pośredniej (antygen utrwalony formaliną)	<ul style="list-style-type: none"> • metoda referencyjna • wykrywanie specyficznych przeciwciał • możliwość ustalenia miana przeciwciał • wykrywanie klas przeciwciał • powtarzalność wyników 	<ul style="list-style-type: none"> • konieczność posiadania mikroskopu • wizualne odczytywanie wyników • możliwość reakcji krzyżowych
Odczyn wiązania dopełniacza (antygen cytoplazmatyczny)		<ul style="list-style-type: none"> • konieczność porównania z innymi testami • czułość uzależniona od odczynników • trudne wykonanie
Odczyn hemaglutynacji biernej (antygen somatyczny)	<ul style="list-style-type: none"> • mała wrażliwość na przeciwciała naturalne 	<ul style="list-style-type: none"> • negatywne wyniki w przypadku toksoplazmozy wrodzonej • brak możliwości różnicowania klas przeciwciał • niespecyficzność w przypadku niskiego miana przeciwciał
Odczyn aglutynacji bezpośredniej (antygen utrwalony formaliną)	<ul style="list-style-type: none"> • wysoka czułość i swoistość • wykrywanie przeciwciał klasy IgG i IgM • prostota wykonania • niski koszt 	<ul style="list-style-type: none"> • wysokie miano IgG może maskować obecność IgM • konieczność stosowania 2-merkaptetanolu wiążącego przeciwciała naturalne i IgM
Odczyn aglutynacji lateksowej (antygen cytoplazmatyczny)	<ul style="list-style-type: none"> • prostota wykonania 	<ul style="list-style-type: none"> • brak możliwości różnicowania klas przeciwciał
Test aglutynacja immunoabsorpcyjnej ISAGA (antygen utrwalony formaliną)	<ul style="list-style-type: none"> • wykrywanie swoistych przeciwciał klas IgA; IgM; IgE • wykorzystanie adsorpcji przeciwciał 	<ul style="list-style-type: none"> • odczyt wizualny • konieczność odpowiedniego przygotowania antygeny
Test ELISA (antygen cytoplazmatyczny; błonowy)	<ul style="list-style-type: none"> • ilościowe i jakościowe oznaczanie przeciwciał i antygenów w materiale biologicznym • wysoka czułość i specyficzność • wykrywanie przeciwciał wszystkich klas • automatyzacja 	<ul style="list-style-type: none"> • konieczność posiadania odpowiedniej aparatury • jakość testu zależy od przygotowania antygeny
Test ELFA (antygen cytoplazmatyczny; błonowy)	<ul style="list-style-type: none"> • wysoka czułość i swoistość • wykrywanie przeciwciał wszystkich klas • możliwość porównania surowicy matki i surowicy z krwi pępowinowej • automatyzacja 	<ul style="list-style-type: none"> • konieczność posiadania odpowiedniej aparatury • konieczność kalibracji aparatury

Druga grupa przeprowadzanych badań opiera się na metodach bezpośrednich, wykrywających głównie komórki pasożyta, bądź jego DNA. Obecność pasożyta można wykryć w badaniach mikroskopowych preparatów barwionych metodą May-Grunwalda lub Giemsy. Jednakże, ze względu na niewielką liczbę komórek pasożyta w preparatach mikroskopowych testy te mają małe znaczenie diagnostyczne. Częściej wykorzystuje

się metody immunofluorescencyjne z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych oraz metody immunohistochemiczne, np. reakcja z kompleksem peroksydaza-antyperoksydaza (PAP, ang. peroxidase anti-peroxidase complex) lub fosfataza alkaliczna-antyalkaliczna fosfataza (APAAP, ang. alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase complex) [Walochowa i Dzbeński, 1989]. Czułą metodą pozwalającą na wykrycie pasożyta jest tak zwana próba biologiczna; która polega na zarażeniu myszy podejrzanym materiałem biologicznym. Po upływie od 3 do 60 dni identyfikuje się pasożyta na podstawie analizy wysięku otrzewnego, narządów wewnętrznych lub mózgowia zarażonych myszy. Obecność pasożyta stwierdza się bezpośrednio w hodowlach tkankowych ludzkich fibroblastów płodowych MRC5 (ang. Medical Research Council cell 5) oraz linii monocytów THP (ang. Human acute monocytic leukemia cell line) zarażonych badanym materiałem biologicznym. Kolejnym z badań jest wykrywanie tak zwanego antygeny krążącego *T. gondii*; który jest niezależny od obecności i klasy swoistych przeciwciał; pojawia się on głównie podczas pierwotnego zarażenia; ale również podczas reaktywacji i utrzymuje się przez okres od 2-3 tygodni. Antygen krążący wykrywa się metodami immunoenzymatycznymi, technikami immunoelektroforezy, podwójnej dyfuzji w żelu i metodą Western blotting. W diagnostyce toksoplazmozy u ludzi wykorzystywane są także badania obrazowe takie jak USG (ang. ultrasonography), RTG (ang. roentgenography), tomografia komputerowa, angiografia fluoresceinowa, pozwalające na wykrycie ognisk zwapnień oraz zmian patologicznych w narządach wewnętrznych oraz mózgu. Coraz szersze zastosowanie w diagnostyce toksoplazmozy mają narzędzia biologii molekularnej wykorzystujące reakcję łańcuchową polimerazy PCR (ang. polymerase chain reaction) oraz metody hybrydizacyjne ze specyficznymi sondami. Są to metody charakteryzujące się wysoką czułością i specyficznością, pozwalające określić nawet szczep *T. gondii*, który wywołał zarażenie. Jednak metody te wymagają odniesienia się do wyników innych testów diagnostycznych ze względu na brak możliwości stwierdzenia czy wykryty materiał genetyczny pochodzi od pasożytów odpowiedzialnych za pierwotną toksoplazmozę, czy też inwazję w wyniku reaktywacji latentnego zarażenia [Gołąb, 1995].

1.6. Antygeny rekombinantowe

1.6.1. Zastosowanie antygenów rekombinantowych w diagnostyce toksoplazmozy u ludzi

Diagnostyka toksoplazmozy opiera się głównie na testach serologicznych. Czułość i swoistość tych testów uzależniona jest od kilku czynników, z których najważniejsze to poziom poszczególnych klas przeciwciał produkowanych na skutek zarażenia oraz jakość wykorzystywanych w testach antygenów. W zasadzie człowiek

może wpłynąć tylko i wyłącznie na jakość i czystość antygenów. Najbardziej rozpowszechnione w diagnostyce toksoplazmozy są antygeny natywne (tzw. poliwalentny antygen natywny TLA, ang. *Toxoplasma* Lysate Antigen). Produkcja tych antygenów jest niestety kosztowna, czasochłonna i pracochłonna oraz wiąże się z niebezpieczeństwem zarażenia pasożytem wynikającym z konieczności prowadzenia hodowli *T. gondii*. Dlatego też w wielu laboratoriach pracuje się nad otrzymywaniem rekombinantowych antygenów w dobrze scharakteryzowanych układach ekspresyjnych. Nowoczesne narzędzia inżynierii genetycznej pozwalają tak zaprojektować schemat całego klonowania i późniejszej ekspresji, iż możliwe jest otrzymywanie białek fuzyjnych z dodatkowymi domenami na N- i C-końcu, umożliwiając tym samym późniejsze efektywne oczyszczanie i otrzymywanie preparatów białkowych o wysokiej czystości. Niekwestionowaną zaletą takiego podejścia w produkcji antygenów jest możliwość łatwej optymalizacji ekspresji w celu uzyskania wysokiej wydajności. Dodatkowo wyeliminowane jest ryzyko zarażenia wynikające z faktu, iż pracuje się głównie z mikroorganizmami niepatogennymi, między innymi z drobnoustrojami powszechnie uznanymi za bezpieczne. Daje to możliwość otrzymywania w łatwy i szybki sposób pojedynczych antygenów, które można zastosować np. jako markery selekcyjne dla poszczególnych faz choroby. Zaletą produkcji rekombinantowych antygenów *T. gondii* jest również możliwość stosowania pojedynczych białek lub ich mieszanek, które pozwolą na określenie fazy choroby, co jest szczególnie istotne z diagnostycznego punktu widzenia. Stosowanie rekombinantowych białek w testach daje lepszą powtarzalność wyników, wiąże się to także z łatwiejszą standaryzacją i możliwością doboru zawsze takiego samego składu preparatu białkowego.

Od kilkunastu lat badania nad rekombinantowymi antygenami *T. gondii* prowadzone są również w Katerze Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej. Dotychczas wyprodukowano ponad 30 takich białek rekombinantowych oraz wstępnie przebadano je pod względem przydatności do serodiagnostyki toksoplazmozy [Hiszczyńska-Sawicka i wsp., 2003; 2005; Holec, 2007; Holec i wsp., 2007; 2008; Holec-Gąsior i wsp., 2009; Holec-Gąsior i Kur, 2010; Pietkiewicz i wsp., 2004]. W prowadzonych badaniach ocenia się zdolność poszczególnych antygenów rekombinantowych do oddziaływania z przeciwciałami obecnymi w surowicach pacjentów z wczesną i przewlekłą toksoplazmozą z wykorzystaniem różnych testów immunodiagnostycznych.

1.6.2. Zastosowanie antygenów rekombinantowych w diagnostyce toksoplazmozy u zwierząt

Rozpowszechnienie toksoplazmozy wśród zwierząt ma znaczący wpływ na ryzyko wystąpienia tej jednostki chorobowej u ludzi. Kotowate jako żywiciele ostateczni pasożyta stanowią potencjalne źródło zarażenia pasożytem zarówno dla

innych zwierząt jak i ludzi. Mięso zarażonych zwierząt hodowlanych stanowi bardzo istotny czynnik ryzyka transmisji pasożyta na człowieka. Obecnie w diagnostyce toksoplazmozy u zwierząt stosuje się głównie różne odmiany testów aglutynacyjnych, które są kosztowne i w związku z tym nie nadają się do badania dużych populacji zwierząt. W ciągu ostatnich 20 lat, oceniono przydatność diagnostyczną wielu rekombinantowych antygenów *T. gondii* do wykrywania swoistych przeciwciał w próbkach surowic ludzkich [Holec-Gąsior, 2013]. Wyniki niektórych zespołów badawczych potwierdzają również możliwość zastosowania antygenów rekombinantowych do wykrywania swoistych przeciwciał antytoksoplazmowych w surowicach zwierząt. Wyniki badań dotyczących użyteczności diagnostycznej antygenów rekombinantowych zostały zebrane w tabeli 3 (surowice kocie), tabeli 4 (surowice świńskie) oraz tabeli 5 (surowice owcze), brak doniesień o możliwości zastosowania antygenów rekombinantowych w serodiagnostyce toksoplazmozy u koni.

Tab. 3. Antygeny rekombinantowe *T. gondii* zastosowane w serodiagnostyce toksoplazmozcy u kotów.

Antygen	Test	Wnioski	Literatura
H4 H11 (GRA4)	IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> czułość testu H4-ELISA z wykorzystaniem surowic kocich wynosiła 100% czułość testu H11-ELISA z wykorzystaniem surowic kocich wynosiła 50% czułość testu (H4+H11)-ELISA z wykorzystaniem surowic kocich wynosiła 100% specyficzność wszystkich testów na poziomie 100% 	Tenter i wsp., 1992
H4 H11 (GRA4)	IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> czułość testu H4-ELISA wynosiła 93% czułość testu H11-ELISA wynosiła 64% czułość testu (H4+H11)-ELISA wynosiła 95% specyficzność wszystkich testów na poziomie 100% 	Tenter i wsp., 1994
SAG1	IgG ELISA Western blot	<ul style="list-style-type: none"> zidentyfikowano 40 (20,7%) surowic seropozytywnych spośród 193 surowic badanych w teście SAG1-ELISA uzyskane wyniki były zgodne z wynikami uzyskanymi w teście Western blot oraz komercyjnym testem LAT 	Kimbita i wsp., 2001
SAG1 SAG2	IgG ELISA Western blot	<ul style="list-style-type: none"> zidentyfikowano 40 (20,8%) surowic seropozytywnych spośród 192 surowic badanych w teście SAG1-ELISA zidentyfikowano 42 (21,9%) surowice seropozytywne spośród 192 surowic badanych w teście SAG2-ELISA spośród przebadanych surowic 38 zostało zidentyfikowanych jako pozytywne w obu testach SAG1-ELISA oraz SAG2-ELISA 39 (20,3%) surowic zostało zidentyfikowanych jako pozytywne w komercyjnym teście LAT wyniki uzyskane w teście SAG2-ELISA były zgodne z wynikami testu Western blot dla 41 surowic 	Huang i wsp., 2002a
SAG2	IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> zidentyfikowano 53 (28,3%) surowice seropozytywne spośród 187 surowic badanych w teście S-SAG2-ELISA (antygen uzyskany systemie bakulowirusowym) zidentyfikowano 36 (19,7%) surowic seropozytywnych spośród 183 surowic badanych w teście E-SAG2-ELISA (antygen uzyskany w systemie bakteryjnym) 35 (18,7%) surowic zostało zidentyfikowanych jako pozytywne spośród 187 surowic badanych w komercyjnym teście LAT autorzy sugerują, iż antygen S-SAG2 jest bardziej reaktywny i lepszy do diagnostyki toksoplazmozcy, niż antygen E-SAG2, jednakże wobec dużej rozbieżności wyników uzyskanych w odniesieniu do testu komercyjnego LAT, trudno zgodzić się z takim wnioskiem 	Huang i wsp., 2002b

Tab. 3 c.d. Antygeny rekombinantowe *T. gondii* zastosowane w serodiagnostyce toksoplazmozy u kotów.

Antygen	Test	Wnioski	Literatura
SAG2	IgG ELISA IgG ICT	<ul style="list-style-type: none"> • zidentyfikowano 41 (22,9%) surowic seropozytywnych spośród 179 surowic badanych w teście SAG2-ICT • 33 surowice zidentyfikowano jako pozytywne w komercyjnym teście LAT, co w odniesieniu do testu SAG2-ICT dawało 95,5% zgodności • 35 surowic zostało zidentyfikowanych jako pozytywne w teście SAG2-ELISA, co w odniesieniu do testu SAG2-ICT dawało 96,1% zgodności 	Huang i wsp., 2004
SAG1 SAG2 GRA6	IgG RDT	<ul style="list-style-type: none"> • antygeny SAG2 oraz GRA6 charakteryzowały się niską reaktywnością z przeciwciałami antytoksoplazmowymi zawartymi w mieszaninie 10 surowic pozytywnych kota, wysoką reaktywnością charakteryzował się antygen SAG1 • wykonano badania na puli 182 zdefiniowanych surowic kocich, czułość testu SAG1-RTD określono na 100%, a specyficzność na poziomie 99,2%, podczas gdy czułość komercyjnego testu ELISA wynosiła 91,2%, a specyficzność 98,7% 	Chong i wsp., 2011
GRA7	IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • na podstawie wyników testów IFA i MAT badane surowice podzielono na seropozytywne (39 prób) oraz seronegatywne (146 prób) • czułość testu TLA-ELISA wynosiła 84,6%, a specyficzność 99,3% • czułość testu GRA7-ELISA wynosiła 89,7%, a specyficzność 92,5% 	Cai i wsp., 2015

Tab. 4. Antygeny rekombinantowe *T. gondii* zastosowane w serodiagnostyce toksoplazmozy u świń.

Antygen	Test	Wnioski	Literatura
H4 H11 (GRA4)	IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • antygeny rekombinantowe są lepiej rozpoznawane przez swoiste przeciwciała zawarte w niektórych próbach surowic pochodzących od świń do ok. 9 tygodnia od zarażenia <i>T. gondii</i> • antygeny rekombinantowe są ogólnie mniej reaktywne niż ekstrakt natywnych antygenów, w szczególności biorąc pod uwagę reaktywność z surowicami pobranymi po dłuższym czasie od momentu zarażenia <i>T. gondii</i> 	Andrews i wsp., 1997
B427 (MAG1) C55 (GRA2) V22 (SAG2) MBP30 (SAG1) C51	IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> • na podstawie różnicy pomiędzy wartościami uzyskanymi dla surowic ujemnych i dodatnich stwierdzono, iż antygenami o najlepszych właściwościach są C51, V22 oraz MBP30 • antygeny C51 i MBP30 były rozpoznawane poprawnie przez swoiste przeciwciała w surowicach świń zarażonych <i>T. gondii</i> nawet po 52 tygodniach od momentu zarażenia 	Gamble i wsp., 2000

Tab. 4 c.d. Antygeny rekombinantowe *T. gondii* zastosowane w serodiagnostyce toksoplazmozy u świń.

Antygen	Test	Wnioski	Literatura
MIC3	IgG LAT	<ul style="list-style-type: none"> test MIC3-LAT pozwolił na poprawne zidentyfikowanie wszystkich 50 seropozytywnych surowic od eksperymentalnie zarażonych świń, specyficzność testu wynosiła 100% 	Jiang i wsp., 2008
SAG1	IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> test SAG1-ELISA pozwolił na poprawne zidentyfikowanie 48 surowic seropozytywnych, specyficzność testu wynosiła 100% badając 256 niezdefiniowanych prób surowic świńskich z wykorzystaniem testu MIC3-LAT 103 zidentyfikowano jako pozytywne, w teście SAG1-ELISA w 94 surowicach wykryto swoiste przeciwciała antytoksoplazmowe pozytywny współczynnik zgodności pomiędzy testami MIC3-LAT i SAG1-ELISA wynosił 91,3% dla niezdefiniowanych prób surowic, oraz 92,8% dla wszystkich surowic użytych łącznie w badaniach 	
MAG1		<ul style="list-style-type: none"> czułość testu MAG1-ELISA wynosiła 64% 	
SAG1		<ul style="list-style-type: none"> czułość testu SAG1-ELISA wynosiła 85,3% 	
GRA7		<ul style="list-style-type: none"> czułość testu GRA7-ELISA wynosiła 81,3% czułość testu (MAG1+SAG1)-ELISA wynosiła 86,7% czułość testu (MAG1+GRA7)-ELISA wynosiła 89,2% czułość testu (SAG1+GRA7)-ELISA wynosiła 92% czułość testu (MAG1+SAG1+GRA7)-ELISA wynosiła 97,3% specyficzność wszystkich testów wynosiła 100% uzyskane wyniki potwierdziły, iż do serodiagnostyki toksoplazmozy lepiej stosować mieszanki antygenów, co znacząco podnosi czułość testu w porównaniu z testem opartym na pojedynczym antygenie rekombinantowym 	Holec-Gąsior i wsp., 2010
SAG2	IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> określono, że w testach ELISA opartych na antygenach rekombinantowych najlepiej rozpoznawanym przez przeciwciała antytoksoplazmowe jest antygen GRA7 	
GRA7	IgM ELISA	<ul style="list-style-type: none"> odnosząc uzyskane wyniki do komercyjnego testu LAT, czułość testu GRA7-ELISA wynosiła 90,6%, Terkawi i wsp., 2013 	
GRA14	ICT	<ul style="list-style-type: none"> odnosząc uzyskane wyniki do komercyjnego testu LAT, czułość testu GRA7-ICT wynosiła 71,9%, specyficzność 96,3%, a zgodność wyników 83,1% 	

Tab. 5. Antygeny rekombinantowe *T. gondii* zastosowane w serodiagnostyce toksoplazmozy u owiec.

Antygen	Test	Wnioski	Literatura
H4 H11 (GRA4)	IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> czułość testu H4-ELISA z wykorzystaniem surowic owieczych wynosiła 79% czułość testu H11-ELISA z wykorzystaniem surowic owieczych wynosiła 43% czułość testu (H4+H11)-ELISA z wykorzystaniem surowic owieczych wynosiła 79% specyficzność wszystkich testów na poziomie 100% 	Tenter i wsp., 1992
H11 (GRA4)	IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> czułość testu H11-ELISA wynosiła 34% specyficzność testu na poziomie 89% 	Sager i wsp., 2003
MAG1	IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> spośród 175 surowic owieczych w teście MAG1-ELISA 42 (24%) zostały zidentyfikowane jako pozytywne, podczas gdy komercyjny test LAT pozwolił na wykrycie przeciwciał antytoksoplazmowych w 29 próbach spośród 29 prób zidentyfikowanych jako dodatnich w teście LAT, analogiczny wynik uzyskano dla 27 surowic w teście MAG1-ELISA biorąc pod uwagę fakt, iż 15 innych surowic zostało rozpoznanych w teście MAG1-ELISA jako pozytywne trudno jest ocenić przydatność diagnostyczną antygenu MAG1 do serodiagnostyki toksoplazmozy 	Tumurjav i wsp., 2010
19 antygenów (GRA1, GRA2ex2, GRA4, GRA5, GRA6, GRA9, SAG1, SAG2, SAG4, BSR4, ROP1, ROP9, MIC1ex2, MIC1ex34, MIC3, MAG1, BAG1, LDH1, LDH2)	IgG ELISA	<ul style="list-style-type: none"> na podstawie wstępnej analizy immunoreaktywności poszczególnych antygenów do badań na puli 108 surowic wytypowano 8 antygenów: GRA1, GRA9, SAG1, SAG2, SAG4, MIC1ex2, MIC3, ROP1 na podstawie wyników uzyskanych w testach ELISA do dalszych badań wybrano antygeny o największej reaktywności: GRA1 (100%), SAG2 (98,9%) i ROP1 (100%) wyżej wymienione antygeny posłużyły do przygotowania mieszanek i zostały przebadane w teście IgG ELISA z tą samą pulą 108 surowic czułość i specyficzność testu (GRA1+ROP1)-ELISA wynosiła 100% czułość testu (GRA1+SAG2)-ELISA wynosiła 100%, a specyficzność 95% czułość testu (SAG2+ROP1)-ELISA wynosiła 100%, a specyficzność 95% czułość i specyficzność testu (GRA1+SAG2+ROP1)-ELISA wynosiła 100% mieszanka GRA1+SAG2+ROP1 charakteryzowała się największą reaktywnością z poszczególnymi próbkami surowic użyteczność diagnostyczna mieszanki GRA1+SAG2+ROP1 została potwierdzona w teście IgG ELISA z wykorzystaniem nowej puli 128 surowic, ponownie czułość i specyficzność testu wynosiła 100% 	Holec-Gąsior i wsp., 2014

1.6.3. Zastosowanie rekombinantowych antygenów chimerycznych

Obecnie w diagnostyce toksoplazmozy testuje się powszechnie mieszanki antygenów rekombinantowych, które tworzone są poprzez zmieszanie w odpowiednich proporcjach oczyszczonych preparatów pojedynczych białek. Aby ułatwić możliwość standaryzacji, a także zminimalizować koszty związane z koniecznością produkcji i oczyszczania każdego z białek osobno zaczęto prowadzić badania nad białkami chimerycznymi, które stanowią nową grupę antygenów rekombinantowych. W celu otrzymania antygenów chimerycznych łączy się fragmenty dwóch lub większej liczby genów kodujących pojedyncze antygeny w tak zwany gen fuzyjny. W rezultacie ekspresji genu fuzyjnego produkowany jest antygen chimeryczny, który powinien charakteryzować się możliwością oddziaływania z przeciwciałami skierowanymi przeciw poszczególnym antygenom, co powinno skutkować podniesieniem czułości testów immunoenzymatycznych.

Wykorzystanie antygenów chimerycznych zarówno w diagnostyce toksoplazmozy jak i w badaniach nad szczepionkami antytoksoplazmozowymi jest stosunkowo nowym podejściem, z tego względu w literaturze światowej jak do tej pory ukazało się jedynie kilka prac pokazujących przydatność i wartość diagnostyczną oraz szczepionkową w/w preparatów białkowych.

W 2004 roku w systemie ekspresyjnym *E. coli* wyprodukowano rekombinantowy antygen chimeryczny SAG1/2 o masie cząsteczkowej ok. 52 kDa [Yang i wsp., 2004]. W teście Western blotting stwierdzono, iż uzyskane białko oddziałuje ze swoistymi przeciwciałami antytoksoplazmowymi. W 2011 roku wyprodukowano antygen chimeryczny SAG1/2 (o masie cząsteczkowej ok. 60 kDa) z wykorzystaniem drożdżowego systemu ekspresyjnego *Pichia pastoris* [Lau i wsp., 2011]. Preparat ten został również przebadany w teście Western blotting z wykorzystaniem surowic ludzkich.

Jednym z podejść było otrzymanie białek chimerycznych składających się z fragmentów antygenów charakterystycznych dla formy rozwojowej tachyzoitów [Beghetto i wsp., 2006]. Wyprodukowano dwa białka chimeryczne składające się z najbardziej immunoreaktywnych regionów antygenów MIC₂¹⁵⁷⁻²³⁵, MIC₃²³⁴⁻³⁰⁷, SAG1₁₈₂₋₃₁₂ (GST-EC2) oraz GRA₃³⁶⁻¹³⁴, GRA₇²⁴⁻¹⁰², M2AP₃₇₋₂₆₃ (GST-EC3). Dodatkowo białka te zawierały sekwencję transferazy S-glutationowej (GST), która umożliwiała ich późniejsze oczyszczanie za pomocą chromatografii powinowactwa. Uzyskane białka chimeryczne przebadano w teście ELISA pod względem zdolności do oddziaływania ze specyficznymi przeciwciałami klasy IgM i IgG anty-*T. gondii*. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że antygeny chimeryczne wykazują większą reaktywność niż antygeny stosowane w testach komercyjnych.

Antygen chimeryczny MIC1ex2-MAG1, który składał się z N-końcowego fragmentu genu kodującego adhezynę MIC1 (reszty aminokwasowe od 25-182) oraz z fragmentu antygeny macierzy cyst tkankowych MAG1 (reszty aminokwasowe od 30-202) został otrzymany również przez zespół naukowy Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii PG zajmujący się diagnostyką toksoplazmozy [Holec-Gąsior i wsp., 2012]. W pośrednim teście ELISA badano reaktywność uzyskanego antygeny chimeryczny MIC1ex2-MAG1, pojedynczych antygenów rMIC1ex2 oraz rMAG1, mieszanki antygenów rMIC1ex2+rMAG1 oraz TLA. Antygeny MIC1ex2 i MAG1 oraz mieszanka tych antygenów wykazywały niższą reaktywność (wynoszącą odpowiednio 75,5%, 60% oraz 69,1%) niż poliwalentny antygen natywny (TLA 91,8%). Porównywalną reaktywność do TLA posiadał natomiast wyprodukowany antygen chimeryczny MIC1ex2-MAG1 (90,9%). Ponadto w przypadku surowic pobranych od pacjentów z wczesną lub podostrą toksoplazmozą antygen MIC1ex2-MAG1 charakteryzował się 100% reaktywnością, podczas gdy dla poliwalentnego antygeny natywnego odpowiednio uzyskano niższą czułość (88,5% i 88,2%).

Innym podejściem jest konstrukcja antygenów chimerycznych złożonych z epitopów różnych białek *T. gondii*. W 2012 roku wyselekcjonowano epitopy białek SAG1₃₀₉₋₃₁₈, SAG2₁₀₉₋₁₁₈ oraz SAG3₃₄₇₋₃₅₆ do konstrukcji antygeny chimeryczny rMEP, który charakteryzował się wysoką użytecznością diagnostyczną w testach IgM i IgG ELISA [Dai i wsp., 2012]. Wysoki potencjał antygeny został potwierdzony w kolejnych badaniach, w których określono jego zdolność do różnicowania wczesnej i przewlekłej fazy toksoplazmozy [Dai i wsp. 2013]. Antygen rMEP był rozpoznawany przez swoiste przeciwciała IgM z surowic kobiet z wczesną toksoplazmozą oraz przez przeciwciała IgG z surowic kobiet z przewlekłą fazą choroby.

1.7. Szczepionki antytoksoplazmowe

Zdolność pasożyta *T. gondii* do zarażania szerokiego spektrum zwierząt stałocieplnych oraz częstość jego występowania stanowi poważny problem epidemiologiczny. Mnogość dróg transmisji pasożyta pomiędzy różnymi organizmami sugeruje, że najprostszym sposobem zapobiegania dalszemu rozprzestrzenianiu się *T. gondii* byłoby, tak jak w przypadku innych chorób infekcyjnych podanie szczepionki.

Jedyna dostępna komercyjnie opracowana w Nowej Zelandii szczepionka o nazwie Toxovax zawiera atenuowane tachyzoity *T. gondii* szczepu S48, które nie posiadają zdolności do tworzenia cyst tkankowych [Buxton, 1993]. W 1992 roku po przeprowadzeniu dodatkowych badań i dokonaniu pewnych modyfikacji szczepionka została zarejestrowana w Wielkiej Brytanii i od tego momentu jest dostępna w wielu krajach europejskich pod nazwą OvilisTM Toxovax. Powyższa szczepionka podawana jest 5 miesięcznym zdrowym, nie będącym w ciąży owcom, nie później niż 3 tygodnie przed planowanym zapłodnieniem. Szczepionka indukuje silną odpowiedź humoralną

i komórkową, immunizowane owce są odporne przez okres ok. 20 miesięcy, co zdecydowanie redukuje częstość ronień wywołanych wewnątrzmacicznym zarażeniem płodu [Dubey, 2009b]. Główną wadą podania szczepionki jest wywołanie ogólnego osłabienia owiec, spadek masy ciała, a także brak ochrony przed wertykalnym przenoszeniem pasożyta.

Mimo, iż od blisko 50 lat wiele ośrodków badawczych prowadzi badania nad nowymi szczepionkami antytoksoplazmozowymi do dnia dzisiejszego nie udało się wprowadzić na rynek, żadnej szczepionki, która mogłaby być stosowana u innych grup zwierząt lub ludzi [Kur i wsp., 2009]. Główną przyczyną takiego stanu rzeczy jest najprawdopodobniej złożoność cyklu rozwojowego pasożyta, a także budowa antygenowa *T. gondii* charakterystyczna dla konkretnych form rozwojowych. W związku z powyższym również odpowiedź immunologiczna organizmu żywiciela jest złożona i swoista dla poszczególnych form rozwojowych.

Jako potencjalne szczepionki anty-*T. gondii* testowano lub testuje się:

- całkowity ekstrakt zabitego pasożyta, ekstrakt białek zabitego pasożyta;
- atenuowane szczepy pasożyta;
- szczepionki wektorowe;
- szczepionki DNA;
- szczepionki podjednostkowe.

Na przestrzeni ostatnich 20 lat pojawiło się wiele doniesień dotyczących możliwości zastosowania podjednostkowych szczepionek antytoksoplazmozowych w postaci oczyszczonych antygenów natywnych lub białek rekombinantowych. Główną zaletą takiego podejścia jest możliwość immunizacji białkiem lub mieszaniną antygenów charakterystycznych dla danej formy rozwojowej pasożyta. W związku z powyższym do immunizacji można zastosować najbardziej immunogenne białka, występujące we wszystkich stadiach rozwojowych lub kluczowe w początkowych etapach inwazji pasożyta do komórek żywiciela. Dodatkową korzyścią tego podejścia jest wyeliminowanie innych składników komórkowych pasożyta oraz białek, które powodować mogą uogólnione osłabienie, stan zapalny, gorączkę, itp. Szczepionki podjednostkowe podawane są najczęściej z adjuwantem, który dodatkowo pobudza lub wzmacnia odpowiedź układu immunologicznego. W tabeli 6 zebrano dane dotyczące badań na modelu mysim szczepionek podjednostkowych zawierających antygeny natywne oraz rekombinantowe wykorzystane w niniejszej pracy do konstrukcji antygenów chimerycznych.

Tab. 6. Wyniki badań dotyczących szczepionek podjednostkowych złożonych z natywnych lub rekombinantowych antygenów *T. gondii*.

Antygen	Adiuwant	Szczep myszy	Droga podania białka	Zarażenie <i>T. gondii</i>	Wyniki	Literatura
<i>TgSAG1</i>	CFA	BALB/c CD1	dootrzewnowo/ podskórnice	szczep C, tachyzoity, dootrzewnowo	<ul style="list-style-type: none"> spadek przeżywalności wzrost liczby cyst w mózgu indukowana odpowiedź humoralna 	Kasper i wsp., 1985
<i>TgSAG1</i>	Quil A	CD1 C57BL/6 A/J	podskórnice	szczep ME49, cysty tkankowe, droga pokarmowa	<ul style="list-style-type: none"> zdecydowany wzrost przeżywalności znaczna redukcja liczby cyst w mózgu (do 100%) indukowana odpowiedź komórkowa i humoralna 	Khan i wsp., 1991
<i>TgSAG1</i>	liposomy	Swiss- webster	dootrzewnowo	szczep C, tachyzoity, dootrzewnowo	<ul style="list-style-type: none"> zdecydowany wzrost przeżywalności myszy (do 93%) 	Bulow i Boothroyd, 1991
seSAG1 ₄₈₋₆₇ MAP (powtórzenia seSAG1)	IFA	Swiss OF1	podskórnice	szczep 76K, cysty tkankowe, droga pokarmowa	<ul style="list-style-type: none"> brak wydłużenia czasu przeżycia myszy immunizowanych seSAG1 wzrost przeżywalności myszy immunizowanych MAP 	Darcy i wsp., 1992
<i>TgSAG1</i>	CT	CBA/J	donosowo	szczep 76K, cysty tkankowe, droga pokarmowa	<ul style="list-style-type: none"> znaczna redukcja liczby cyst w mózgu (do 85%) silna odpowiedź komórkowa i humoralna 	Debard i wsp., 1996
seSAG1 ₁₂₅₋₁₆₅	CFA/IFA	C57BL/6 CBA/J	podskórnice	szczep 76K, cysty tkankowe, droga pokarmowa	<ul style="list-style-type: none"> redukcja liczby cyst o 35% w przypadku immunizacji myszy CBA/J prawdopodobnie indukcja silnej odpowiedzi komórkowej u myszy CBA/J prawdopodobnie indukcja silnej odpowiedzi humoralnej u myszy C57BL/6 	Velge-Roussel i wsp., 1997
rSAG2	ISCOM GST	Swiss- webster	podskórnice	szczep ME49, oocysty, szczep C56, cysty tkankowe, droga pokarmowa	<ul style="list-style-type: none"> wzrost śmiertelności 	Lunden i wsp., 1997

Tab. 6 c.d. Wyniki badań dotyczących szczepionek pojednostkowych złożonych z natywnych lub rekombinantowych antygenów *T. gondii*.

Antygen	Adiuwant	Szczep myszy	Droga podania białka	Zarażenie <i>T. gondii</i>	Wyniki	Literatura
rSAG1	IL-12	CBA/J	podskórnie	szczep PRU, cysty tkankowe, droga pokarmowa	<ul style="list-style-type: none"> immunizacja rSAG1 wywołuje odpowiedź humoralną typu 1 immunizacja rSAG1+IL12 wywołuje odpowiedź komórkową i humoralną typu 2 immunizacja rSAG1+IL12 pozwala na zredukowanie liczby cyst o 40% 	Letscher-Bru i wsp., 1998
rSAG1	Al(OH) ₃	NMRI	domięśniowo	szczep RH, tachyzoity, dootrzewnowo, szczep SS1119, cysty tkankowe, podskórnie	<ul style="list-style-type: none"> zwiększona przeżywalność mieszana odpowiedź typu 1 i 2 	Petersen i wsp., 1998
TgSAG1	Salbutamol, CT	CBA/J	donosowo	szczep 76K, cysty tkankowe, droga pokarmowa	<ul style="list-style-type: none"> redukcja liczby cyst o 80% po immunizacji SAG1+CT redukcja liczby cyst o 60% po immunizacji SAG1+Salbutamol indukowana silna odpowiedź humoralna w przypadku SAG1+CT 	Fermin i wsp., 1999
rGRA1	BCG IFA	OF1	dootrzewnowo	szczep 76K, cysty tkankowe, droga pokarmowa	<ul style="list-style-type: none"> nieznaczne wydłużenie czasu przeżycia u myszy immunizowanych BCG brak/minimalna immunogenność i immunoprotekcja w przypadku immunizacji BCG silna odpowiedź humoralna w przypadku immunizacji rGRA1 (<i>E. coli</i>), brak właściwości immunoprotekcyjnych 	Supply i wsp., 1999
TgSAG1	CT LT	CBA/J	donosowo	szczep 76K, cysty tkankowe, droga pokarmowa	<ul style="list-style-type: none"> indukowana odpowiedź komórkowa i humoralna znaczne ograniczenie ilości cyst w mózgu (od 75-85%) 	Bonenfant i wsp., 2001

Tab. 6 c.d. Wyniki badań dotyczących szczepionek pojednostkowych złożonych z natywnych lub rekombinantowych antygenów *T. gondii*.

Antygen	Adiuwant	Szczep myszy	Droga podania białka	Zarażenie <i>T. gondii</i>	Wyniki	Literatura
rSAG1						
rSAG2						
rSAG3						
rSRS1	CFA/IFA	BALB/c	dootrzewnowo	szczep Beverley, bradyzoity, dootrzewnowo	<ul style="list-style-type: none"> wzrost przeżywalności myszy w przypadku immunizacji rSAG2 (17%), rSRS1 (25%), rP54 (8%), mieszanina Mishima i wsp., (17%) redukcja ilości cyst w mózgach 	Mishima i wsp., 2001
rP54						
Mieszanina białek						
rMAG1	Quil A/GST	Swiss-webster	podskórnice	szczep ME49, cysty tkankowe, droga pokarmowa	<ul style="list-style-type: none"> znaczna redukcja ilości cyst w mózgach wzrost przeżywalności indukcja odpowiedzi komórkowej i humoralnej 	Parmley i wsp., 2002
rSAG1	-	BALB/c CBA/J	podskórnice	szczep ME49, cysty tkankowe, droga pokarmowa	<ul style="list-style-type: none"> mieszana odpowiedź typu 1 i 2 u myszy BALB/c odpowiedź typu 2 u myszy CBA/J zmniejszenie ryzyka zarażenia płodu mniejsze o ponad 50% w przypadku myszy BALB/c 	Letscher-Bru i wsp., 2003
rGRA1	chitozan	C3H/HeN	droga pokarmowa	-	<ul style="list-style-type: none"> indukcja mieszanej odpowiedzi typu 1 i 2 	Bivas-Benita i wsp., 2003
rSAG1/2						
rSAG1	Vet L-10	BALB/c	dootrzewnowo	szczep RH, tachyzoity, podskórnice	<ul style="list-style-type: none"> wzrost przeżywalności o 60% w przypadku myszy immunizowanych rSAG1 wzrost przeżywalności o 53% w przypadku myszy immunizowanych rSAG2 wzrost przeżywalności o 73% w przypadku myszy immunizowanych rSAG1/2 indukcja odpowiedzi typu 1 	Yang i wsp., 2004
rSAG2						
17 seSAG1	BSA	CH3	dożylnie	szczep RH, tachyzoity, dootrzewnowo	<ul style="list-style-type: none"> 8 seSAG1 indukuje odpowiedź humoralną 4 seSAG1 powodują wzrost przeżywalności C-końcowy fragment antygeny SAG1 jest silnie immunogenny 	Siachoque i wsp., 2006

Tab. 6 c.d. Wyniki badań dotyczących szczepionek pojednostkowych złożonych z natywnych lub rekombinantowych antygenów *T. gondii*.

Antygen	Adiuwant	Szczep myszy	Droga podania białka	Zarażenie <i>T. gondii</i>	Wyniki	Literatura
TgMIC1 TgMIC4	CFA/IFA	C57BL/6	podskórnice	szczep ME49, cysty tkankowe, droga pokarmowa	<ul style="list-style-type: none"> wzrost przeżywalności myszy do 80% redukcja liczby cyst o 68% indukcja silnej odpowiedzi typu 1 	Lourenco i wsp., 2006
rGRA2 rGRA6	MPL	CBA/J	podskórnice	szczep Pru-βgal, cysty tkankowe, dootrzewnowo	<ul style="list-style-type: none"> redukcja liczby cyst o 69,8% u myszy immunizowanych rGRA2 redukcja liczby cyst o 48,2% u myszy immunizowanych rGRA2+rGRA6 rGRA6 posiada słabe właściwości immunoprotekcyjne indukcja silnej odpowiedzi komórkowej i humoralnej myszy immunizowanych rGRA2 	Golkar i wsp., 2007
rGRA1	PROVAX	BALB/c	dootrzewnowo	szczep RH, tachyzoity, dootrzewnowo	<ul style="list-style-type: none"> wydłużenie czasu przeżycia myszy immunizowanych rGRA1 w porównaniu do myszy immunizowanych szczepionkami DNA silniejsza odpowiedź komórkowa i humoralna u myszy immunizowanych rGRA1 w porównaniu do myszy immunizowanych szczepionkami DNA 	Doskaya i wsp., 2007
rSAG1-GRA2	CFA/IFA	BALB/c	podskórnice	szczep RH, tachyzoity, dootrzewnowo	<ul style="list-style-type: none"> wydłużenie czasu przeżycia indukcja silnej odpowiedzi komórkowej i humoralnej 	Zhou i wsp., 2007
seHF10 (analog epitopu GRA ₆₂₁₋₂₃₀)	BMDCs	B10.D2 C57BL/6	podskórnice	szczep PruGFP, tachyzoity, dootrzewnowo	<ul style="list-style-type: none"> 100 % przeżywalność myszy B10.D2 brak właściwości immunoprotekcyjnych w przypadku myszy C57BL/6 	Blanchard i wsp., 2008
Mieszanka: rSAG1+rGRA1+ rMAG1	CFA/IFA	C3H/HeJ	dootrzewnowo/ podskórnice	szczep DX, cysty tkankowe, dootrzewnowo	<ul style="list-style-type: none"> redukcja liczby cyst w mózgu o 89% silna odpowiedź humoralna 	Gatkowska i wsp., 2008

Tab. 6 c.d. Wyniki badań dotyczących szczepionek pojednostkowych złożonych z natywnych lub rekombinantowych antygenów *T. gondii*.

Antygen	Adiuwant	Szczep myszy	Droga podania białka	Zarażenie <i>T. gondii</i>	Wyniki	Literatura
rEC2 (MIC2-MIC3-SAG1) rGRA7	GERBU	Swiss F1	domięśniowo	szczep 76K, cysty tkankowe, droga pokarmowa	<ul style="list-style-type: none"> • indukcja silnej odpowiedzi typu 1 w przypadku myszy immunizowanych rEC2+rGRA7 • indukcja mieszanej odpowiedzi typu 1 i 2 w przypadku myszy immunizowanych rEC2+DNA plazmidowe pGRA7 • redukcja cyst w mózгах do 79% w przypadku immunizacji rEC2+rGRA7 • redukcja cyst w mózгах od 24-28% w przypadku immunizacji rEC2+DNA plazmidowe pGRA7 	Jongert i wsp., 2008
rSAG2	-	ICR	podskórnice	szczep RH, tachyzoity, dootrzewnowo	<ul style="list-style-type: none"> • wydłużenie czasu przeżycia • indukcja silnej odpowiedzi humoralnej 	Lau i Fong, 2008
seSAG1 ₂₂₄₋₂₃₂ seGRA6 ₁₆₄₋₁₇₂ seGRA7 ₁₃₄₋₁₄₂ seSAG1- GRA6- GRA7	lipopeptydy, PADRE GLA-SE	HLA- A*1101/K ^b	podskórnice	szczep PruFLUC, tachyzoity, dootrzewnowo	<ul style="list-style-type: none"> • wzrost przeżywalności • redukcja liczby komórek pasożyta • odpowiedź typu 1 i 2 	Cong i wsp., 2010
rSAG1	CFA/IFA	C3h/HeN C57BL/6	podskórnice/ śródkórnice/ drogą pokarmową	szczep ME49, cysty tkankowe, droga pokarmowa	<ul style="list-style-type: none"> • 30% redukcja liczby cyst po immunizacji rSAG1 (ekstrakt z liści tytoniu) • 54% redukcja liczby cyst po immunizacji dodatkową dawką rSAG1 (<i>E. coli</i>) • silna odpowiedź komórkowa i humoralna 	Laguia-Becher i wsp., 2010
seHF10 (analog epitopu GRA6 ₂₂₁₋₂₃₀)	lipopeptydy, PADRE,	BALB/c	podskórnice	szczep PruFLUC, tachyzoity, dootrzewnowo	<ul style="list-style-type: none"> • częściowa immunoprotekcja 	Tan i wsp., 2010

Tab. 6 c.d. Wyniki badań dotyczących szczepionek pojednostkowych złożonych z natywnych lub rekombinantowych antygenów *T. gondii*.

Antygen	Adiuwant	Szczep myszy	Droga podania białka	Zarażenie <i>T. gondii</i>	Wyniki	Literatura
seGRA3, seGRA6 seSAG2, seSAG3, seSPA, seMIC1, seMICA2P	PADRE, GLA-SE	HLA- A*1101/K ^b	podskórnie	szczep PruFLUC, tachyzoity, dootrzewnowo	<ul style="list-style-type: none"> • indukcja odpowiedzi komórkowej i humoralnej • 80% przeżywalność myszy po immunizacji mieszaną peptydów+adjuwant 	Cong i wsp., 2011
Mieszanki: rROP2+rGRA4+ rSAG1 rROP2+rROP4+ rGRA4 rROP2+rROP4+ rSAG1	IFA	C57BL/6 C3H/HeJ	podskórnie	szczep DX, cysty tkankowe, dootrzewnowo	<ul style="list-style-type: none"> • myszy C3H/HeJ redukcja liczby cyst o 59% po immunizacji rROP2+rROP4+rGRA4 • myszy C3H/HeJ redukcja liczby cyst o 71% po immunizacji rROP2+rROP4+rSAG1 • myszy C57BL/6 redukcja liczby cyst o 55% po immunizacji rROP2+rGRA4+rSAG1 • myszy C57BL/6 redukcja liczby cyst o 41% po immunizacji rROP2+rROP4+rGRA4 • myszy C57BL/6 redukcja liczby cyst o 90% po immunizacji rROP2+rROP4+rSAG1 • indukcja odpowiedzi komórkowej i humoralnej 	Dziadek i wsp., 2011
rSAG1/2	-	BALB/c	podskórnie	szczep RH, tachyzoity, dootrzewnowo	<ul style="list-style-type: none"> • zdecydowany wzrost przeżywalności • silna odpowiedź humoralna 	Lau i wsp., 2011
seGRA4 ₂₃₁₋₂₄₅ - GRA1 ₁₇₆₋₁₈₆ - SAG1 ₅₉₋₆₇	CFA/IFA	BALB/c Kunming	domięśniowo	szczep GJS, tachyzoity, dootrzewnowo	<ul style="list-style-type: none"> • wydłużenie czasu przeżycia • odpowiedź typu 1 i 2 	Wang i wsp., 2011

Tab. 6 c.d. Wyniki badań dotyczących szczepionek pojednostkowych złożonych z natywnych lub rekombinantowych antygenów *T. gondii*.

Antygen	Adiuwant	Szczep myszy	Droga podania białka	Zarażenie <i>T. gondii</i>	Wyniki	Literatura
Mieszanki: rROP2+rGRA4+ rSAG1 rROP2+rROP4+ rGRA4 rROP2+rROP4+ rSAG1	IFA	BALB/c	podskórnice	szczep DX, cysty tkankowe, dootrzewnowo	<ul style="list-style-type: none"> redukcja liczby cyst o 46% po immunizacji rROP2+rGRA4+rSAG1 redukcja liczby cyst o 84% po immunizacji rROP2+rROP4+rGRA4 redukcja liczby cyst o 77% po immunizacji rROP2+rROP4+rSAG1 indukcja odpowiedzi komórkowej i humoralnej 	Dziadek i wsp., 2012
rSAG1	Vet L-10 PLG	BALB/c	dootrzewnowo	szczep RH, tachyzoity, podskórnice	<ul style="list-style-type: none"> indukcja silnej odpowiedzi komórkowej i humoralnej w przypadku myszy immunizowanych rSAG1+adjuwant 20% przeżywalność myszy immunizowanych rSAG1+Vet L10 80% przeżywalność myszy immunizowanych rSAG1+LPG 	Chuang i wsp., 2013a
rSAG1/2	Vet L-10 PLG	BALB/c	dootrzewnowo	szczep RH, tachyzoity, podskórnice	<ul style="list-style-type: none"> indukcja silnej odpowiedzi komórkowej i humoralnej w przypadku myszy immunizowanych rSAG1/2+adjuwant 25% przeżywalność myszy immunizowanych rSAG1/2+Vet L10 83% przeżywalność myszy immunizowanych rSAG1/2+LPG 	Chuang i wsp., 2013b

Objaśnienia skrótów: *Tg* – antygen natywny *T. gondii*; se – syntetyczny epitop; MAP – wielokrotne powtórzenia epitopu; r – antygen rekombinantowy; CFA – kompletny adjuwant Freund; Quil A – adjuwant saponinowy; IFA – niekompletny adjuwant Freund; CT – toksyny cholery; ISCOM – adjuwant immunostymulujący (połączenie cholesterolu, fosfolipidu, Quil A); GST – transferaza S-glutationowa; IL-12 – interleukina 12; BCG – rekombinowany szczep BCG *Mycobacterium bovis*; LT – labilna enterotoksyna *Escherichia coli*; BSA – surowicza albumina wołowa; MPL – monofosforylowy lipid A; BMDCs – komórki dendrytyczne szpiku kostnego; PADRE – epitop komórek T CD4+ o sekwencji AKFVAAWTLKAAA; GLA-SE – MPL z syntetycznym ligandem błonowego receptora TLR4; PLG – kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego

1.7.1. Zastosowanie antygenów chimerycznych w szczepionkach

Pierwszym antygenem chimerycznym wykorzystanym do immunizacji myszy był wyprodukowany w 2004 roku w systemie ekspresyjnym *E. coli* rekombinantowy antygen chimeryczny SAG1/2, który stymulował układ immunologiczny myszy do produkcji swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom SAG1 oraz SAG2 [Yang i wsp., 2004]. Do immunizacji myszy wykorzystano również antygen chimeryczny SAG1/2 wyprodukowany w drożdżowym systemie ekspresyjnym *Pichia pastoris* [Lau i wsp., 2011]. Uzyskane wyniki potwierdziły badania przeprowadzone w 2004 roku, oba antygeny rSAG1/2 charakteryzowały się zdolnością do indukcji silnej odpowiedzi komórkowej i humoralnej układu odpornościowego. Przeżywalność myszy wynosiła 73% w przypadku immunizacji bakteryjnym rSAG1/2 [Yang i wsp., 2004] oraz 77% w przypadku immunizacji drożdżowym rSAG1/2 [Lau i wsp., 2011]. W 2013 roku ponownie immunizowano myszy bakteryjnym antygenem rSAG1/2 wykorzystując polimerowe mikrokapsułki PLG (ang. Poly(Lactide-co-Glycolide)), co poskutkowało wzmocnieniem odpowiedzi układu immunologicznego oraz wzrostem przeżywalności myszy do 83% [Chuang i wsp., 2013b]. Antygen SAG1/2 został również przebadany jako szczepionka wektorowa, podana drogą pokarmową w atenuowanym szczepie *Salmonella typhimurium* zawierającym plazmid kodujący antygen SAG1/2 z podjednostką A₂/B toksyny cholery [Cong i wsp., 2005]. Mimo, iż szczepionka indukowała silną odpowiedź układu immunologicznego, przeżywalność myszy wynosiła zaledwie 40%.

W 2007 roku w systemie ekspresyjnym *P. pastoris* uzyskano rekombinantowy antygen SAG1-GRA2, który wykorzystano następnie do immunizacji myszy [Zhou i wsp., 2007]. Uzyskane wyniki potwierdziły indukcję odpowiedzi komórkowej i humoralnej, immunizacja myszy antygenem SAG1-GRA2 wydłużała również czas przeżycia myszy.

Uzyskane w 2006 roku antygeny chimeryczne rEC2 i rEC3 o dużej użyteczności diagnostycznej w kolejnych latach przebadano pod kątem ich potencjalnego zastosowania szczepionkowego [Beghetto i wsp., 2006]. W 2008 roku antygen rEC2 zastosowano jako szczepionkę wraz z antygenem rGRA7 oraz DNA plazmidowym pGRA7 [Jongert i wsp., 2008]. Obie formy szczepionki indukowały silną odpowiedź komórkową i humoralną u immunizowanych myszy, jednakże tylko mieszanina dwóch antygenów rEC2+rGRA7 wykazywała znaczące właściwości immunoprotekcyjne, redukcja liczby cyst *T. gondii* w mózgu wynosiła odpowiednio 60% i 79% w dwóch niezależnych eksperymentach. Ponadto antygeny EC2 oraz EC3 przebadano również pod względem potencjalnego zastosowania jako szczepionek DNA [Rosenberg i wsp., 2009]. W tym celu myszy immunizowano najpierw szczepionkami DNA zawierającymi fragmenty kodujące antygeny EC2 oraz EC3, a następnie zarażano *T. gondii*. Uzyskane

wyniki pozwoliły stwierdzić, iż szczepienie tymi antygenami chimerycznymi nie uodparnia całej populacji myszy. W zależności od zjadliwości szczepu *T. gondii* zdolność myszy do przeżycia znacznie się różniła. Badania mózgow myszy wykazały, iż w zależności od zastosowanego szczepu pasożyta wystąpiła redukcja cyst mózgowych u zwierząt poddanych immunizacji. Oznacza to, że o ile antygeny chimeryczne nie wywoływały całkowitego uodpornienia na pasożyta, pozwalały na zmniejszenie ekspansji do tkanek organizmu żywiciela.

Kolejny z antygenów zastosowany jako szczepionka DNA składał się z fragmentów DNA kodujących epitopy białek SAG1₅₉₋₆₇, SAG1₂₄₆₋₂₅₆, GRA1₁₇₆₋₁₈₆, ROP1₁₉₉₋₂₁₆ oraz GRA4₂₃₅₋₂₄₅ i dodatkowo kodujących podjednostkę A₂/B toksyny cholery [Cong i wsp., 2008]. Podobny antygen zawierający dodatkowo DNA epitopów białek SAG2C₃₆₋₄₄ oraz SAG2X₂₁₅₋₂₂₃ został zastosowany jako szczepionka wektorowa w atenuowanym szczepie *S. typhimurium* [Cong i wsp. 2014]. U immunizowanych myszy dochodziło do ekspresji genu kodującego białko chimeryczne, co potwierdzono za pomocą testu Western blotting. Obie szczepionki indukowały silną odpowiedź komórkową i humoralną. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano również, że obecność w białku chimerycznym podjednostek A₂/B toksyny cholery podwyższa znacząco immunogenność szczepionki. Przeprowadzone badania pokazały także, iż właściwości immunoprotekcyjne szczepionek zależą od drogi jej podania. Najefektywniejszą drogą w tym przypadku okazała się immunizacja drogą pokarmową, która wywoływała 60% przeżywalność immunizowanych myszy. W 2010 roku skonstruowano podjednostkową szczepionkę złożoną z epitopów antygenów SAG1₂₂₄₋₂₃₂, GRA6₁₆₄₋₁₇₂ i GRA7₁₃₄₋₁₄₂, która powodowała wzrost przeżywalności myszy oraz w znacznym stopniu redukowała zdolność pasożyta do rozwoju u immunizowanych myszy [Cong i wsp., 2010]. Kolejną z opisanych szczepionek epitopowych był antygen chimeryczny zbudowany z epitopów SAG1₅₉₋₆₇, GRA1₁₇₆₋₁₈₆ oraz GRA4₂₃₁₋₂₄₅. Szczepionka indukowała odpowiedź komórkową i humoralną u immunizowanych myszy, a także wydłużała czas ich przeżycia [Wang i wsp. 2011].

2. CEL PRACY

Celem pracy było skonstruowanie wydajnych systemów ekspresyjnych *E. coli* do produkcji różnych wariantów rekombinantowych antygenów chimerycznych składających się z trzech wybranych fragmentów immunodominujących antygenów GRA1, GRA2, GRA6, MAG1, MIC1, MIC3, ROP1, SAG1 oraz SAG2 pasożyta *Toxoplasma gondii*, opracowanie metodyki oczyszczania białek oraz oszacowanie ich przydatności w serodiagnostyce toksoplazmozy u ludzi i zwierząt oraz dodatkowo ocenienie właściwości immunoprotekcyjnych wybranych preparatów antygenowych na modelu mysiej toksoplazmozy.

3. MATERIAŁY

3.1. Szczepy bakteryjne

SZCZEP	GENOTYP	POCHODZENIE
<i>E. coli</i> TOP10F'	F' { <i>lacI^q</i> Tn10 (Tet ^R)}, <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deo R recA1 araD139</i> Δ(<i>araleu</i>)7697 <i>galU galK rspL endA1 nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	F' <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)	Novagen
<i>E. coli</i> Rosetta(DE3)pLacI	F' <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3) pLacIRARE (Cam ^R)	Novagen

3.2. Pasożyt *T. gondii*

W celu oceny właściwości immunoprotekcyjnych wybranych preparatów rekombinantowych antygenów chimerycznych na modelu mysiej toksoplazmozy wykorzystano cysty tkankowe szczepu DX pasożyta *T. gondii*, należącego do wewnątrzgatunkowej grupy II *T. gondii*, o niskiej zjadliwości.

3.3. Zwierzęta doświadczalne

- Mysz laboratoryjna *Mus musculus*, szczep C3H/HeOuj
- Mysz laboratoryjna *Mus musculus*, szczep C57BL/6

3.4. Materiał genetyczny

3.4.1. Wektory

WEKTOR/WIELKOŚĆ WEKTORA	GENOTYP	POCHODZENIE
pUET1 (2856 pz)	<i>ori pMB1, Ap^R, promotor T7, S-Tag[®], His-Tag[®]</i>	Kolekcja Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii PG [Dąbrowski i Kur, 1999]
pET-30 Ek/LIC (5439 pz)	<i>ori pBR322, Kan^R, promotor T7, S-Tag[®], His-Tag[®]</i>	Novagen

3.4.2. Plazmidy rekombinantowe

Plazmidy rekombinantowe pochodziły z kolekcji Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej. Zostały otrzymane przez wklonowanie do DNA wektora pUET1 DNA insertów kodujących fragmenty białek antygenowych *T. gondii*.

PLAZMID	WKŁONOWANY INSERT	LITERATURA
pUET1/GRA1	Gen kodujący fragment antygeny granul o dużej gęstości GRA1 <i>T. gondii</i> (reszty aminokwasowe od 24-190)	Hiszczyńska-Sawicka i wsp., 2003
pUET1/GRA2ex2	Gen kodujący N-końcowy fragment antygeny granul o dużej gęstości GRA2 <i>T. gondii</i> (reszty aminokwasowe od 51-185)	Holec, 2007; Holec-Gąsior i wsp., 2009
pUET1/GRA6	Gen kodujący fragment antygeny granul o dużej gęstości GRA6 <i>T. gondii</i> (reszty aminokwasowe od 30-231)	Hiszczyńska-Sawicka i wsp., 2005
pUET1/MAG1	Gen kodujący fragment antygeny macierzy cyst tkankowych MAG1 <i>T. gondii</i> (reszty aminokwasowe od 30-222)	Holec, 2007; Holec i wsp., 2007
pUET1/MIC1ex2	Gen kodujący N-końcowy fragment antygeny mikronem MIC1 <i>T. gondii</i> (reszty aminokwasowe od 25-182)	Holec, 2007; Holec i wsp., 2008
pUET1/MIC1-MAG1	Gen kodujący C-terminalny fragment antygeny mikronem MIC1 <i>T. gondii</i> (reszty aminokwasowe od 25-182) oraz fragment antygeny macierzy cyst tkankowych MAG1 <i>T. gondii</i> (reszty aminokwasowe od 30-202)	Holec-Gąsior i wsp. 2012
pUET1/MIC3	Gen kodujący fragment antygeny mikronem MIC3 <i>T. gondii</i> (reszty aminokwasowe od 67-359)	Holec, 2007
pUET1/ROP1	Gen kodujący fragment antygeny roptrii ROP1 <i>T. gondii</i> (reszty aminokwasowe od 85-398)	Holec, 2007; Holec-Gąsior i wsp., 2009
pUET1/SAG1	Gen kodujący fragment antygeny powierzchniowego SAG1 <i>T. gondii</i> (reszty aminokwasowe od 49-313)	Hiszczyńska-Sawicka i wsp., 2003
pUET1/SAG2	Gen kodujący fragment antygeny powierzchniowego SAG2 <i>T. gondii</i> (reszty aminokwasowe od 30-170)	Hiszczyńska-Sawicka i wsp., 2005

3.5. Antygeny rekombinantowe

Nizej wymienione antygeny rekombinantowe pochodziły z kolekcji Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej.

ANTYGEN	MASA [kDa]	RESZTY AMINOKWASOWE	LITERATURA
GRA1	21,9	24-190	Hiszczyńska-Sawicka i wsp., 2003
GRA2ex2	23	51-185	Holec, 2007; Holec-Gąsior i wsp., 2009
GRA6	27,2	30-231	Hiszczyńska-Sawicka i wsp., 2005
MAG1	23,8	30-222	Holec, 2007; Holec i wsp., 2007
MIC1ex2	24,5	25-182	Holec, 2007; Holec i wsp., 2008
MIC3	36,5	67-359	Holec, 2007
ROP1	39,1	85-398	Holec, 2007; Holec-Gąsior i wsp., 2009
SAG1	33,3	49-313	Hiszczyńska-Sawicka i wsp., 2003
SAG2	20,5	30-170	Hiszczyńska-Sawicka i wsp., 2005

3.6. Pożywki i podłoża bakteriologiczne

- Pożywka LB (Luria Bertani): trypton 10 g; ekstrakt drożdżowy 5 g; NaCl 10 g; woda destylowana do 1000 ml (pH = 7,0-7,2)
- Podłoże LA (Luria Bertani Agar): trypton 10 g; ekstrakt drożdżowy 10 g; NaCl 10 g; agar 15 g; woda destylowana do 1000 ml.

Wszystkie pożywki i podłoża sterylizowano 30 min, w temperaturze 120°C.

3.7. Antybiotyki

- Ampicylina – roztwór wyjściowy: 100 mg/ml H₂O
- Chloramfenikol – roztwór wyjściowy: 34 mg/ml 70% etanolu
- Kanamycyna – roztwór wyjściowy 20 mg/ml H₂O
- Tetracyklina – roztwór wyjściowy: 12,5 mg/ml 70% etanolu

3.8. Enzymy i bufor

3.8.1. Polimeraza i odczynniki do reakcji PCR

- Termostabilna polimeraza DNA *Delta3* (Blirt S.A.) – rekombinantowa hypertermostabilna polimeraza *Pwo* izolowana i oczyszczana ze szczepu *E. coli* zawierającego plazmid z wklonowanym genem z archeona *Pyrococcus woesei*.
- Bufor reakcyjny 10x*Delta3* (Blirt S.A.): 0,1 M Tris-HCl (pH 8,8 w 25°C); 0,5 M KCl; 1,5% Triton X-100
- 50 mM roztwór MgCl₂ (Blirt S.A.)
- Trifosforany deoksynukleozydów (dNTP's): dATP, dGTP, dCTP, dTTP - stężenie każdego z nukleotydów w roztworze początkowym równe 10 mM
- Jałowa woda redestylowana
- Matryca DNA do reakcji PCR – plazmidy rekombinantowe z wklonowanymi genami kodującymi odpowiednie antygeny *T. gondii*
- Startery wykorzystane do amplifikacji fragmentów genów kodujących poszczególne fragmenty antygenów *T. gondii* zebrano w tabeli poniżej.

NAZWA STARTERA/ STARTERÓW	SEKWENCJA NUKLEOTYOWA STARTERA	DLUGOŚĆ STARTERA	T _M STARTERA	%GC	AMPLIFIKOWANY GEN
Startery wykorzystane przy amplifikacji DNA fragmentów genu <i>mic1-mag1-sag1</i> (antygeny chimeryczne MIC1-MAG1-SAG1_M i MIC1-MAG1-SAG1_b)					
MIC1ex2BgIIIFor	5'-CTG CCA <u>GAT CTA GCG TCG CAT TCT CAT TCG</u> -3'	30 nt	64,4°C	53,3%	fragment genu <i>mic1ex2-mag1</i>
MAG1SAG1Rev	5'-GGC AAC AAG AGG GGG ATC ACC AGA TCC CTG AAC CC-3'	35 nt	70,3°C	60,0%	
MAG1SAG1For	5'-GGG TTC AGG GAT CTG GTG ATC CCC CTC TTG TTG CC-3'	35 nt	70,3°C	60,0%	fragmenty genów <i>sag1</i> (reszty aminokwasowe od: 49-198 – SAG1 _M <i>HindIII</i> Rev; 49-311 – SAG1 _b <i>HindIII</i> Rev)
SAG1_MHindIIIRev	5'-GGG GCC GCA AGC TTA AGA GTG CTG TCT GCA-3'	31 nt	68,3°C	61,3%	
SAG1_bHindIIIRev	5'-GGC CGC AAG CTT AGC CGA TTT TGC TGA CCC-3'	30 nt	67,1°C	60,0%	
MIC1ex2BgIIIFor + SAG1_MHindIIIRev	jw.	jw.	jw.	jw.	fragment genu <i>mic1ex2-mag1-sag1_M</i>
MIC1ex2BgIIIFor + SAG1_bHindIIIRev	jw.	jw.	jw.	jw.	fragment genu <i>mic1ex2-mag1-sag1_b</i>
Startery wykorzystane przy amplifikacji DNA fragmentów genu <i>sag1</i> (antygeny chimeryczne SAG1_M-MIC1-MAG1 i SAG1_b-MIC1-MAG1)					
SAG1BgIIIFor	5'-CAG CCC AGA TCT AGA TCC CCC TCT TGT TGC C-3'	31 nt	67,0°C	58,1%	fragmenty genów <i>sag1</i> (reszty aminokwasowe od: 49-198 – SAG1 _M <i>MIC1BsmI</i> Rev; 49-311 – SAG1 _b <i>MIC1BsmI</i> Rev)
SAG1_MMIC1BsmIRev	5'-GAA TGA GAA TGC GAC GCA AGA GTG CTG TTT GC-3'	32 nt	64,4°C	50,0%	
SAG1_bMIC1BsmIRev	5'-GAA TGA GAA TGC GAC GCA GCC GAT TTT GCT GAC-3'	33 nt	65,6°C	51,5%	
Startery wykorzystane przy amplifikacji DNA fragmentów genu <i>mag1-mic3-rop1</i> (antygen chimeryczny MAG1-MIC3-ROP1)					
MAG1BgIIIFor	5'-GAC AGC CCA GAT CTA GAC TGT GAA GAA CGA CAG G-3'	34 nt	66,8°C	53,0%	fragment genu <i>mag1</i> (reszty aminokwasowe od 107-148)
MAG1MIC3Rev	5'-GTC TTT GCA CTT GCA GTG CTG TTC TGC TGC GTG-3'	36 nt	66,7°C	50,0%	
MAG1MIC3For	5'-CAC GAG ACA GAA GAA CAG CAC TGC AAG TGC AAA GAC-3'	36 nt	66,7°C	50,0%	fragment genu <i>mic3</i> (reszty aminokwasowe od 171-310)
MIC3ROP1Rev	5'-CAG TAG TGG AGG TCC CTC CGG AGT ATC CGT TAT C-3'	34 nt	68,0°C	56,0%	
MIC3ROP1For	5'-GAT AAC GGA TAC TCC GGA GGG ACC TCC ACT ACT G-3'	34 nt	68,0°C	56,0%	fragment genu <i>rop1</i> (reszty aminokwasowe od 121-250)
ROP1HindIIIRev	5'-GGC CGC AAG CTT ACG AAC TGG TCC CTG C-3'	28 nt	67,2°C	64,0%	
MAG1BgIIIFor + MIC3ROP1Rev	jw.	jw.	jw.	jw.	fragment genu <i>mag1-mic3</i>
MAG1BgIIIFor + ROP1HindIIIRev	jw.	jw.	jw.	jw.	fragment genu <i>mag1-mic3-rop1</i>

NAZWA STARTERA/ STARTERÓW	SEKWENCJA NUKLEOTYOWA STARTERA	DLUGOŚĆ STARTERA	T _M STARTERA	%GC	AMPLIFIKOWANY GEN
Startery wykorzystane przy amplifikacji DNA fragmentów genu <i>sag2-gral-rop1</i> (antygeny chimeryczne SAG2-GRAI-ROPI_M i SAG2-GRAI-ROPI_D)					
SAG2BgIIIFor	5'-GAC AGC ACA GAT CTG ACG CCA GCG CCC ATT G -3'	31 nt	68,3°C	61,0%	fragment genu <i>sag2</i> (reszty aminokwasowe od 31-170)
SAG2GRAIRev	5'- GTT GTC GCC GCC TTC CGT GAG AGA CAC AGG -3'	30 nt	68,5°C	63,0%	
SAG2GRAIFor	5'- CCT GTG TCT CTC ACG GAA GGC GGC GAC AAC -3'	30 nt	68,5°C	63,0%	fragment genu <i>gral</i> (reszty aminokwasowe od 26-190)
GRAIROPIRev	5'- CGG GCC TCT GAC AGG CTC TCT CTC TCC TG -3'	29 nt	68,6°C	66,0%	
GRAIROPIFor	5'- CAG GAG AGA GAG AGC CTG TCA GAG GCC CG -3'	29 nt	68,6°C	66,0%	fragment genu <i>rop1</i> (reszty aminokwasowe: od 85-250 – ROPI _M <i>EcoRV</i> Rev; od 85-396 – ROPI _D <i>EcoRV</i> Rev)
ROPI_MEcoRVRev	5'-CGG ATC CGA TAT CGC ACG ACC TGG TCC CTG C -3'	31 nt	68,3°C	61,0%	
ROPI_DEcoRVRev	5'-CGG CTC CGA TAT CGC TTG CGA TCC ATC ATC CTG -3'	33 nt	68,1°C	58,0%	
SAG2BgIIIFor + GRAIROPIRev	jw.	jw.	jw.	jw.	fragment genu <i>sag2-gral</i>
SAG2BgIIIFor + ROPI_MEcoRVRev	jw.	jw.	jw.	jw.	fragment genu <i>sag2-gral-rop1_M</i>
SAG2BgIIIFor + ROPI_DEcoRVRev	jw.	jw.	jw.	jw.	fragment genu <i>sag2-gral-rop1_D</i>
Startery wykorzystane przy amplifikacji DNA fragmentów genu <i>gral-gra2-gra6</i> (antygen chimeryczny GRA1-GRA2-GRA6)					
GRA1BgIIIFor	5'-GAC AGC ACA GAT CTG GAA GGC GGC GAC AAC -3'	30 nt	67,1°C	60,0%	fragment genu <i>gral</i> (reszty aminokwasowe od 26-190)
GRA1GRA2Rev	5'- GGT GTA TGT TCA CCT TTT CCC TCT CTC TCT CCT GTT AG -3'	38 nt	66,6°C	47,4%	
GRA1GRA2For	5'- CTA ACA GGA GAG AGA GAG GGA AAA GGT GAA CAT ACA CC -3'	38 nt	66,6°C	47,4%	fragment genu <i>gra2ex2</i> (reszty aminokwasowe od 51-185)
GRA2GRA6Rev	5'- GCT GCG ACA CGG ACC TGC GAA AAG TCT GG -3'	29 nt	67,2°C	62,1%	
GRA2GRA6For	5'- CCA GAC TTT TCG CAG GTC CGT GTC GCA GC -3'	29 nt	67,2°C	62,1%	fragment genu <i>gra6</i> (reszty aminokwasowe od 40-230)
GRA6EcoRVRev	5'-CGG CGC CGA TAT CGC ATA ATC AAA CAC ATT CAC ACG -3'	36 nt	66,7°C	50,0%	
GRA1BgIIIFor + GRA2GRA6Rev	jw.	jw.	jw.	jw.	fragment genu <i>gral-gra2ex2</i>
GRA1BgIIIFor + GRA6EcoRVRev	jw.	jw.	jw.	jw.	fragment genu <i>gral-gra2ex2-gra6</i>

3.8.2. Enzymy restykcyjne i bufor do trawienia

ENZYM	MIEJSCE ROZPOZNANIA	OPTYMALNA TEMPERATURA TRAWIENIA	BUFOR DO TRAWIENIA
<i>BsmI</i> (Fermentas)	5'-GAATGCN/-3'	37°C	<p>10 x Buffer R: 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5 w 37°C); 0,1 M MgCl₂; 1 M KCl; 1 mg/ml BSA</p> <p>10 x Buffer BamHI: 0,1 M Tris-HCl (pH 8 w 37°C); 0,05 M MgCl₂; 1 M KCl; 0,2% Triton X-100; 1 mg/ml BSA</p> <p>10 x Buffer O: 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5 w 37°C); 0,1 M MgCl₂; 1 M KCl; 1 mg/ml BSA</p> <p>10 x High Buffer: 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5 w 37°C); 0,1 M MgCl₂; 1 M NaCl; 0,01 M ditiotreititol; 1 mg/ml BSA</p> <p>10 x Buffer SacI: 0,1 M Bis-Tris Propan-HCl (pH 6,5 w 37°C); 0,1 M MgCl₂; 1 mg/ml BSA</p> <p>10 x Buffer Tango: 0,33 M Tris-CH₃COOH (pH 7,9 w 37°C); 0,1 M Mg(CH₃COO)₂; 0,66 M CH₃COOK; 1 mg/ml BSA</p>
<i>EcoRV</i> (Fermentas)	5'-GAT/ATC-3'		
<i>HindIII</i> (Fermentas)	5'-A/AGCTT-3'		
<i>Hinfi</i> (Fermentas)	5'-G/ANTC-3'		
<i>XhoI</i> (Fermentas)	5'-C/TCGAG-3'		
<i>BamHI</i> (Fermentas)	5'-G/GATCC-3'		
<i>BglII</i> (Fermentas)	5'-A/GATCT-3'		
<i>DdeI</i> (Eurx)	5'-C/TNAG-3'		
<i>SacI</i> (Fermentas)	5'-GAGCT/C-3'		
<i>XbaI</i> (Fermentas)	5'-T/CTAGA-3'		

3.8.3. Ligaza i odczynniki do reakcji ligacji

- Ligaza polinukleotydowa faga T4 Fast-Link DNA Ligase (Epicentre)
- Bufor do reakcji ligacji 10 x Fast-Link Buffer (Epicentre): 330 mM Tris-CH₃COOH (pH 7.5), 660 mM CH₃COOK, 100 mM Mg(CH₃COO)₂, 5 mM ditiotreititol
- 10 mM roztwór ATP (Epicentre)

3.9. Markery wielkości

3.9.1. Markery wielkości DNA

- marker wielkości GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas; #SM0241): 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 900; 1000 pz
- marker wielkości GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas; #SM0321): 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 800; 900; 1000; 1200; 1500; 2000; 3000 pz
- marker wielkości GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas; #SM0311): 250; 500; 750; 1000; 1500; 2000; 2500; 3000; 3500; 4000; 5000; 6000; 8000; 10000 pz

3.9.2. Markery białkowe

- marker białkowy Molecular Weights – Wide Range (Sigma; S8445): 6,5; 14,2; 20; 24; 29; 36; 45; 55; 66; 97; 116; 200 kDa
- marker białkowy PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas; #SM0671): 10; 15; 25; 35; 40; 55; 70; 100; 130; 170 kDa
- marker białkowy PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas; #SM1811): 10; 15; 25; 35; 40; 55; 70; 100; 130; 250 kDa

3.10. Roztwory i bufony do elektroforezy agarozowej

- Bufor do elektroforezy agarozowej 1xTAE
- Bufor wyjściowy 50xTAE: 242 g Tris; 100 ml 0,5 M EDTA; 57 ml kwas octowy; woda destylowana do 1000 ml
- Barwnik obciążający: 0,25% błękit bromofenolowy; 40% sacharoza
- Roztwór bromku etydyny (Sigma): 5 mg/ml

3.11. Roztwory i odczynniki do elektroforezy poliakrylamidowej

- Składniki żelu poliakrylamidowego do rozdzielania białek w warunkach denaturujących (SDS-PAGE): 30% roztwór akrylamidów (29% akrylamidu, 1% N,N-metyleno-bisakrylamidu); 10% SDS (Sigma); 1,5 M Tris-HCl (pH = 8,8) (Sigma); 1 M Tris-HCl (pH = 6,8) (Sigma); 10% nadsiarczan amonu (Sigma); TEMED (Sigma); jałowa woda destylowana
5% żel zagęszczający oraz 10% i 12% żel rozdzielający przygotowano wg procedury opisanej w Sambrook i Russel, 2001
- Barwnik do nanoszenia próbek na żel: 0,25% błękit bromofenolowy; 10% glicerol; 10% SDS; 1M β-merkptoetanol; 1 M Tris (pH = 6,8)
- Roztwór barwiący do żeli poliakrylamidowych: 50% metanol; 10% kwas octowy; 0,05% Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma)
- Roztwór odbarwiający do żeli poliakrylamidowych: 40% metanol; 7% kwas octowy
- Bufor do przeprowadzenia elektroforezy poliakrylamidowej: 1 x Tris-glicyna
- Skład buforu wyjściowego 5 x Tris-glicyna (pH = 8,3): 15,1 g Tris; 94 g glicyna; 50 ml 10% SDS; woda destylowana do 1000 ml

3.12. Bufory stosowane do oczyszczania białek metodą chromatografii metalopowinowactwa oraz do regeneracji złoża

- Bufor podstawowy A o pH = 7,9: 5 mM imidazol; 20 mM Tris; 0,5 M NaCl; 0,1% Triton X-100
- Bufor płuczący MA o pH = 7,9; bufor A zawierający 5 M mocznik

- Bufor płuczący MB o pH = 7,9; bufor MA zawierający 50 mM imidazol
- Bufor B o pH = 7,9; bufor A zawierający 50 mM imidazol
- Bufor elucyjny C o pH = 7,9; bufor A zawierający 0,5 M imidazol
- Bufor do regeneracji kolumny: 50 mM EDTA (pH = 8,0); 1% SDS
- 0,5 M wodny roztwór NiCl₂

3.13. Zestawy do izolacji DNA

- Zestaw do izolacji plazmidowego DNA: GeneMATRIX Plasmid Miniprep DNA Purification Kit (Eurx)
- Zestaw do izolacji DNA z żelu agarozowego: GeneMATRIX Agarose-Out DNA Purification Kit (Eurx)
- Zestaw do oczyszczania DNA po reakcji PCR lub trawieniu enzymami restrykcyjnymi: GeneMATRIX PCR/DNA Clean-Up Purification Kit (Eurx)

3.14. Bufory i odczynniki stosowane do techniki Western blotting

- Bufor do elektrotransferu białek z żelu poliakrylamidowego na błonę nitrocelulozową: 12,5 mM Tris; 96 mM glicyna; 10% metanol
- Bufor TBST (pH = 7,5): 10 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20
- Bufor blokujący: bufor TBST zawierający 5% odtłuszczone mleko w proszku
- Przeciwciała:
 - anty-polihistydynowe, monoklonalne, wyznakowane peroksydazą chrzanową (Sigma);
 - skierowane przeciw domenie S-Tag (Novagen), białko S wyznakowane fosfatazą alkaliczną;
- Błona nitrocelulozowa – wielkość porów 0,45 μm (Sigma)
- Bibuła Whatman 3 MM (Sigma)
- Odczynnik do detekcji:
 - 6 mg DAB (3,3'diaminobenzzydyna, Sigma); 10 ml 0,05 M buforu Tris-HCl (pH = 7,6); 0,5 ml 30% H₂O₂
 - odczynnik BCIP/NBT (Calbiochem)

3.15. Bufory i odczynniki stosowane do testu ELISA

- Bufor węglanowy (opłaszczający) (pH = 9,6): 50 mM bufor węglanowy; 0,001% czerwień fenolowa;
- Bufor płuczący (pH = 7,4): 50 mM Tris; 0,88% NaCl; 0,1% Tween 20
- Bufor blokujący (pH = 7,2): PBS (Calbiochem); 1% BSA (Sigma); 0,05% Tween 20

- Bufor substratowy i substrat reakcji barwnej: SIGMAFAST™ OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride, Sigma)
Przygotowanie: na 20 ml jałowej wody 1 tabletkę buforu + 1 tabletkę substratu
- Roztwór stopujący reakcję barwną: 2 M H₂SO₄
- Mieszanki antygenów rekombinantowych, antygeny chimeryczne uzyskane w niniejszej pracy
- Całkowity lizat antygenowy pasożyta *T. gondii* (TLA) o stężeniu 1 µg/ml
- Frakcja elucyjna otrzymana podczas oczyszczania lizatu komórek szczepu *E. coli* Rosetta(DE3)pLacI/pUET1 lub *E. coli* Rosetta(DE3)pLacI/pET30 Ek-LIC metodą chromatografii metalopowinowactwa
- Surowice:
 - ludzkie (zebrane w ramach rutynowej diagnostyki toksoplazmozy; przebadane za pomocą urządzenia miniVIDAS, bioMérieux)

GRUPA	LICZBA SUROWIC	IgG	AWIDNOŚĆ	IgM	FAZA CHOROBY
I	41	+	niska/pośrednia	+	wczesna
II	17	+	niska/pośrednia	-	podostra
III	114	+	wysoka	+/-	przewlekła
IV	123	-	-	-	brak zarażenia

- zwierzęce (zebrane w ramach badań epidemiologicznych populacji zwierząt z terenu województwa pomorskiego, przebadane za pomocą testu Toxo-Screen DA, bioMérieux)

GRUPA ZWIERZĄT	SUROWICE UJEMNE	SUROWICE DODATNIE
KOTY	66	30
KONIE	82	36
OWCE	75	140
ŚWINIE	111	81

- Przeciwciała wyznakowane peroksydazą chrzanową:
 - przeciw ludzkim immunoglobulinom klasy IgG (JacksonImmuno Research)
 - przeciw kocim immunoglobulinom klasy IgG (JacksonImmuno Research)
 - przeciw końskim immunoglobulinom klasy (JacksonImmuno Research)
 - przeciw owczym immunoglobulinom klasy IgG (JacksonImmuno Research)
 - przeciw świńskim immunoglobulinom klasy (JacksonImmuno Research)
- Mikropłytki do testu ELISA (NUNC – Immuno™Plater, Surface – MaxiSorp)

3.16. *Inne roztwory i bufony*

- Bufor TE (pH = 8,0): 10 mM Tris; 1 mM EDTA
- Bufor PBS (Cytogen)
- Gradisol L (Aqua-Med)
- Roztwór do indukcji ekspresji genów: 1 M IPTG (Sigma)
- 100 mM roztwór CaCl₂ (Fluka)
- Odczynnik Bradford: 100 ml 85% kwas ortofosforowy; 50 ml alkohol etylowy; 100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250; woda destylowana do 1000 ml
- Niekompletny adiuwant Freund IFA (Sigma)

3.17. *Aparaty*

- Aparat do elektroforezy agarozowej Delfin (Blirt S.A.)
- Aparat do elektroforezy poliakrylamidowej (Blirt S.A.)
- Aparat do elektrotransferu (Fermentas)
- Autoklaw Omega Media (Prestige Medical)
- Czytnik płytek Multiscan FC (Thermo scientific)
- Mikroskop odwrócony (Olympus)
- Mikrowirówka typ MPW-210 (Sigma)
- pH-metr pH 210 Microprocessor (Hanna instruments)
- Termocykler GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer)
- Termoblok Thermomixer comfort (Eppendorf)
- Wirówka 3K30 POLYGEN (Sigma)
- Urządzenie do płukania płytek ELISA Wellwash AC (Thermo Scientific)
- Urządzenie do obrazowania żeli ChemiDocTM MP (Bio-Rad)
- Wytrząsarka Classic Series C24 (New Brunswick Scientific)
- Waga PLS510-3 (Kern)
- Zasilacz do elektroforezy EV 243 (Consort)

4. METODY

4.1. Hodowle bakteryjne

Hodowle bakterii *E. coli* prowadzono w pożywce LB lub na podłożu LA [Materiały 3.6], z dodatkiem odpowiednich antybiotyków [Materiały 3.7] (na 100 ml pożywki/podłoża przypadało odpowiednio 100 μ l poszczególnych antybiotyków). Do bulionu odżywczego komórki zaszczepiano za pomocą ezy lub poprzez dodatek hodowli płynnej, na podłoże stałe wysiewano komórki eżą lub wcierano hodowlę płynną za pomocą głaszczki. Hodowlę inkubowano w wytrząsarce powietrznej lub w cieplarni przez noc (18-24 godz.) w temperaturze 30°C lub 37°C. Jeśli było to konieczne hodowle na podłożu stałym przechowywano w lodówce.

4.2. Amplifikacja fragmentów genów kodujących poszczególne białka *T.gondii*

Przeprowadzono standardowe reakcje PCR przy wykorzystaniu polimerazy DNA *Delta3* [Materiały 3.8.1]. Amplifikacja DNA poszczególnych fragmentów genów w większości przypadków przebiegała wieloetapowo. Do mieszaniny reakcyjnej dodawano odpowiedni bufor reakcyjny, pozostałe odczynniki oraz startery [Materiały 3.8.1]. Profile temperaturowo-czasowe niezależnie od zastosowanej pary starterów były podobne, ewentualnie różniły się nieznacznie czasem wydłużania starterów.

4.2.1. Standardowa reakcja PCR

- Skład mieszaniny reakcyjnej dla standardowej reakcji PCR:

SKŁADNIK [μ l]	PRÓBKA	KONTROLA
50 mM MgCl ₂	2,5	2,5
10 x Bufor reakcyjny <i>Delta3</i>	5	5
Redestylowana woda jałowa	31,5	32,5
10 mM dNTP's	5	5
10 μ M starter I	2	2
10 μ M starter II	2	2
Matryca DNA	1	-
Polimeraza DNA <i>Delta3</i>	1	1
Objętość końcowa	50	50

- Profil temperaturowo-czasowy dla standardowej reakcji PCR:

PROCES	TEMPERATURA [°C]	CZAS [s]	LICZBA CYKLI
Denaturacja wstępna	94	300	1
Denaturacja	94	45	35
Przyłączanie starterów	64	45	
Wydłużanie starterów	72	30-45	
Wydłużanie końcowe	72	420	1
Chłodzenie	4	∞	1

4.2.2. Otrzymywanie matrycy DNA do reakcji PCR podczas składania genów

- Skład mieszaniny reakcyjnej do uzyskania matrycy DNA do amplifikacji genu kodującego połączone białka:

SKŁADNIK [μl]	PRÓBKA
50 mM MgCl ₂	2,5
10 x Bufor reakcyjny <i>Delta3</i>	5
Redestylowana woda jałowa	32,5
10 mM dNTP's	5
Produkt PCR1	2
Produkt PCR2	2
Polimeraza DNA <i>Delta3</i>	1
Objętość końcowa	50

- Profil temperaturowo-czasowy:

PROCES	TEMPERATURA [°C]	CZAS [s]	LICZBA CYKLI
Denaturacja	94	300	1
Przyłączanie	64	60	
Wydłużanie	72	300	
Chłodzenie	4	∞	

4.2.3. Właściwa amplifikacja DNA podczas składania genów

Do właściwej amplifikacji DNA fragmentów genów kodujących połączone białka antygenowe *T. gondii* wykorzystywano matryce uzyskane w pkt. 4.2.2. Zarówno składy mieszanin reakcyjnych jak i profile temperaturowo-czasowe były takie same jak

w przypadku przeprowadzania standardowych reakcji PCR. Mieszanki reakcyjne różniły się zastosowanymi parami starterów [Materiały 3.8.1].

4.3. Techniki wykorzystywane przy klonowaniu fragmentów DNA

4.3.1. Izolacja plazmidowego DNA

Plazmidowe DNA z 1,5 – 3 ml hodowli bakteryjnej izolowano z użyciem zestawu „GeneMATRIX Plasmid Miniprep DNA Purification Kit” (Eurx) [Materiały 3.13].

4.3.2. Izolacja fragmentu DNA z żelu agarozowego lub z próbki po obróbce enzymatycznej

Fragmenty DNA po trawieniu enzymami restrykcyjnymi oraz produkty reakcji PCR oczyszczano bezpośrednio z próbki za pomocą zestawu „GeneMATRIX PCR/DNA Clean-Up Purification Kit” (Eurx) [Materiały 3.13] lub rozdzielano w studzienkach preparatywnych w 1-2% żelu agarozowym w buforze 1 x TAE [Materiały 3.10] w warunkach standardowych elektroforezy przez 1-1,5 godz. przy napięciu równym 95 V. Wycinano z żelu bloczek agarozowy zawierający odpowiedni fragment DNA. Izolację fragmentów DNA z żelu agarozowego przeprowadzano za pomocą zestawu „GeneMATRIX Agarose-Out DNA Purification Kit” (Eurx) [Materiały 3.13].

4.3.3. Reakcja trawienia DNA (insertów, plazmidów rekombinantowych, wektorów) enzymami restrykcyjnymi

Reakcję trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi przeprowadzano za pomocą odpowiedniego enzymu restrykcyjnego w danym buforze do trawienia [Materiały 3.8.2]. Próbkę inkubowano w termobloku w temperaturze 37°C przez czas od 1,5-2 godz. Produkty reakcji trawienia rozdzielano w 1-2% żelu agarozowym, po zakończeniu rozdziału obserwowano wyniki.

- Skład mieszaniny reakcyjnej:

SKŁADNIK	OBJĘTOŚĆ KOŃCOWA [μl]			
	20	50	60	
DNA [μl]	5	10	25	30
10 x bufor reakcyjny [μl]	2	2	5	6
Enzym [μl]	1	1,5	2	2
Jałowa woda redestylowana [μl]	12	6,5	18	22

4.3.4. Reakcja ligacji

Reakcję ligacji prowadzono przez dodanie do mieszaniny reakcyjnej oczyszczonego DNA wektora/plazmidu rekombinantowego oraz DNA insertu trawionych wcześniej odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi; buforu dla ligazy DNA; roztworu ATP oraz ligazy DNA faga T4 [Materiały 3.8.3]. Tak przygotowaną mieszaninę reakcyjną inkubowano przez około 5 min w temperaturze pokojowej.

- Skład mieszaniny reakcyjnej:

SKŁADNIK	PRÓBKA [μl]
Trawiony wektor/plazmid rekombinantowy	3
Trawiony insert	9
Jałowa woda redestylowana	8,5
10 x Fast Link Buffer	2,5
10 mM ATP	1
T4 Fast-Link DNA Ligase	1
Objętość końcowa	25

4.4. Techniki elektroforetyczne

4.4.1. Elektroforeza w żelu agarozowym

Rozdział elektroforetyczny prowadzono w 1-2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny [Materiały 3.10] w standardowych warunkach elektroforezy przy napięciu 95 V przez czas 1-1,5 godz. W zależności od wielkości studzienek наносzono odpowiednio od 7-50 μl próbki + 2-5 μl barwnika obciążającego.

4.4.2. Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących

Elektroforezę prowadzono w aparacie do elektroforezy poliakrylamidowej w buforze 1x Tris-glicyna przy napięciu prądu 80 V (żel zagęszczający) i 120 V (żel rozdzielający). Do studzienki наносzono próbki o objętości 15 μl. Rozdział kończono, gdy barwnik zbliżał się do końca żelu. Żel barwiano roztworem barwiącym zawierającym Coomassie Brilliant Blue [Materiały 3.11] przez 1 godz., a następnie odbarwiano roztworem odbarwiającym [Materiały 3.11] przez 2 godz.

Przygotowanie lizatów bakteryjnych do elektroforetycznej analizy białek:

1. Wirowano 1 ml hodowli bakteryjnej;
2. Osad zawieszano w 40-500 μl TE, a następnie worteksowano próbkę;
3. W próbówce Eppendorf mieszano 10 μl przygotowanej próbki z 5 μl barwnika, a następnie worteksowano;
4. Inkubowano w temperaturze 98°C przez 10 min;

5. Wirowano próbkę i supernatant nanoszono na żel.

4.5. Transformacja komórek *E. coli*

Komórki kompetentne *E. coli* określonego szczepu oraz transformację komórek kompetentnych DNA plazmidowym wykonywano według standardowej procedury opisanej w Sambrook i Russel, 2001.

4.6. Ekspresja genów kodujących poszczególne białka rekombinantowe w układzie Tabora-Studiera w odpowiednim szczepie *E. coli*

1. Zaszczepiano komórki poszczególnych szczepów *E. coli* zawierających odpowiednie plazmidy rekombinantowe w 20-30 ml pożywki LB [Materiały 3.6] z dodatkiem odpowiednich antybiotyków [Materiały 3.7];
2. Hodowlę inkubowano z wytrząsaniem przez noc w temperaturze 30°C lub 37°C;
3. Odmładzano hodowlę, przenosząc 2 ml nocnej hodowli do 100 ml LB z tymi samymi antybiotykami;
4. Inkubowano hodowlę w tych samych warunkach do czasu, aż hodowla osiągnęła $OD_{600}=0,2$, po czym indukowano ekspresję genu poprzez dodatek roztworu IPTG [Materiały 3.16] do końcowego stężenia 1 mM;
5. Hodowlę inkubowano w temperaturze 30°C lub 37°C przez czas do 18 godz.;
6. Hodowlę wirowano przy 4000 obr./min;
7. Osad przechowywano do dalszej analizy w - 20°C.

4.7. Oczyszczanie rekombinantowych białek metodą chromatografii metalopowinowactwa

Oczyszczanie białek rekombinantowych prowadzono na kolumnie (10 ml objętości martwej) wypełnionej złożem Ni^{2+} -IDA (HisBind® Resin, Novagen).

4.7.1. Regeneracja złoża:

1. Złoże przemywano buforem do regeneracji (5 objętości złoża) [Materiały 3.12];
2. Płukano wodą (10 – 20 objętości złoża);
3. Nanoszono roztwór $NiCl_2$ (3 – 5 objętości złoża) [Materiały 3.12];
4. Płukano buforem A (5 – 10 objętości złoża) [Materiały 3.12];
5. Płukano buforem MA (5 – 10 objętości złoża) [Materiały 3.12].

4.7.2. Oczyszczanie białek rekombinantowych:

1. Osad komórek *E. coli* nadprodukcujących odpowiednie białka rekombinantowe z 100-200 ml hodowli zawieszano w 30 ml buforu MA [Materiały 3.12];
2. Dokonywano dezintegracji komórek;
3. Wirowano lizat przy 9000 obr./min przez 20 min;

4. Supernatant наносzono na kolumnę;
5. Płukano złoże buforem MA (ok. 15 objętości złoża) [Materiały 3.12];
6. Płukano złoże buforem MB (ok. 20 objętości złoża) [Materiały 3.12];
7. Białka rekombinantowe eluowano czterema - sześcioma 5 ml porcjami buforu C [Materiały 3.12].

4.8. *Oznaczanie stężenia białek metodą Bradforda*

1. Do 6 μ l preparatu dodawano 300 μ l odczynnika Bradford [Materiały 3.16] po czym inkubowano 15 min.
2. Do studzienek mikropłytki наносzono po 250 μ l odpowiednich mieszanin, a następnie mierzono absorbancję przy długości fali 595 nm.
3. Stężenie białka wyznaczono na podstawie krzywej wzorcowej sporządzonej dla roztworów BSA w zakresie stężeń 12,5 – 1000 μ g/ml.

4.9. *Test Western blotting*

1. Przeprowadzono elektroforezę białek w 10-12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących [Metody 4.4.2].
2. Wykonywano elektrotransfer białek z żelu na błonę nitrocelulozową:
 - Na powierzchni aparatu (elektroda naładowana dodatnio) umieszczano dwie bibuły Whatman o odpowiednich wymiarach, namoczone w buforze do transferu [Materiały 3.14];
 - Na bibułach umieszczano błonę nitrocelulozową, a na niej żel poliakrylamidowy nasączony w buforze do transferu [Materiały 3.14];
 - Następnie na powierzchnię żelu наносzono dwie bibuły Whatman nasączone w buforze do transferu, zamykano aparat;
 - Transfer prowadzono przy natężeniu prądu wynoszącym 0,8 mA na cm^2 żelu, przez 1 godzinę.
3. Po zakończeniu elektrotransferu błonę płukano 3x5 min w buforze TBST [Materiały 3.14].
4. Umieszczano błonę w buforze blokującym [Materiały 3.14] i inkubowano przez noc w temperaturze 4°C/
5. Błonę płukano 3x5 min w buforze TBST [Materiały 3.14]
6. Detekcja:
 - Test na obecność domen polihistydynowych:
 - Inkubowano błonę z przeciwciałami anty-polihistydynowymi [Materiały 3.14] w rozcieńczeniu 1:5000 w buforze TBST z 5% odtłuszczonym mlekiem [Materiały 3.14] przez 1 godz., z wytrząsaniem w temperaturze pokojowej;

- Błone płukano 3x5 min w buforze TBST [Materiały 3.14];
 - Wywoływano roztworem DAB do czasu pojawienia się brązowych prążków [Materiały 3.14].
- Test na obecność domeny S-Tag:
- Inkubowano błonę z przeciwciałami skierowanymi przeciw domenie S-Tag [Materiały 3.14] w rozcieńczeniu 1:4000 w buforze TBST z 5% odtłuszczonym mlekiem [Materiały 3.14] przez 1 godz., z wytrząsaniem w temperaturze pokojowej;
 - Błone płukano 3x5 min w buforze TBST [Materiały 3.14];
 - Wywoływano roztworem do detekcji zawierającym NBT + BCIP [Materiały 3.14] do czasu pojawienia się fioletowych prążków.

4.10. Test ELISA

1. Studzienki mikropłytek [Materiały 3.15] opłaszczano odpowiednim preparatem antygenowym (całkowitym lizatem antygenowym pasożyta *T. gondii* TLA; mieszaniną białek rekombinantowych; antygenem chimerycznym; oczyszczoną frakcją elucyjną *E. coli*) o określonym stężeniu w 100 µl buforu węglanowego [Materiały 3.15].
2. Płytki inkubowano w temperaturze 4°C przez noc.
3. Płukano studzienki za pomocą urządzenia do płukania płytek [Materiały 3.17] 3 razy po 300 µl buforem płuczającym [Materiały 3.15].
4. Dodawano do studzienek 100 µl buforu blokującego [Materiały 3.15] i inkubowano w temperaturze 37°C, przez 1 godz.
5. Wykonywano płukanie jak w punkcie 3.
6. Dodawano do studzienek 100 µl surowic rozcieńczonych 1:100 w buforze blokującym [Materiały 3.15] i inkubowano w temperaturze 37°C przez 1 godz.
7. Wykonywano płukanie jak w punkcie 3.
8. Dodawano do każdej studzienki po 100 µl przeciwciał II-rzędowych [Materiały 3.15] o odpowiednim rozcieńczeniu w buforze blokującym i inkubowano 1 godz. w 37°C.
9. Wykonywano płukanie jak w punkcie 3.
10. Dodawano 100 µl roztworu substratu, po czym inkubowano w ciemności 45 min w 37°C.
11. Hamowano reakcję barwną przez dodatek 100 µl 2 M kwasu siarkowego [Materiały 3.15].
12. Mierzono absorbancję przy długości fali 492 nm z wykorzystaniem czytnika płytek [Materiały 3.17].

4.11. Doświadczenia na zwierzętach

Doświadczenia przeprowadzono w Zakładzie Immunoparazytologii, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Łódzkiego na 10 – 12 tygodniowych samcach myszy szczepów wsobnych C3H/HeOuJ i C57BL/6 [Materiały 3.3] wyhodowanych w Zwierzętarni Instytutu Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii UŁ z par rodzicielskich sprowadzonych z Charles River Laboratories. Wszystkie procedury doświadczalne zostały opisane we wniosku pt: „Ocena właściwości immunoprotekcyjnych wybranych preparatów rekombinantowych antygenów chimerycznych *Toxoplasma gondii* na modelu mysiej toksoplazmozy” i zaaprobowane przez Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach nr 9 w Łodzi (zgoda nr 36/ŁB718/2014 z 14 lipca 2014 r.).

4.11.1. Pasaż *in vivo* cyst słabo zjadliwego szczepu DX *T. gondii*

W doświadczeniach z zakresu potencjału immunoprotekcyjnego badanych antygenów chimerycznych wykorzystano cystotwórczy szczep DX *T. gondii* [Materiały 3.2]. Cysty pasożyta izolowano z mózgowia myszy C57BL/6 [Materiały 3.3] z przewlekłą toksoplazmozą, homogenizowano mechanicznie, a następnie oczyszczano z tkanek mysich poprzez wirowanie ($1125 \times g$, 25 min, 4°C) w gradiencie Gradisolu L [Materiały 3.16]. Uzyskane cysty liczone z użyciem mikroskopu świetlnego i podano dootrzewnowo kolejnym myszom C57BL/6 w liczbie 5 cyst/mysz. Po upływie 4 tygodni od momentu zarażenia od zwierząt ponownie izolowano cysty, które wykorzystywano do wywołania doświadczalnej toksoplazmozy u myszy immunizowanych antygenami chimerycznymi.

4.11.2. Immunizacja myszy

Do przeprowadzenia doświadczenia wybrano 35 samców myszy C3H/HeOuJ, które losowo podzielono na 3 grupy liczące od 11-13 osobników. Zwierzęta immunizowano podskórnie w odstępach dwutygodniowych preparatami antygenów chimerycznych w PBS (grupy badane) lub samym PBS (grupa kontrolna) wraz z niekompletnym adiuwantem Freund (IFA) [Materiały 3.16] (w stosunku objętościowym 1:1), zgodnie z kalendarzem szczepień przedstawionym poniżej.

IMMUNIZACJA	DZIEŃ	DAWKA / MYSZ	
		Grupy badane	Grupa kontrolna
Dawka I	0	10 µg Ag + PBS / IFA – 0,2 ml	PBS / IFA – 0,2 ml
Dawka II	14	10 µg Ag + PBS / IFA – 0,2 ml	PBS / IFA – 0,2 ml
Dawka III	28	10 µg Ag + PBS / IFA – 0,2 ml	PBS / IFA – 0,2 ml

4.11.3. Zarażenie immunizowanych myszy cystami słabo zjadliwego szczepu DX *T. gondii*

Po 2 tygodniach od podania ostatniej dawki antygenów myszy zarażano dootrzewnowo 5 cystami mózgowymi szczepu DX *T. gondii* uzyskanymi zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 4.11.1.

4.11.4. Ocena właściwości immunoprotekcyjnych

Po 30 dniach od wywołania doświadczalnej toksoplazmozy wszystkie immunizowane myszy C3H/HeO_uJ (grupy badane i kontrolna) zostały poddane eutanazji poprzez dyslokację kręgów szyjnych. Wyizolowane mózgowia homogenizowano mechanicznie w buforze PBS [Materiały 3.16] do końcowej objętości 3 ml. Liczbę cyst określano w 25 μ l próbkach homogenatu za pomocą odwróconego mikroskopu świetlnego. Próby liczono co najmniej w dwóch powtórzeniach, a uzyskane wartości liczbowe przeliczano na całą objętość każdego homogenatu uzyskując liczbę cyst w mózgowiu poszczególnych zarażonych myszy. Następnie wyliczano średnią liczbę cyst w każdej grupie doświadczalnej i oceniano aktywność protekcyjną poszczególnych szczepionek poprzez wyznaczenie procentowego spadku średniej liczby cyst w grupach badanych w porównaniu z grupą kontrolną.

5. WYNIKI

Badania przeprowadzone w ramach niniejszej pracy miały na celu uzyskanie nowej generacji narzędzi diagnostycznych w postaci rekombinantowych antygenów chimerycznych złożonych z fragmentów immunodominujących trzech różnych białek antygenowych pasożyta *T. gondii* oraz oszacowanie ich przydatności diagnostycznej w serodiagnostyce toksoplazmozy u ludzi i zwierząt, jak również ocenę potencjalnego zastosowania szczepionkowego wybranych preparatów białkowych.

Pierwszym etapem doświadczeń było otrzymanie 8 rekombinantowych antygenów chimerycznych złożonych z różnej wielkości fragmentów białek pasożyta GRA1; GRA2; GRA6; MAG1; MIC1; MIC3; SAG1; SAG2 i ROP1. Wyboru fragmentów białek mających wchodzić w skład antygenów chimerycznych dokonano na podstawie wcześniejszych badań wykonanych w Katedrze Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej, w których oszacowano przydatność diagnostyczną pojedynczych białek rekombinantowych lub ich mieszanek.

Drugim etapem badań była ocena użyteczności serodiagnostycznej nowo wyprodukowanych antygenów chimerycznych w testach IgG ELISA z wykorzystaniem surowic ludzkich w odniesieniu do testów IgG ELISA opartych o mieszanki antygenów wchodzących w skład danego antygeny chimerycznego, jak również w stosunku do całkowitego lizatu antygenowego pasożyta *T. gondii* (TLA).

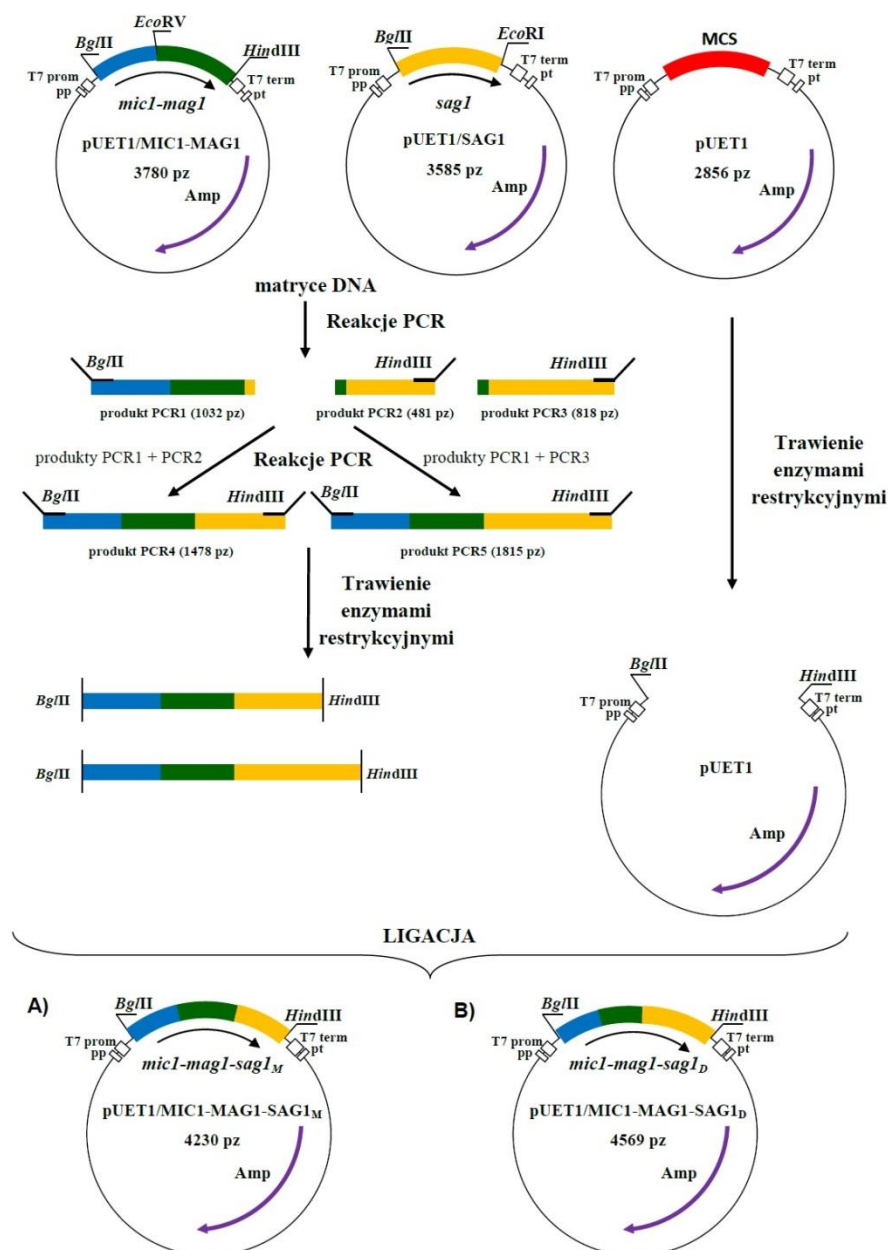
Kolejnym etapem doświadczeń było oszacowanie przydatności diagnostycznej uzyskanych antygenów chimerycznych w testach IgG ELISA z wykorzystaniem surowic zwierzęcych (kocich, końskich, owczych i świńskich). Do badań wyselekcjonowano antygeny chimeryczne, które były najlepiej rozpoznawane przez swoiste przeciwciała antytoksoplazmowe zawarte w surowicach ludzkich. Reaktywność antygenów chimerycznych ponownie odnoszono do wyników uzyskanych w testach IgG ELISA opartych o mieszanki antygenów oraz TLA.

Ostatnim etapem badań była ocena właściwości immunoprotekcyjnych wybranych preparatów rekombinantowych antygenów chimerycznych *T. gondii* na modelu mysiej toksoplazmozy. Do doświadczeń na zwierzętach wytypowano białka chimeryczne, które charakteryzowały się największą użytecznością diagnostyczną w testach immunoserologicznych z wykorzystaniem surowic ludzkich i zwierzęcych.

5.1. Konstrukcja plazmidów rekombinantowych kodujących antygeny chimeryczne

5.1.1. Konstrukcja plazmidów *pUET1/MIC1-MAG1-SAG1_M* oraz *pUET1/MIC1-MAG1-SAG1_D*

Klonowanie DNA fragmentów genów *sag1_M* oraz *sag1_D* do DNA plazmidu *pUET1/MIC1-MAG1* [Materiały 3.4.2] miało na celu otrzymanie plazmidów rekombinantowych *pUET1/MIC1-MAG1-SAG1_M* oraz *pUET1/MIC1-MAG1-SAG1_D* (Rys. 12), które umożliwią wydajną ekspresję genów kodujących chimeryczne białka rekombinantowe w komórkach *E. coli* w układzie Tabora-Studiera [Metody 4.6].



Rys. 12. Schemat konstrukcji rekombinantowych plazmidów A) *pUET1/MIC1-MAG1-SAG1_M* - zawierający gen kodujący reszty aminokwasowe od 25-182 białka MIC1, 30-202 białka MAG1 oraz 49-198 białka SAG1, B) *pUET1/MIC1-MAG1-SAG1_D* - zawierający gen kodujący reszty aminokwasowe od 25-182 białka MIC1, 30-202 białka MAG1 oraz 49-311 białka SAG1.

5.1.1.1. Amplifikacja fragmentów genów

Fragmenty DNA kodujące różne warianty białka antygenowego SAG1 oraz fragment DNA kodujący antygen chimeryczny MIC1-MAG1 uzyskano metodą PCR (Rys. 12) [Metody 4.2.1]. W celu amplifikacji DNA kodującego różne warianty antygenów chimerycznych MIC1-MAG1-SAG1_M oraz MIC1-MAG1-SAG1_D przeprowadzono kolejne dwie reakcje PCR [Metody 4.2.3] łącząc ze sobą wcześniej uzyskane produkty, co możliwe było dzięki komplementarnym 3' i 5' końcom produktów PCR.

W wyniku przeprowadzonych reakcji PCR uzyskano pożądane produkty o wielkości 1478 pz (fragment genu *mic1-mag1-sag1_M*) oraz 1815 pz (fragment genu *mic1-mag1-sag1_D*). DNA produktów PCR stanowiło fragmenty genów kodujących N-końcowy fragment białka MIC1 (reszty aminokwasowe od 25-182), fragment antygeny macierzy cyst tkankowych MAG1 (reszty aminokwasowe od 30-202) oraz fragmenty antygeny powierzchniowego SAG1 (odpowiednio reszty aminokwasowe od 49-198 oraz od 49-311). Produkty zawierały w swojej sekwencji również miejsca rozpoznania dla odpowiednich enzymów restrykcyjnych *Bg*III i *Hind*III. Produkty PCR o żądanej wielkości wyizolowano z 1,5% żelu agarozowego, oczyszczano i przechowywano do dalszych doświadczeń w temperaturze -20°C.

5.1.1.2. Klonowanie DNA fragmentów genów *mic1-mag1-sag1_M* oraz *mic1-mag1-sag1_D* do DNA wektora pUET1

Klonowanie fragmentów genów *mic1-mag1-sag1_M* oraz *mic1-mag1-sag1_D* do DNA wektora pUET1 [Materiały 3.4.1] miało na celu otrzymanie plazmidów rekombinantowych (Rys. 12), które umożliwią wydajną ekspresję genów kodujących chimeryczne białka rekombinantowe MIC1-MAG1-SAG1_M oraz MIC1-MAG1-SAG1_D (zawierające reszty aminokwasowe od 25-182 białka MIC1, 30-202 białka MAG1 oraz odpowiednio reszty aminokwasowe od 49-198 i 49-311 białka SAG1) w komórkach *E. coli* w układzie Tabora-Studiera [Metody 4.6].

- Przygotowanie insertu

DNA produktów amplifikacji PCR o wielkości odpowiednio 1478 pz i 1815 pz poddano reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi *Bg*III i *Hind*III [Materiały 3.8.2]. Użycie takich enzymów wymagało przeprowadzenia każdej z reakcji osobno. Jako pierwszą przeprowadzano reakcję trawienia enzymem restrykcyjnym *Hind*III [Metody 4.3.3], po zakończeniu reakcji trawienia produkty rozdzielano w 1% żelu agarozowym [Metody 4.4.1], po czym izolowano z żelu fragmenty DNA o wielkości odpowiednio 1465 pz oraz 1804 pz [Metody 4.3.2]. Następnie przeprowadzano drugą reakcję trawienia enzymem restrykcyjnym *Bg*III [Metody 4.3.3], po czym produkty rozdzielano elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym [Metody 4.4.1] oraz izolowano

i oczyszczano [Metody 4.3.2] fragmenty DNA o wielkości odpowiednio 1459 pz oraz 1798 pz, które wykorzystano w dalszych etapach klonowania.

- Przygotowanie plazmidu pUET1

DNA plazmidu pUET1 [Materiały 3.4.1], do którego klonowane były fragmenty genów wymagało identycznego trawienia enzymami restrykcyjnymi *Bgl*III i *Hind*III [Materiały 3.8.2] jak w przypadku przygotowania insertu. W wyniku trawienia enzymem restrykcyjnym *Hind*III [Metody 4.3.3] uzyskane DNA w formie liniowej oczyszczano [Metody 4.3.2], po czym przeprowadzono trawienie drugim enzymem restrykcyjnym *Bgl*III [Metody 4.3.3]. Uzyskane fragmenty DNA rozdzielano w 1% żelu agarozowym [Metody 4.4.1], izolowano i oczyszczano [Metody 4.3.2] pożądany fragment DNA o wielkości 2771 pz. W wyniku trawienia DNA plazmidu pUET1 enzymami restrykcyjnymi *Bgl*III i *Hind*III uzyskano fragment DNA o wielkości 2771 pz niezbędny do dalszych etapów klonowania.

- Reakcja ligacji i transformacja komórek kompetentnych *E. coli* TOP10F' mieszaniną ligacyjną

Liniowe cząsteczki DNA insertów i plazmidu pUET1 trawione enzymami restrykcyjnymi *Bgl*III i *Hind*III poddano reakcji ligacji [Metody 4.3.4]. Uzyskanymi DNA mieszanin reakcyjnych transformowano komórki kompetentne *E. coli* TOP10F' [Metody 4.5]. Transformowane komórki wysiano na płytce z podłożem LA z dodatkiem ampicyliny i tetracykliny [Materiały 3.7].

- Selekcja potencjalnych plazmidów rekombinantowych

W wyniku transformacji otrzymano kolonie bakteryjne, które pojedynczo zaszczepiano w pożywkę płynnej LB oraz w podłożu stałym LA [Materiały 3.6] z dodatkiem ampicyliny i tetracykliny [Materiały 3.7]. Hodowle prowadzono w temperaturze 37°C przez 18 godz. Po zakończeniu inkubacji izolowano plazmidowe DNA [Metody 4.3.1].

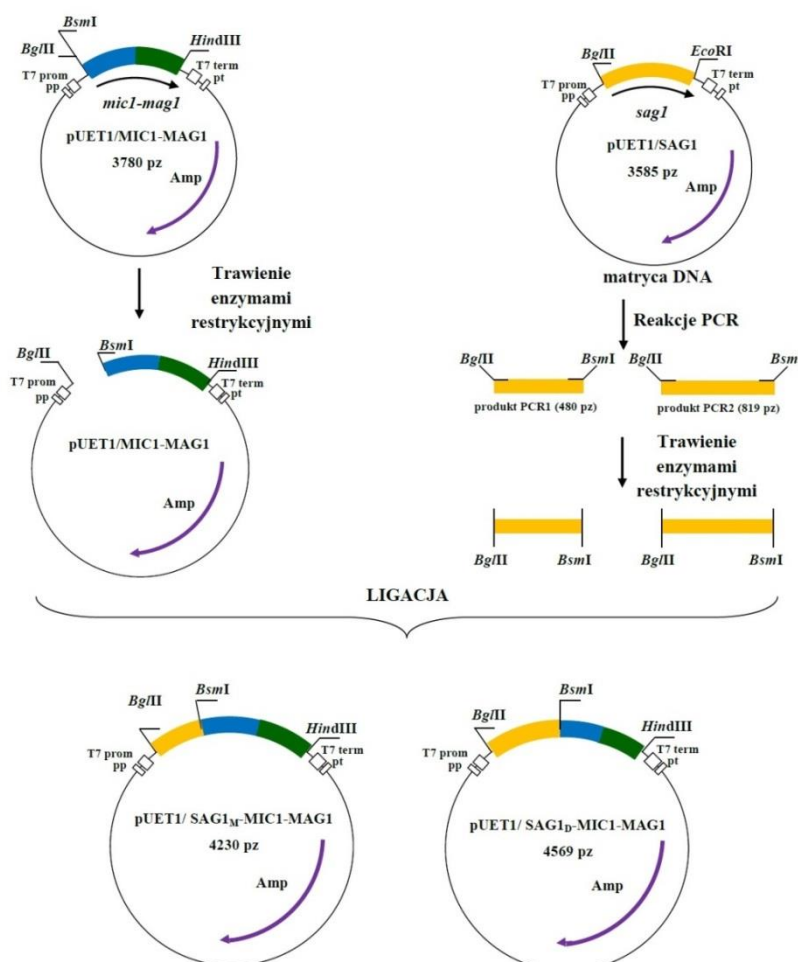
Uzyskane w wyniku izolacji plazmidowe DNA rozdzielano elektroforetycznie w 1% żelu agarozowym w celu oceny ruchliwości elektroforetycznej w stosunku do DNA plazmidu rekombinantowego pUET1/MIC1-MAG1 [Materiały 3.4.2]. Do dalszej analizy wybrano klony wykazujące opóźnienia migracji, które stanowiły potencjalne plazmidy rekombinantowe. W celu potwierdzenia, które z wytypowanych plazmidów są plazmidami rekombinantowymi przeprowadzono analizę restrykcyjną [Metody 4.3.3] z wykorzystaniem enzymów restrykcyjnych *Dde*I, *Hinf*I i *Xba*I [Materiały 3.8.2]. Przeprowadzono reakcje trawienia DNA plazmidu rekombinantowego pUET1/MIC1-MAG1 i DNA potencjalnych plazmidów rekombinantowych pUET1/MIC1-MAG1-SAG1_M i pUET1/MIC1-MAG1-SAG1_D.

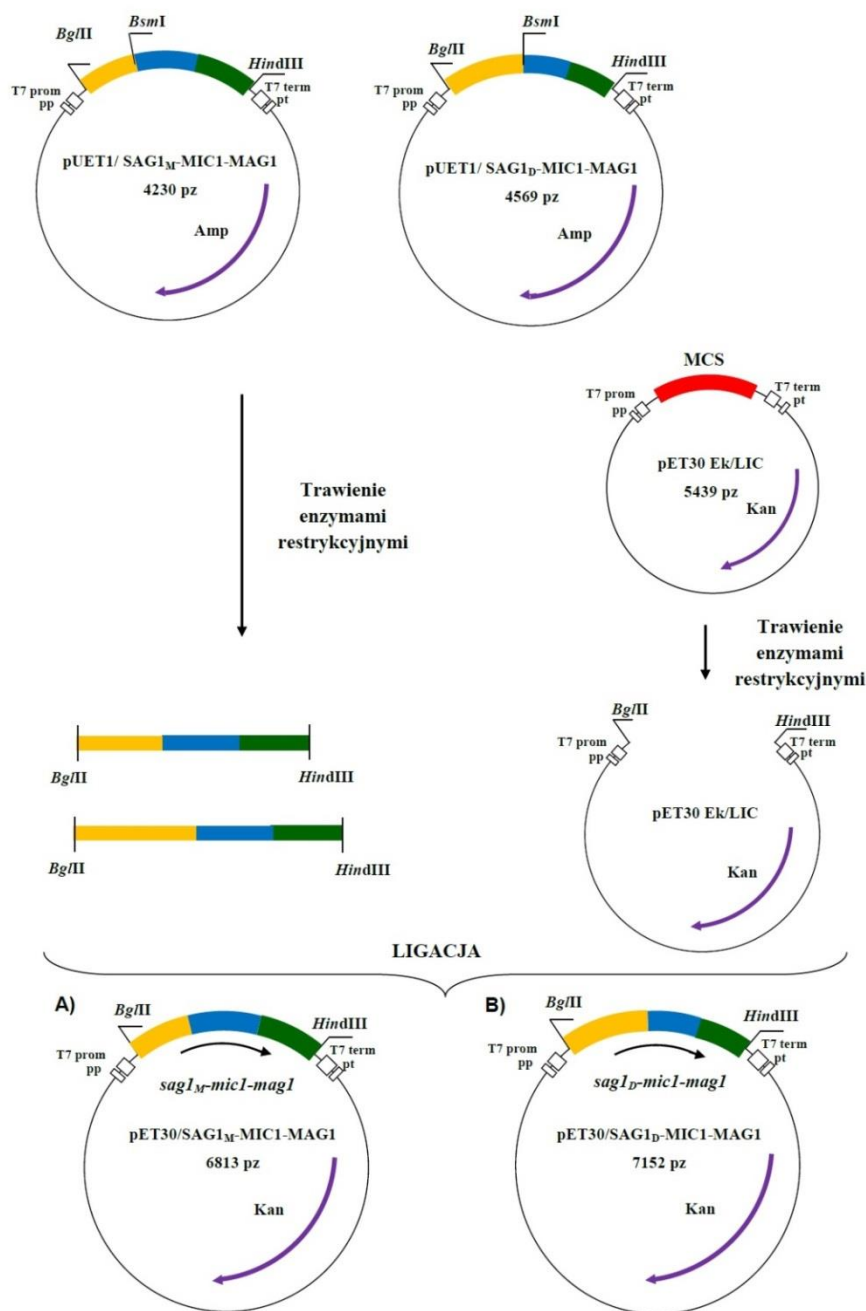
W wyniku trawienia enzymami restrykcyjnymi DNA plazmidów rekombinantowych uzyskano fragmenty DNA, które rozdzielano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym [Metody 4.4.1]. Analiza wyników rozdziału pozwoliła na

wybór poprawnie skonstruowanych plazmidów rekombinantowych pUET1/MIC1-MAG1-SAG1_M oraz pUET1/MIC1-MAG1-SAG1_D odpowiednio o wielkości 4230 pz i 4569 pz, zawierających fragment genu kodujący N-końcową część białka antygenowego MIC1, fragment genu kodujący białko antygenowe macierzy cyst tkankowych MAG1 oraz różnej długości fragmenty genu kodującego główny antygen powierzchniowy SAG1 *T. gondii*. Porównując szybkość migracji fragmentów DNA w żelu agarozowym stwierdzono obecność kilku plazmidów migrujących wolniej od plazmidu pUET1/MIC1-MAG1. Dla potwierdzenia poprawności klonowania plazmidy również zsekwencjonowano.

5.1.2. Konstrukcja plazmidów pET30/SAG1_M-MIC1-MAG1 oraz pET30/SAG1_D-MIC1-MAG1

Klonowanie DNA fragmentów genów *sag1_M-mic1-mag1* oraz *sag1_D-mic1-mag1* do DNA plazmidu pET30 Ek/LIC [Materiały 3.4.1] miało na celu otrzymanie plazmidów rekombinantowych pET30/SAG1_M-MIC1-MAG1 oraz pET30/SAG1_D-MIC1-MAG1 (Rys. 13), które umożliwią wydajną ekspresję genów kodujących chimeryczne białka rekombinantowe w komórkach *E. coli* w układzie Tabora-Studiera [Metody 4.6].





Rys. 13. Schemat konstrukcji rekombinantowych plazmidów: A) pET30/SAG1_M-MIC1-MAG1 - plazmid zawierający gen kodujący reszty aminokwasowe od 49-198 białka SAG1, 25-182 białka MIC1 oraz 30-202 białka MAG1, B) pET30/SAG1_D-MIC1-MAG1 - plazmid zawierający gen kodujący reszty aminokwasowe od 49-311 białka SAG1, 25-182 białka MIC1 oraz 30-202 białka MAG1.

5.1.2.1. Amplifikacja fragmentów genów

Fragmenty DNA kodujące różne warianty białka antygenowego SAG1 uzyskano metodą PCR [Metody 4.2.1]. W celu amplifikacji DNA fragmentów genów *sag1* jako matrycy użyto DNA plazmidu rekombinantowego pUET1/SAG1. Stosując odpowiednie pary starterów [Materiały 3.8.1] amplifikowano fragmenty genu kodujące reszty aminokwasowe od 49-198 oraz od 49-311. Dzięki odpowiednio zaprojektowanym starterom do produktów PCR wprowadzono miejsca rozpoznania dla enzymów restrykcyjnych *Bgl*II na końcu 5' oraz *Bsm*I na końcu 3'.

W wyniku przeprowadzonych reakcji PCR uzyskano pożądane produkty amplifikacji o wielkości 480 pz (fragment genu *sag1_M*) oraz 819 pz (fragment genu *sag1_D*), zawierające fragmenty genu kodujące antygen powierzchniowy SAG1 oraz miejsca rozpoznania dla enzymów restrykcyjnych *Bgl*III i *Bsm*I. Produkty PCR o żądanej wielkości wyizolowano z 1% żelu agarozowego, oczyszczano [Metody 4.3.2] i przechowywano do dalszych doświadczeń w temperaturze -20°C.

5.1.2.2. Klonowanie fragmentów genów *sag1_M-mic1-mag1* oraz *sag1_D-mic1-mag1* do DNA wektora pET30 Ek/LIC

A) Klonowanie DNA fragmentów genów *sag1_M* oraz *sag1_D* do DNA plazmidu pUET1/MIC1-MAG1

Klonowanie DNA fragmentów genów *sag1_M* oraz *sag1_D* do DNA plazmidu pUET1/MIC1-MAG1 [Materiały 3.4.2] miało na celu otrzymanie fragmentów genów *sag1_M-mic1-mag1* oraz *sag1_D-mic1-mag1*.

- Przygotowanie insertu oraz plazmidu pUET1/MIC1-MAG1

DNA produktów amplifikacji PCR o wielkości odpowiednio 480 pz i 819 pz oraz DNA plazmidu pUET1/MIC1-MAG1 [Materiał 3.4.2] poddano reakcji trawienia enzymami restrykcyjnymi *Bgl*III i *Bsm*I [Materiały 3.8.2]. Postępowano analogicznie jak w punkcie 5.1.1.2. Uzyskano fragmenty DNA o wielkości odpowiednio 462 pz (fragment genu *sag1_M*), 801 pz (fragment genu *sag1_D*) oraz 3768 pz (liniowe DNA plazmidu pUET1/MIC1-MAG1), które wykorzystano w dalszych etapach klonowania.

- Reakcja ligacji i transformacja komórek kompetentnych *E. coli* TOP10F' mieszaniną ligacyjną

Liniowe cząsteczki DNA insertów i plazmidu pUET1/MIC1-MAG1 trawione enzymami restrykcyjnymi *Bgl*III i *Bsm*I poddano reakcji ligacji [Metody 4.3.4]. Następnie postępowano analogicznie jak w punkcie 5.1.1.2.

- Selekcja potencjalnych plazmidów rekombinantowych

Postępowano analogicznie jak w punkcie 5.1.1.2. Do analizy restrykcyjnej wykorzystano enzymy *Dde*I, *Hinf*I i *Xba*I [Materiał 3.8.2].

Otrzymano plazmidy rekombinantowe pUET1/SAG1_M-MIC1-MAG1 i pUET1/SAG1_D-MIC1-MAG1 odpowiednio o wielkości 4230 pz i 4569 pz, zawierające różnej długości fragmenty genu kodującego główny antygen powierzchniowy SAG1, fragment genu kodujący N-końcową część białka antygenowego MIC1 oraz fragment genu kodujący białko antygenowe macierzy cyst tkankowych MAG1 *T. gondii*. Porównując szybkość migracji DNA plazmidowego w żelu agarozowym stwierdzono obecność kilku plazmidów migrujących wolniej od plazmidu pUET1/MIC1-MAG1. Potencjalne plazmidy rekombinantowe poddano analizie restrykcyjnej z wykorzystaniem trzech enzymów restrykcyjnych (*Dde*I, *Hinf*I, *Xba*I), która potwierdziła poprawność skonstruowanych plazmidów rekombinantowych.

B) Przeklonowanie fragmentów genów *sag1_M-mic1-mag1* oraz *sag1_D-mic1-mag1* do DNA wektora pET30 Ek/LIC

W związku z brakiem ekspresji genów kodujących białka SAG1_M-MIC1-MAG1 oraz SAG1_D-MIC1-MAG1 w wektorze ekspresyjnym pUET1, przeklonowano DNA fragmentów genów *sag1_M-mic1-mag1* oraz *sag1_D-mic1-mag1* do DNA wektora ekspresyjnego pET30 Ek/LIC.

- Przygotowanie insertów i wektora ekspresyjnego

DNA plazmidów rekombinantowych pUET1/SAG1_M-MIC1-MAG1 i pUET1/SAG1_D-MIC1-MAG1 oraz DNA wektora pET30 Ek/LIC trawiono enzymami restrykcyjnymi *Bgl*III i *Hind*III [Materiały 3.8.2]. Postępowano analogicznie jak w punkcie 5.1.1.2. W wyniku trawienia DNA plazmidów rekombinantowych oraz DNA wektora ekspresyjnego enzymami restrykcyjnymi *Bgl*III i *Hind*III uzyskano pożądane fragmenty DNA o wielkości 1459 pz, 1798 pz oraz 5354 pz niezbędne do dalszych etapów klonowania.

- Reakcja ligacji i transformacja komórek kompetentnych *E. coli* TOP10F' mieszaniną ligacyjną

Liniowe cząsteczki DNA insertów i wektora trawione enzymami restrykcyjnymi *Bgl*III i *Hind*III poddano reakcji ligacji [Metody 4.3.4]. Uzyskanymi DNA mieszanin reakcyjnych transformowano komórki kompetentne *E. coli* TOP10F' [Metody 4.5]. Transformowane komórki wysiano na płytce z podłożem LA z dodatkiem kanamycyny i tetracykliny [Materiały 3.7].

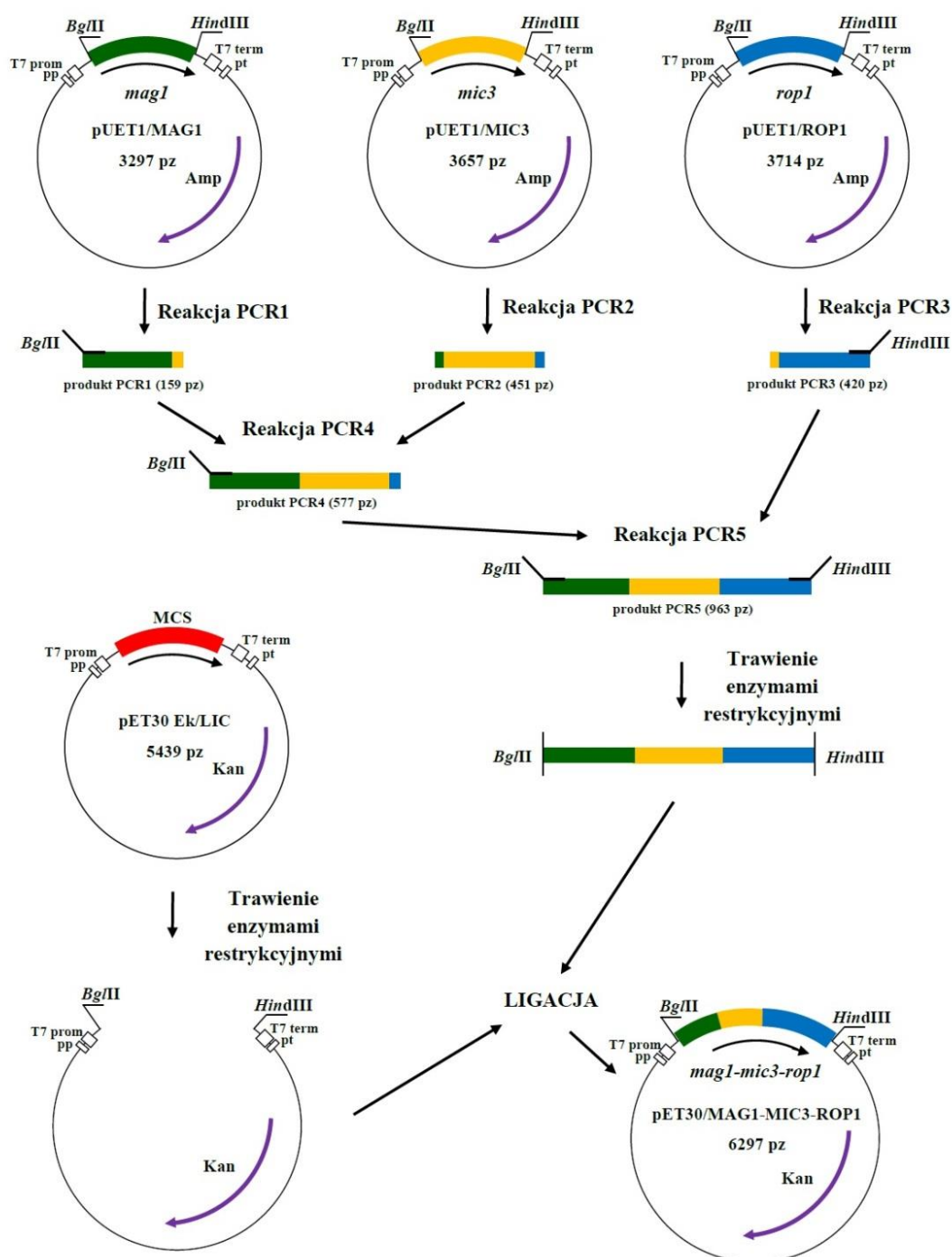
- Selekcja potencjalnych plazmidów rekombinantowych

Postępowano analogicznie jak w punkcie 5.1.1.2. Do analizy restrykcyjnej wykorzystano enzymy *Dde*I, *Hin*fI i *Xba*I [Materiały 3.8.2].

Wytypowane plazmidy zsekwencjonowano, co pozwoliło na potwierdzenie poprawności konstrukcji plazmidów rekombinantowych pET30/SAG1_M-MIC1-MAG1 oraz pET30/SAG1_D-MIC1-MAG1 odpowiednio o wielkości 6813 pz i 7152 pz, zawierających fragmenty genów kodujących główny antygen powierzchniowy SAG1, N-końcową część białka antygenowego MIC1, fragment genu kodujący białko antygenowe macierzy cyst tkankowych MAG1 *T. gondii*.

5.1.3. Konstrukcja plazmidu pET30/MAG1-MIC3-ROP1

Klonowanie DNA fragmentu genu *mag1-mic3-rop1* do DNA plazmidu pET30 Ek/LIC [Materiały 3.4.1] miało na celu otrzymanie plazmidu rekombinantowego pET30/MAG1-MIC3-ROP1 (Rys. 14), który umożliwi wydajną ekspresję genu kodującego chimeryczne białko rekombinantowe w komórkach *E. coli* w układzie Tabora-Studiera [Metody 4.6].



Rys. 14. Schemat konstrukcji rekombinantowego plazmidu pET30/MAG1-MIC3-ROP1 zawierającego fragmenty genów kodujących reszty aminokwasowe od 107-148 białka MAG1, 171-310 białka MIC3 oraz 121-250 białka ROP1.

5.1.3.1. Amplifikacja fragmentów genów

Fragmenty DNA kodujące regiony immunodominujące białek antygenowych MAG1, MIC3 oraz ROP1 uzyskano metodą PCR. W celu amplifikacji DNA kodującego antygen chimeryczny MAG1-MIC3-ROP1 przeprowadzono kolejne następujące po sobie reakcje PCR łącząc ze sobą wcześniej uzyskane produkty, co możliwe było dzięki komplementarnym 3' i 5' końcom produktów PCR (Rys. 14).

W wyniku przeprowadzenia szeregu reakcji PCR uzyskano pożądaný produkt o wielkości 963 pz. DNA finalnego produktu PCR stanowiło połączone fragmenty genów kodujących część antygeny macierzy cyst tkankowych MAG1 (reszty aminokwasowe od 107-148), fragment antygeny mikronem MIC3 (reszty aminokwasowe od 171-310) oraz fragment antygeny roptrii ROP1 (reszty aminokwasowe od 121-250). Produkt PCR zawierał w swojej sekwencji również miejsca rozpoznania dla odpowiednich enzymów restrykcyjnych *Bgl*III i *Hind*III. Produkt PCR o żądanej wielkości wyizolowano z 1,5% żelu agarozowego, oczyszczano [Metody 4.3.2] i przechowywano do dalszych doświadczeń w temperaturze -20°C.

5.1.3.2. Klonowanie DNA fragmentu genu *mag1-mic3-rop1* do DNA wektora pET30 Ek/LIC

- Przygotowanie insertu i wektora ekspresyjnego

DNA produktu amplifikacji PCR o wielkości 963 pz oraz DNA wektora pET30 Ek/LIC poddano reakcjom trawienia enzymami restrykcyjnymi *Bgl*III i *Hind*III [Materiały 3.8.2]. Postępowano analogicznie jak w punkcie 5.1.1.2. W wyniku trawienia DNA produktu PCR oraz DNA wektora ekspresyjnego enzymami restrykcyjnymi *Bgl*III i *Hind*III uzyskano pożądané fragmenty DNA o wielkości 943 pz oraz 5354 pz niezbędne do dalszych etapów klonowania.

- Reakcja ligacji i transformacja komórek kompetentnych *E. coli* TOP10F' mieszaniną ligacyjną

Liniowe cząsteczki DNA insertu i wektora trawione enzymami restrykcyjnymi *Bgl*III i *Hind*III poddano reakcji ligacji [Metody 4.3.4]. Następnie postępowano analogicznie jak w punkcie 5.1.2.2.

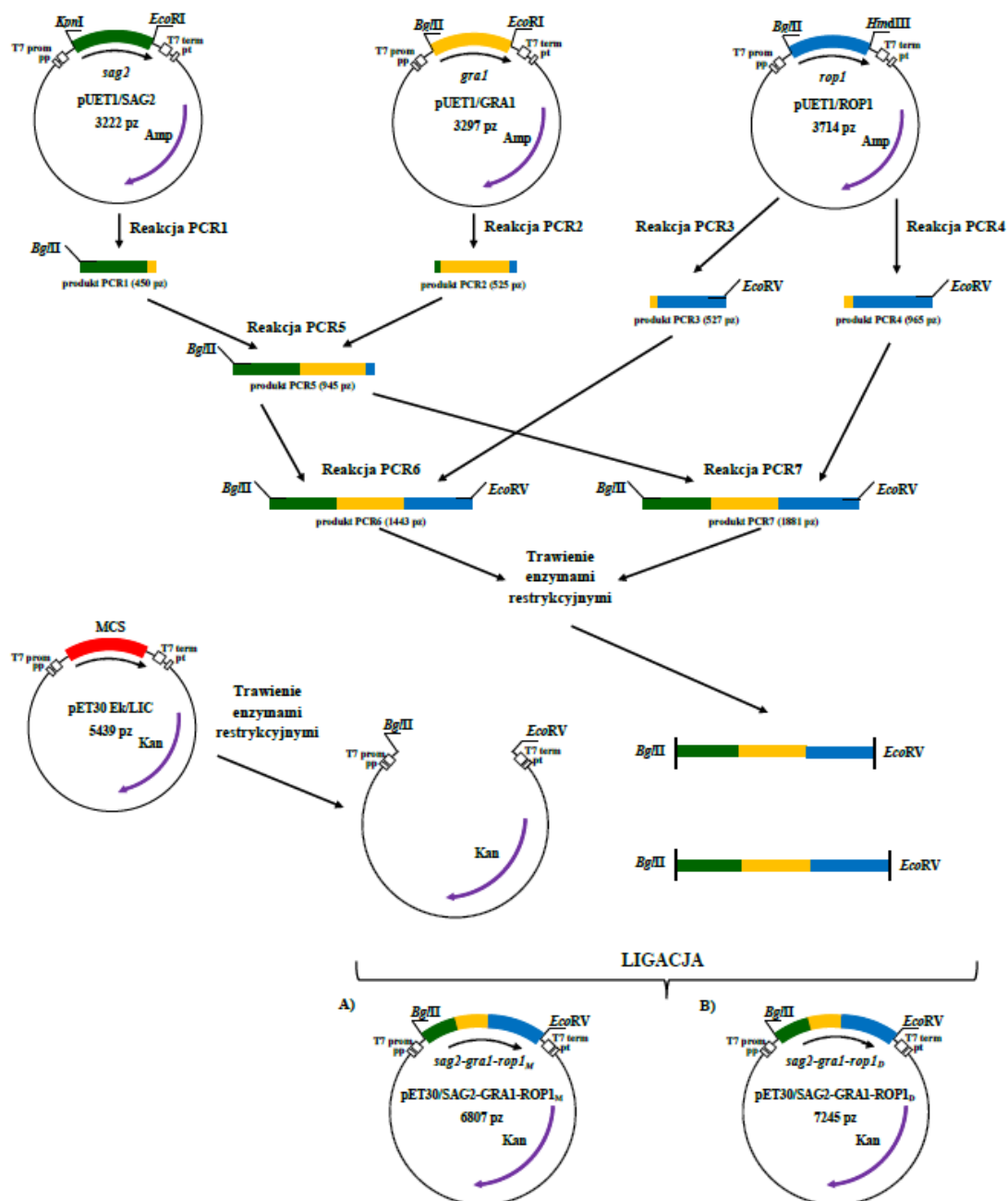
- Selekcja potencjalnych plazmidów rekombinantowych

Postępowano analogicznie jak w punkcie 5.1.1.2. Do analizy restrykcyjnej wykorzystano enzymy *Dde*I, *Hin*fI i *Xba*I [Materiały 3.8.2].

Wytypowane plazmidy zsekwencjonowano, co pozwoliło na potwierdzenie poprawności konstrukcji plazmidów rekombinantowych pET30/MAG1-MIC3-ROP1 o wielkości 6297 pz, zawierających fragmenty genów kodujących fragment immunodominujący białka antygenowego macierzy cyst tkankowych MAG1 (reszty aminokwasowe od 107-148), fragment antygeny mikronem MIC3 (reszty aminokwasowe od 171-310) oraz fragment antygeny roptrii ROP1 (reszty aminokwasowe od 121-250) *T. gondii*.

5.1.4. Konstrukcja plazmidów *pET30/SAG2-GRA1-ROP1_M* oraz *pET30/SAG2-GRA1-ROP1_D*

Klonowanie DNA fragmentów genów *sag2-gral-rop1_M* oraz *sag2-gral-rop1_D* do DNA plazmidu pET30 Ek/LIC [Materiały 3.4.1] miało na celu otrzymanie plazmidów rekombinantowych *pET30/SAG2-GRA1-ROP1_M* oraz *pET30/SAG2-GRA1-ROP1_D* (Rys. 15), które umożliwią wydajną ekspresję genów kodujących chimeryczne białka rekombinantowe w komórkach *E. coli* w układzie Tabora-Studiera [Metody 4.6].



Rys. 15. Schemat konstrukcji rekombinantowych plazmidów: A) pET30/SAG2-GRA1-ROP1_M – plazmid zawierający gen kodujący reszty aminokwasowe od 31-170 białka SAG2, 26-190 białka GRA1 oraz 85-250 białka ROP1, B) pET30/SAG2-GRA1-ROP1_D – plazmid zawierający gen kodujący reszty aminokwasowe od 31-170 białka SAG2, 26-190 białka GRA1 oraz 85-396 białka ROP1.

5.1.4.1. Amplifikacja fragmentów genów

Fragmenty DNA kodujące regiony immunodominujące białek antygenowych SAG2, GRA1 oraz ROP1 uzyskano metodą PCR. W celu amplifikacji DNA kodującego antygeny chimeryczne SAG2-GRA1-ROP1_M oraz SAG2-GRA1-ROP1_D przeprowadzono kolejne następujące po sobie reakcje PCR łącząc ze sobą wcześniej uzyskane produkty, co możliwe było dzięki komplementarnym 3' i 5' końcom produktów PCR (Rys. 15).

W wyniku przeprowadzonych reakcji PCR uzyskano pożądane produkty o wielkości 1443 pz (fragment genu *sag2-gra1-rop1_M*) oraz 1881 pz (fragment genu *sag2-gra1-rop1_D*). DNA produktów PCR stanowiło fragmenty genów kodujących fragment antygeny powierzchniowego SAG2 (reszty aminokwasowe od 31-170), fragment antygeny granul o dużej gęstości GRA1 (reszty aminokwasowe od 26-190) oraz odpowiednie fragmenty antygeny roptrii ROP1 (reszty aminokwasowe od 85-250 oraz od 85-396). Produkty zawierały w swojej sekwencji również miejsca rozpoznania dla odpowiednich enzymów restrykcyjnych *Bgl*III i *Eco*RV. Produkty PCR o żądanej wielkości wyizolowano z 1,5% żelu agarozowego, oczyszczano [Metody 4.3.2] i przechowywano do dalszych doświadczeń w temperaturze -20°C.

5.1.4.2. Klonowanie DNA fragmentów genów *sag2-gra1-rop1_M* oraz *sag2-gra1-rop1_D* do DNA wektora pET30 Ek/LIC

- Przygotowanie insertu i wektora ekspresyjnego

DNA produktów amplifikacji PCR o wielkości 1443 pz i 1881 pz oraz DNA wektora pET30 Ek/LIC poddano reakcjom trawienia enzymami restrykcyjnymi *Bgl*III i *Eco*RV [Materiały 3.8.2]. Postępowano analogicznie jak w punkcie 5.1.1.2. W wyniku trawienia DNA produktów PCR oraz DNA wektora ekspresyjnego enzymami restrykcyjnymi *Bgl*III i *Eco*RV uzyskano pożądane fragmenty DNA o wielkości 1424 pz, 1862 pz oraz 5383 pz niezbędne do dalszych etapów klonowania.

- Reakcja ligacji i transformacja komórek kompetentnych *E. coli* TOP10F' mieszaniną ligacyjną

Liniowe cząsteczki DNA insertów i wektora trawione enzymami restrykcyjnymi *Bgl*III i *Eco*RV poddano reakcji ligacji [Metody 4.3.4]. Następnie postępowano analogicznie jak w punkcie 5.1.2.2.

- Selekcja potencjalnych plazmidów rekombinantowych

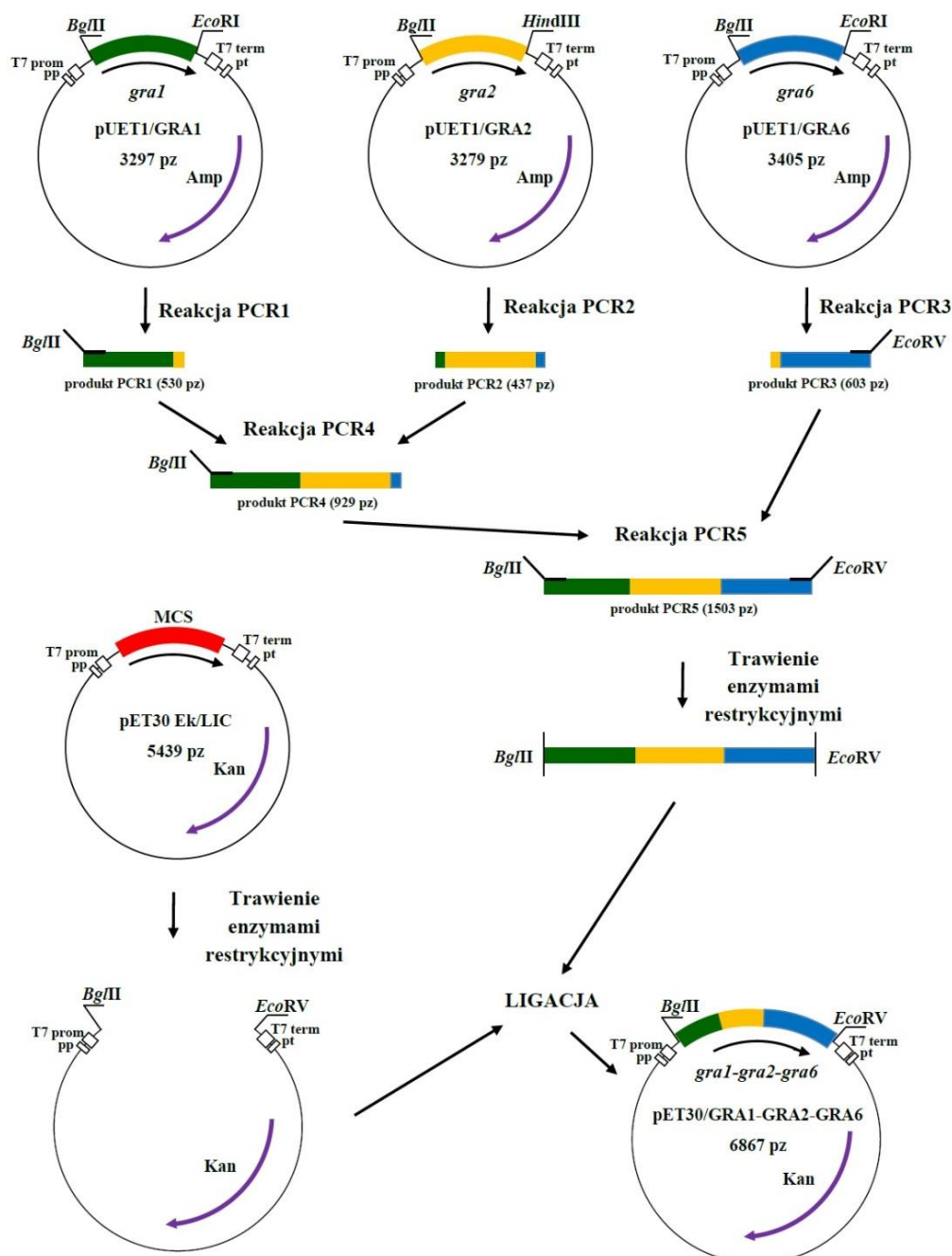
Postępowano analogicznie jak w punkcie 5.1.1.2. Do analizy restrykcyjnej wykorzystano enzymy *Dde*I, *Hind*III i *Xho*I [Materiały 3.8.2].

Otrzymano DNA plazmidów rekombinantowych pET30/SAG2-GRA1-ROP1_M oraz pET30/SAG2-GRA1-ROP1_D o wielkości odpowiednio 6807 pz i 7245 pz. Porównując szybkość migracji fragmentów DNA w żelu agarozowym stwierdzono obecność kilkunastu plazmidów migrujących wolniej od plazmidu pET30 Ek/LIC. Wybrane plazmidy poddano analizie restrykcyjnej z wykorzystaniem trzech enzymów

restrykcyjnych (*DdeI*, *HindIII* i *XhoI*), która potwierdziła poprawność skonstruowanych plazmidów rekombinantowych. Plazmidy również zsekwencjonowano.

5.1.5. Konstrukcja plazmidu pET30/GRA1-GRA2-GRA6

Klonowanie DNA fragmentu genu *gra1-gra2-gra6* do DNA plazmidu pET30 Ek/LIC [Materiały 3.4.1] miało na celu otrzymanie plazmidu rekombinantowego pET30/GRA1-GRA2-GRA6 (Rys. 16), który umożliwi wydajną ekspresję genu kodującego chimeryczne białko rekombinantowe w komórkach *E. coli* w układzie Tabora-Studiera [Metody 4.6].



Rys. 16. Schemat konstrukcji rekombinantowego plazmidu pET30/GRA1-GRA2-GRA6 zawierającego fragmenty genów kodujących reszty aminokwasowe od 26-190 białka GRA1, 51-185 białka GRA2 oraz 40-230 białka GRA6.

5.1.5.1. Amplifikacja fragmentów genów

Fragmenty DNA kodujące regiony immunodominujące białek antygenowych GRA1, GRA2 oraz GRA6 uzyskano metodą PCR. W celu amplifikacji DNA kodującego antygen chimeryczny GRA1-GRA2-GRA6 przeprowadzono kolejne następujące po sobie reakcje PCR łącząc ze sobą wcześniej uzyskane produkty, co możliwe było dzięki komplementarnym 3' i 5' końcom produktów PCR (Rys. 16).

W wyniku szeregu przeprowadzonych reakcji PCR uzyskano pożądany produkt o wielkości 1503 pz. DNA finalnego produktu PCR stanowiło połączone fragmenty genów kodujących część antygeny granul GRA1 (reszty aminokwasowe od 26-190), fragment antygeny granul GRA2 (reszty aminokwasowe od 51-185) oraz fragment antygeny granul GRA6 (reszty aminokwasowe od 40-230). Produkt PCR zawierał w swojej sekwencji również miejsca rozpoznania dla odpowiednich enzymów restrykcyjnych *Bgl*III i *Eco*RV. Produkt PCR o żądanej wielkości wyizolowano z 1,5% żelu agarozowego, oczyszczano [Metody 4.3.2] i przechowywano do dalszych doświadczeń w temperaturze -20°C.

5.1.5.2. Klonowanie DNA fragmentu genu *gra1-gra2-gra6* do DNA wektora pET30 Ek/LIC

- Przygotowanie insertu i wektora ekspresyjnego

DNA produktu amplifikacji PCR o wielkości 1503 pz oraz DNA wektora pET30 Ek/LIC poddano reakcjom trawienia enzymami restrykcyjnymi *Bgl*III i *Eco*RV [Materiały 3.8.2]. Postępowano analogicznie jak w punkcie 5.1.1.2. W wyniku trawienia DNA produktów PCR oraz DNA wektora ekspresyjnego enzymami restrykcyjnymi *Bgl*III i *Eco*RV uzyskano pożądane fragmenty DNA o wielkości 1480 pz oraz 5383 pz niezbędne do dalszych etapów klonowania.

- Reakcja ligacji i transformacja komórek kompetentnych *E. coli* TOP10F' mieszaniną ligacyjną

Liniowe cząsteczki DNA insertu i wektora trawione enzymami restrykcyjnymi *Bgl*III i *Eco*RV poddano reakcji ligacji [Metody 4.3.4]. Następnie postępowano analogicznie jak w punkcie 5.1.2.2.

- Selekcja potencjalnych plazmidów rekombinantowych

Postępowano analogicznie jak w punkcie 5.1.1.2. Do analizy restrykcyjnej wykorzystano enzymy *Dde*I, *Hinf*I i *Xho*I [Materiały 3.8.2].

Otrzymano DNA plazmidów rekombinantowych pET30/GRA1-GRA2-GRA6 o wielkości 6867 pz. Porównując szybkość migracji fragmentów DNA w żelu agarozowym stwierdzono obecność kilku plazmidów migrujących wolniej od plazmidu pET30 Ek/LIC. Wybrane plazmidy poddano analizie restrykcyjnej z wykorzystaniem trzech enzymów restrykcyjnych (*Dde*I, *Hinf*I i *Xho*I), która potwierdziła poprawność skonstruowanych plazmidów rekombinantowych. Plazmidy również zsekwencjonowano.

5.1.6. Podsumowanie

W wyniku przeprowadzonych reakcji PCR otrzymano produkty amplifikacji (Tab. 7), które stanowiły fragmenty genów kodujących poszczególne białka antygenowe pasożyta. Dzięki odpowiednio zaprojektowanym starterom reakcji PCR [Materiały 3.8.1] do powstałych produktów zostały wprowadzone:

- sekwencje rozpoznania dla odpowiednich enzymów restrykcyjnych na 3'- i 5'-końcach, co umożliwiło późniejsze klonowanie do DNA wektorów ekspresyjnych
- sekwencje komplementarne umożliwiające łączenie ze sobą fragmentów genów kodujących poszczególne białka w kolejnych reakcjach PCR.

Tab. 7. Uzyskane produkty PCR.

FRAGMENT GENU	WIELOKOŚĆ PRODUKTU PCR	RESZTY NUKLEOTYDOWE	GeneBank Accession No.
<i>mic1-mag1</i>	1032 pz	536-1009 (<i>mic1</i>)	Z71786 (<i>mic1</i>)
		890-897 i 1008-1518 (<i>mag1</i>)	U09029 (<i>mag1</i>)
<i>sag1_M</i>	481 pz	455-904	S76248
<i>sag1_D</i>	818 pz	455-1243	S76248
<i>mic1-mag1-sag1_M</i>	1478 pz	536-1009 (<i>mic1</i>)	Z71786 (<i>mic1</i>)
		890-897 i 1008-1518 (<i>mag1</i>)	U09029 (<i>mag1</i>)
		455-904 (<i>sag1</i>)	S76248 (<i>sag1</i>)
<i>mic1-mag1-sag1_D</i>	1815 pz	536-1009 (<i>mic1</i>)	Z71786 (<i>mic1</i>)
		890-897 i 1008-1518 (<i>mag1</i>)	U09029 (<i>mag1</i>)
		455-1243 (<i>sag1</i>)	S76248 (<i>sag1</i>)
		<i>sag1_M</i>	480 pz
<i>sag1_D</i>	819 pz	455-1243	S76248
<i>mag1</i>	159 pz	1231-1356	U09029
<i>mic3</i>	451 pz	1206-1625	AJ132530
<i>rop1</i>	420 pz	561-950	M71274
<i>mag1-mic3</i>	577 pz	1231-1356 (<i>mag1</i>)	U09029 (<i>mag1</i>)
		1206-1625 (<i>mic3</i>)	AJ132530 (<i>mic3</i>)
<i>mag1-mic3-rop1</i>	963 pz	1231-1356 (<i>mag1</i>)	U09029 (<i>mag1</i>)
		1206-1625 (<i>mic3</i>)	AJ132530 (<i>mic3</i>)
		561-950 (<i>rop1</i>)	M71274 (<i>rop1</i>)
<i>sag2</i>	450 pz	272-691	M33572
<i>gra1</i>	525 pz	688-1182	M26007
<i>rop1_M</i>	527 pz	453-950	M71274
<i>rop1_D</i>	965 pz	453-1388	M71274
<i>sag2-gra1</i>	945 pz	272-691	M33572 (<i>sag2</i>)
			M26007 (<i>gra1</i>)
<i>sag2-gra1-rop1_M</i>	1443 pz	272-691 (<i>sag2</i>)	M33572 (<i>sag2</i>)
		688-1182 (<i>gra1</i>)	M26007 (<i>gra1</i>)
		453-950 (<i>rop1</i>)	M71274 (<i>rop1</i>)
<i>sag2-gra1-rop1_D</i>	1881 pz	272-691 (<i>sag2</i>)	M33572 (<i>sag2</i>)
		688-1182 (<i>gra1</i>)	M26007 (<i>gra1</i>)
		453-1388 (<i>rop1</i>)	M71274 (<i>rop1</i>)
<i>gra1</i>	530 pz	688-1182	M26007
<i>gra2</i>	437 pz	1128-1532	M99392
<i>gra6</i>	603 pz	538-1110	L33814
<i>gra1-gra2</i>	929 pz	688-1182 (<i>gra1</i>)	M26007 (<i>gra1</i>)
		1128-1532 (<i>gra2</i>)	M99392 (<i>gra2</i>)
<i>gra1-gra2-gra6</i>	1503 pz	688-1182 (<i>gra1</i>)	M26007 (<i>gra1</i>)
		1128-1532 (<i>gra2</i>)	M99392 (<i>gra2</i>)
		538-1110 (<i>gra6</i>)	L33814 (<i>gra6</i>)

Uzyskane produkty PCR klonowano do DNA wektora ekspresyjnego pUET1 lub pET30 Ek/LIC, co pozwoliło na uzyskanie pożądaných rekombinantowych plazmidów ekspresyjnych (Tab. 8), które zawierały inserty kodujące rekombinantowe antygeny chimeryczne. DNA uzyskanych plazmidów poddano analizie restrykcyjnej z wykorzystaniem odpowiednich enzymów restrykcyjnych oraz sekwencjonowano, co pozwoliło potwierdzić poprawność klonowania.

Tab. 8. Otrzymane plazmidy rekombinantowe.

NAZWA PLAZMIDU	WIELKOŚĆ PLAZMIDU	INSERT	FRAGMENTY ANTYGENÓW (reszty aminokwasowe)
pUET1/MIC1-MAG1-SAG1_M	4230 pz	<i>mic1-mag1-sag1_M</i>	<ul style="list-style-type: none"> • N-końcowy fragment antygeny mikronem MIC1 (25-182) • fragment antygeny macierzy cyst tkankowych MAG1 (30-202) • N-końcowy fragment antygeny powierzchniowego SAG1 (49-198)
pUET1/MIC1-MAG1-SAG1_D	4569 pz	<i>mic1-mag1-sag1_D</i>	<ul style="list-style-type: none"> • N-końcowy fragment antygeny mikronem MIC1 (25-182) • fragment antygeny macierzy cyst tkankowych MAG1 (30-202) • fragment antygeny powierzchniowego SAG1 (49-311)
pET30/SAG1_M-MIC1-MAG1	6813 pz	<i>sag1_M-mic1-mag1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • N-końcowy fragment antygeny mikronem MIC1 (25-182) • fragment antygeny macierzy cyst tkankowych MAG1 (30-202) • N-końcowy fragment antygeny powierzchniowego SAG1 (49-198)
pET30/SAG1_D-MIC1-MAG1	7152 pz	<i>sag1_D-mic1-mag1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • N-końcowy fragment antygeny mikronem MIC1 (25-182) • fragment antygeny macierzy cyst tkankowych MAG1 (30-202) • fragment antygeny powierzchniowego SAG1 (49-311)
pET30/MAG1-MIC3-ROP1	6297 pz	<i>mag1-mic3-rop1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • fragment antygeny macierzy cyst tkankowych MAG1 (107-148) • C-końcowy fragment antygeny mikronem MIC3 (171-310) • fragment antygeny roptrii ROP1 (121-250)
pET30/SAG2-GRA1-ROP1_M	6807 pz	<i>sag2-gra1-rop1_M</i>	<ul style="list-style-type: none"> • fragment antygeny powierzchniowego SAG2 (31-170) • fragment antygeny granul o dużej gęstości GRA1 (26-190) • fragment antygeny roptrii ROP1 (85-250)
pET30/SAG2-GRA1-ROP1_D	7245 pz	<i>sag2-gra1-rop1_D</i>	<ul style="list-style-type: none"> • fragment antygeny powierzchniowego SAG2 (31-170) • fragment antygeny granul o dużej gęstości GRA1 (26-190) • fragment antygeny roptrii ROP1 (85-396)
pET30/GRA1-GRA2-GRA6	6867 pz	<i>gra1-gra2-gra6</i>	<ul style="list-style-type: none"> • fragment antygeny granul o dużej gęstości GRA1 (26-190) • C-końcowy fragment antygeny granul o dużej gęstości GRA2 (51-185) • fragment antygeny granul o dużej gęstości GRA6 (40-230)

5.2. Analiza sekwencji aminokwasowej antygenów chimerycznych

W wyniku ekspresji genów heterologicznych z poszczególnych plazmidów rekombinantowych kodujących antygeny chimeryczne powstają białka MIC1-MAG1-SAG1_M, MIC1-MAG1-SAG1_D, SAG1_M-MIC1-MAG1 oraz SAG1_D-MIC1-MAG1 (Rys. 17), MAG1-MIC3-ROP1 (Rys. 18), SAG2-GRA1-ROP1_M oraz SAG2-GRA1-ROP1_D (Rys. 19), GRA1-GRA2-GRA6 (Rys. 20) posiadające domenę S-Tag na N-końcu oraz etykiety polihistydynowe na obu końcach białka. Za pomocą programów znajdujących się na stronach www.expasy.org oraz tools.immuneepitope.org oszacowano masy cząsteczkowe i punkty izoelektryczne poszczególnych antygenów chimerycznych (Tab. 9) oraz przeprowadzono analizę potencjalnych regionów immunodominujących białek.

Tab. 9. Teoretyczne masy cząsteczkowe oraz punkty izoelektryczne rekombinantowych antygenów chimerycznych.

ANTYGEN	LICZBA RESZT AMINOKWASOWYCH	pI	Mw [kDa]
MIC1-MAG1-SAG1 _M	533	5,64	57,56
MIC1-MAG1-SAG1 _D	646	5,82	69,21
SAG1 _M -MIC1-MAG1	533	5,69	57,56
SAG1 _D -MIC1-MAG1	646	5,73	69,21
MAG1-MIC3-ROP1	361	4,61	39,13
SAG2-GRA1-ROP1 _M	531	4,46	56,35
SAG2-GRA1-ROP1 _D	677	5,18	72,21
GRA1-GRA2-GRA6	551	5,23	59,09

A) Sekwencja aminokwasowa antygeny chimerycznygo MIC1-MAG1-SAG1_M

1 MHHHHHSSG LVPRGSGMKE TAAAKFERQH MDS~~PD~~LASHS HSPASGRYIQ QMLDQRCQEI
 61 AAELCQSGLR KMCVPSSRIV ARNAVGIHQ NTLQWRCFDT ASLLESNQEN NGVNCVDDCG
 121 HTIPCPGGVH RQNSNHATRH EILSKLVEEG VQRFCS~~PY~~QA SANKYCNDKF PGTIARRSKG
 181 FGNNVEVAWR CYEKAISSQR VP~~EL~~PEVESF DEVGTGARRS GSIATLLPQD AVLYENSEDV
 241 AVPSDSASTP SYFHVESPSA SVEAATGAVG EVVPDCEERQ EQGDTT~~LS~~DH DFHSGGTEQE
 301 GLPETEVAHQ HETEEQY~~GT~~E GMPPPVLPPA PVVHPRFIAV PGPSVPV~~PP~~FF SLPDIHPDQV
 361 VYILRVQSG DPPLVANQVV TCPDKKSTAA VILTPTENHF TLKCPKTALT EPPTLAYS~~PN~~
 421 RQICPAGTTS SCTSKAVTLS SLIPEAEDSW WTGDSASLDT AGIKLTVPIE KFPVTTQTFV
 481 VGC~~IK~~GDDAQ SCMTVT~~V~~QA RASSVVNNVA RCSYGADSTL KLAAALEHHH HHH

B) Sekwencja aminokwasowa antygeny chimerycznygo MIC1-MAG1-SAG1_D

1 MHHHHHSSG LVPRGSGMKE TAAAKFERQH MDS~~PD~~LASHS HSPASGRYIQ QMLDQRCQEI
 61 AAELCQSGLR KMCVPSSRIV ARNAVGIHQ NTLQWRCFDT ASLLESNQEN NGVNCVDDCG
 121 HTIPCPGGVH RQNSNHATRH EILSKLVEEG VQRFCS~~PY~~QA SANKYCNDKF PGTIARRSKG
 181 FGNNVEVAWR CYEKAISSQR VP~~EL~~PEVESF DEVGTGARRS GSIATLLPQD AVLYENSEDV
 241 AVPSDSASTP SYFHVESPSA SVEAATGAVG EVVPDCEERQ EQGDTT~~LS~~DH DFHSGGTEQE
 301 GLPETEVAHQ HETEEQY~~GT~~E GMPPPVLPPA PVVHPRFIAV PGPSVPV~~PP~~FF SLPDIHPDQV
 361 VYILRVQSG DPPLVANQVV TCPDKKSTAA VILTPTENHF TLKCPKTALT EPPTLAYS~~PN~~
 421 RQICPAGTTS SCTSKAVTLS SLIPEAEDSW WTGDSASLDT AGIKLTVPIE KFPVTTQTFV
 481 VGC~~IK~~GDDAQ YCSGTT~~L~~TGC RASSVVNNVA RCSYGADSTL GPVKLSAEGP TTMTLVCGKD
 541 GVKVPQDNNQ YCSGTT~~L~~TGC NEKSFKDILP KLTENPWQGN ASSDKGATLT IKKEAFP~~AE~~S
 601 KSVIIGCTGG SPEKHHCTVK LEFAGAAGSA KSAKLAAALE HHHHHH

C) Sekwencja aminokwasowa antygeny chimerycznygo SAG1_M-MIC1-MAG1

1 MHHHHHSSG LVPRGSGMKE TAAAKFERQH MDSPLDLPPL VANQVVTCPD KKSTAAVILT
 61 PTENHF~~TLK~~C PKTALTEPPT LAYSPNRQIC PAGTTSSCTS KAVTLSSLIP EAEDSWWTGD
 121 SASLD~~TAGIK~~ LTVPIEKFPV TTQTFVVGCI KGDDAQSCMV TVTVQARASS VVNNVARCSY
 181 GANST~~LASHS~~ HSPASGRYIQ QMLDQRCQEI AAELCQSGLR KMCVPSSRIV ARNAVGITHQ
 241 NTLQWRCFD~~T~~ ASLLESNQEN NGVNCVDDCG HTIPC~~PGGVH~~ RQNSNHATRH EILSKLVEEG
 301 VQRFCS~~PYQA~~ SANKYCNDKF PGTIARRSKG FGNNVEVAWR CYEKAISSQR VPPELPEVESF
 361 DEVGTGARR~~S~~ GSIATLLPQD AVLYENSEDV AVPSDSASTP SYFHVESPSA SVEAATGAVG
 421 EVVPDCEERQ~~Q~~ EQGDTT~~LS~~DFHSGGTEQE GLPETEVAHQ HETEEQY~~GTE~~ GMP~~PPV~~LPPA
 481 PVVHPRFIAV~~S~~ PGSPVPV~~PF~~ SLPDIHPDQV VYILRVQSG KLAAL~~EH~~HH HHH

D) Sekwencja aminokwasowa antygeny chimerycznygo SAG1_D-MIC1-MAG1

1 MHHHHHSSG LVPRGSGMKE TAAAKFERQH MDSPLDLPPL VANQVVTCPD KKSTAAVILT
 61 PTENHF~~TLK~~C PKTALTEPPT LAYSPNRQIC PAGTTSSCTS KAVTLSSLIP EAEDSWWTGD
 121 SASLD~~TAGIK~~ LTVPIEKFPV TTQTFVVGCI KGDDAQSCMV TVTVQARASS VVNNVARCSY
 181 GANST~~LGPVK~~ LSAEGPTTMT LVCGKDGKVV PQDNNQYCSG T~~TL~~TG~~CNEKS~~ FKDILPKLSE
 241 NPWQGNASSD~~S~~ NGATLTINKE AFPAESKSVI IGCTGGSPEK HHCTVQLEFA GAAGSAKSA
 301 SHSHSPASGR~~S~~ YIQQMLDQRC QEIAAELCQS GLRKM~~VPSS~~ RIVARNAVGI THQNTLQWRC
 361 FDTASLLESN~~S~~ QENNGVNCVD DCGHTIPC~~PG~~ GVHRQNSNHA TRHEILSKLV EEGVQRFCS
 421 YQASANKYCN~~S~~ DKFPGTIARR SKGFGNNVEV AWRCYEK~~AI~~S SQRPPELPEV ESFDEVGTGA
 481 RRS~~GI~~ATLL PQDAVLYENS EDVAVPSDSA STPSYFHVES PSASVEAATG AVGEVVPDCE
 541 ERQE~~Q~~GD~~T~~TL SDHDFHSGGT EQEGLPETEV AHQHETEEQY GTEGM~~PP~~PVL PPAPV~~VH~~PRF
 601 IAVPGSPV~~P~~ PFFSLPDIHP DQVVYILRVQ GSGKLAAL~~E~~ HHHHHH

Rys. 17. Sekwencja aminokwasowa białek chimerycznych: A) MIC1-MAG1-SAG1_M (reszty aminokwasowe SAG1 od 49-198); B) MIC1-MAG1-SAG1_D (reszty aminokwasowe SAG1 od 49-311); C) SAG1_M-MIC1-MAG1 (reszty aminokwasowe SAG1 od 49-198); D) SAG1_D-MIC1-MAG1 (reszty aminokwasowe SAG1 od 49-311). Kolorem czarnym oznaczono sekwencję pochodzącą z wektora pUET1/pET30 Ek/LIC i w jej obrębie na fioletowo zaznaczono sekwencję etykiet polihistydynowych oraz na czerwono domeny S-Tag, kolorem niebieskim zaznaczono fragment sekwencji białka MIC1, zielonym fragment sekwencji białka MAG1, a pomarańczowym fragmenty sekwencji białka SAG1, dodatkowo podkreślono potencjalne determinanty antygenowe.

1 MHHHHHSSG LVPRGSGMKE TAAAKFERQH MDSPLD~~LCEE~~ RQE~~Q~~GD~~T~~TL~~S~~ DHDFHSGGTE
 61 QEGLPETEVA~~A~~ QHETEEQHC KCKDGFVGTG LTCSEDPCSK RGNACGPN~~G~~ TCIVVDSVSY
 121 TCTCGDGETL~~L~~ VNLPEGGQGC KRTGCHAFRE NCSPGRCID~~D~~ ASHENGYTCE CPTGYSREVT
 181 SKAEESCVEG~~S~~ VEVTLAEKCE KEFGISASSC KCDNGYSGGT STTESASENS EDDDTFHDAL
 241 QELPEDGLEV~~S~~ RPPTEQELPP PTEQELPPPT EQELPPSTEQ ELPPPVGEGQ RLQVPGEHGP
 301 QGPPYDDQOL~~L~~ LLEPTEEQOE GPQEPLPPP PPTRGEQPEG QPQGPV~~RKL~~ AAAL~~E~~HHHHH
 361 H

Rys. 18. Sekwencja aminokwasowa białka chimerycznego MAG1-MIC3-ROPI. Kolorem czarnym oznaczono sekwencję pochodzącą z wektora pET30 Ek/LIC i w jej obrębie na fioletowo zaznaczono sekwencję etykiet polihistydynowych oraz na czerwono domeny S-Tag, kolorem zielonym zaznaczono fragment sekwencji białka MAG1, pomarańczowym fragment sekwencji białka MIC3, a niebieskim fragmenty sekwencji białka ROPI, dodatkowo podkreślono potencjalne determinanty antygenowe.

A) Sekwencja aminokwasowa antygeny chimerycznygo SAG2-~~GRA1~~-ROPI_M

1 MHHHHHSSG LVPRGSGMKE TAAAKFERQH MDSPLDLPAP IECTAGATKT VDAPSSGSVV
 61 FQCGDKLTIS~~S~~ PSGE~~GD~~VFYG KECTDSR~~KL~~T TVLPGAVLTA KVQOPAKGPA TYT~~LS~~YDGT
 121 EKQVLCYKC~~S~~ VAEAGAPAGR NNDGSSAPT~~P~~ KDCKLIVRVP GADGRVTS~~GF~~ DPVSLTEGGD
 181 NQSSAVSDRA~~S~~ SLFGLLSGGT GQGLGIGESV DLEMMGNTYR VERPTGN~~PD~~L LKIAIKASDG
 241 SYSEVGNVNV~~S~~ EEVIDTMKSM QRDEDIFLRA LNKGETVEEA IEDVAQAEGL NSEQTLQLED
 301 AVSAVASVVQ~~S~~ DEMKVIDDVQ QLEKDKQQLK DDIGFLTGER EPV~~R~~GP~~D~~QVP ARGEAALVTE
 361 ETPAQQPAVA~~S~~ LGS~~A~~E~~G~~EGTS TTESASENS DDDTFHDALQ ELPEDGLEVR PPNAQELPPP
 421 NVQELPPPTE~~S~~ QELPPSTEQE LPPPVGEGQR LQVPGEHGPQ GPPYDDQOLL LEPTEEQOEG
 481 PQEPLPPP~~P~~ PTRGEQPEG QPQGPVRAIS DPNSSV~~DKL~~ AAAL~~E~~HHHHH H

B) Sekwencja aminokwasowa antygeny chimerycznego SAG2-GRA1-ROP1_D

1 MHHHHHSSG LVPRGSGMKE TAAAKFERQH MDSPDLTPAP IECTAGATKT VDAPSSGSVV
 61 FQCGDKLTIS PSGEDVDFYG KECTDSRKLTVLPGAVLTA KVQOPAKGPA TYTLSYDGTP
 121 EKPQVLCYCK VAEAGAPAGR NNDGSSAPT KDCKLIVRVP GADGRVTSGF DPVSLTEGGD
 181 NQSSAVSDRA SLFGLLSGGT GQGLGIGESV DLEMMGNTYR VERPTGNPDL LKIAIKASDG
 241 SYSEVGNVNV EEVIDTMKSM QRDEDIFLRA LNKGETVEEA IEDVAQAEGL NSEQTLQLED
 301 AVSAVASVVQ DEMKVIDDVQ QLEKDKQQLK DDIGFLTGER EPVVRGPDQVP ARGEAALVTE
 361 ETPAQQPAVA LGSAEEGETS TTESASENSE DDDTFHDALQ ELPEDGLEVR PPNAQELPPP
 421 NVQELPPPTE QELPPSTEQE LPPFVGEQOR LQVPGEHGPO GPPYDDQQLL LEPTEEQQEG
 481 PQEPLPPPPP PTRGEQPEGQ QPQGPVRQNF FRRALGAARS RFGGARRHVS GVFRRVRGGL
 541 NRIVGGVRSR FRRAREGVVG GVRRLTSGAS LGLRRVGEGL RRSFYRVRGA VSSGRRRAAD
 601 GASNVRRERFV AAGGRVRDAF GAGLTRLRRR GRTNGEEGRP LLGEGREQDD GSQAISDPNS
 661 SSVDKLAAAL EHHHHHH

Rys. 19. Sekwencja aminokwasowa białek chimerycznych: A) SAG2-GRA1-ROP1_M (reszty aminokwasowe ROP1 od 85-250); B) SAG2-GRA1-ROP1_D (reszty aminokwasowe ROP1 od 85-396). Kolorem czarnym oznaczono sekwencję pochodzącą z wektora pET30 Ek/LIC i w jej obrębie na fioletowo zaznaczono sekwencję etykiet polihistydynowych oraz na czerwono domeny S-Tag, kolorem zielonym zaznaczono fragment sekwencji białka SAG2, pomarańczowym fragment sekwencji białka GRA1, a niebieskim fragmenty sekwencji białka ROP1, dodatkowo podkreślono potencjalne determinanty antygenowe.

1 MHHHHHSSG LVPRGSGMKE TAAAKFERQH MDSPDLEGGD NQSSAVSDRA SLFGLLSGGT
 61 GQGLGIGESV DLEMMGNTYR VERPTGNPDL LKIAIKASDG SYSEVGNVNV EEVIDTMKSM
 121 QRDEDIFLRA LNKGETVEEA IEDVAQAEGL NSEQTLQLED AVSAVASVVQ DEMKVIDDVQ
 181 QLEKDKQQLK DDIGFLTGER EGKGEHTPPL PDERQOEPEE PVSQRASRVA EQLFRKFLKF
 241 AENVGHHSEK AFKKAKVVAE KGFTAAKTHT VRGFKVAKEA AGRGMVTVGK KLANVESDRS
 301 TTTTQAPDSP NGLAETEVPV EPQQRAAHVP VPDFSQVRVA ADSGGVKQTP SETGSSGGQQ
 361 EAVGTTEDYV NSSAMGGGQG DSLAEDDTTS EAAEGDVDPF PVLANEGKSE ARGPSLEERI
 421 EEQGTTRRRYS SVQEPQAKVP CKRTQKRHRL IGAVVLAVSV AMLTAFFLRR TGRRRSPQEPS
 481 GDGGGNDAGN NAGNGGNEGR GYGGREGGGA EDDRRPLHPE RVNVFDY AIS DPNSSVVDKL
 541 AAALHHHHH H

Rys. 20. Sekwencja aminokwasowa białka chimerycznego GRA1-GRA2-GRA6. Kolorem czarnym oznaczono sekwencję pochodzącą z wektora pET30 Ek/LIC i w jej obrębie na fioletowo zaznaczono sekwencję etykiet polihistydynowych oraz na czerwono domeny S-Tag, kolorem zielonym zaznaczono fragment sekwencji białka GRA1, pomarańczowym fragment sekwencji białka GRA2, a niebieskim fragmenty sekwencji białka GRA6, dodatkowo podkreślono potencjalne determinanty antygenowe.

5.3. Optymalizacja ekspresji genów kodujących antygeny chimeryczne

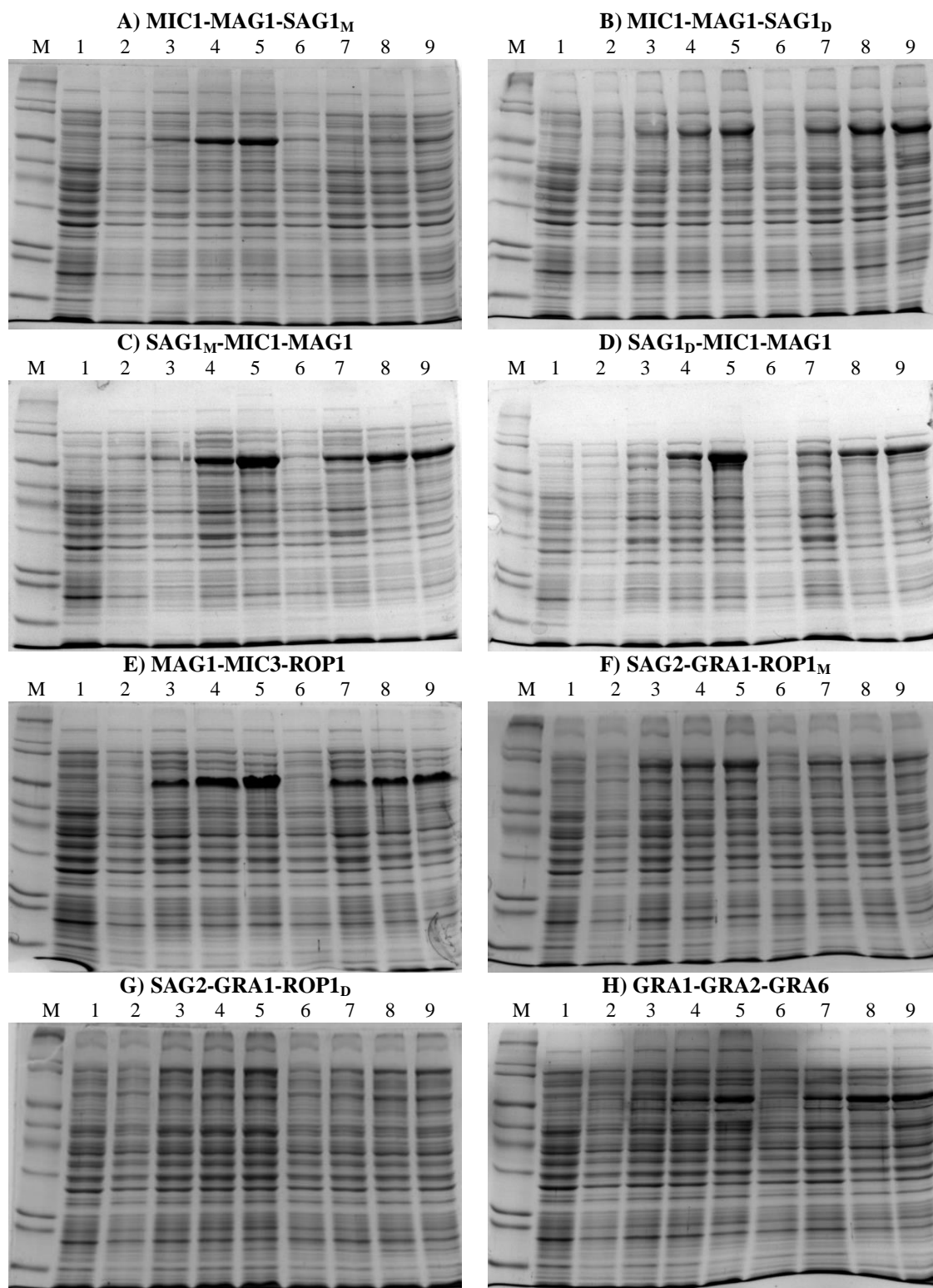
Optymalizacja ekspresji miała na celu uzyskanie możliwie wysokiej wydajności produkcji rekombinantowych białek chimerycznych poprzez wybór odpowiedniego szczepu ekspresyjnego *E. coli* oraz dobór optymalnych warunków prowadzenia hodowli tj. temperatury i czasu. Komórki *E. coli* szczepów BL21(DE3)pLysS oraz Rosetta(DE3)pLacI transformowano DNA odpowiednich plazmidów rekombinantowych według procedury opisanej w punkcie 4.5. W wyniku transformacji na podłożu LA z ampicyliną/kanamycyną i chloramfenikolem [Materiały 3.7] uzyskano kilkadziesiąt kolonii bakteryjnych. Pojedyncze kolonie bakteryjne zaszczepiano w 20-30 ml pożywki LB z dodatkiem ampicyliny/kanamycyny i chloramfenikolu i prowadzono ekspresję według procedury opisanej w punkcie 4.6. Podczas prowadzenia doświadczeń zbierano frakcje hodowli komórkowej przed indukcją IPTG, jak i w 3-godzinnych odstępach czasowych od momentu indukcji oraz frakcję z hodowli nocnej (po ok. 18 godz. od momentu indukcji). Poszczególne frakcje

wirowano przy 4000 obr/min, a osady przechowywano w -20°C do dalszej analizy. Kolejny etap polegał na zawieszeniu osadów odpowiednich frakcji w 50-400 μl buforu TE [Materiały 3.16]. Otrzymane lizaty komórkowe poddano następnie rozdziałom elektroforetycznym w 10% żelach poliakrylamidowych w warunkach denaturujących [Metody 4.4.2]. Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli 10.

Tab. 10. Wydajność ekspresji rekombinantowych antygenów chimerycznych w zależności od temperatury i wykorzystanego szczepu ekspresyjnego *E.coli*.

Produkowany antygen	Warunki prowadzenia hodowli	Szczep <i>E.coli</i>	
		BL21(DE3)pLysS	Rosetta(DE3)pLacI
MIC1-MAG1-SAG1 _M	30°C	+	+++
	37°C	+	+
MIC1-MAG1-SAG1 _D	30°C	-	++
	37°C	-	+++
SAG1 _M -MIC1-MAG1	30°C	+	+++
	37°C	+	++
SAG1 _D -MIC1-MAG1	30°C	-	+++
	37°C	-	++
MAG1-MIC3-ROP1	30°C	++	+++
	37°C	+	++
SAG2-GRA1-ROP1 _M	30°C	-	+++
	37°C	-	+
SAG2-GRA1-ROP1 _D	30°C	-	+++
	37°C	-	+
GRA1-GRA2-GRA6	30°C	+	+++
	37°C	+	+++

Objaśnienie użytych symboli: „-” – brak ekspresji; „+” – ekspresja na bardzo niskim poziomie; „++” – ekspresja na niskim poziomie; „+++” – wydajna ekspresja.



Rys. 21. Rozdział elektroforetyczny w 10% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących białek zawartych w lizatach komórek *E. coli* Rosetta(DE3)pLacI zawierających odpowiednie plazmidy rekombinantowe.

Ścieżki:

M – marker wielkości Molecular Weights Wide Range (Sigma; S8445)

1 – 10 μ l lizatu komórek *E. coli* Rosetta(DE3)pLacI

2 – 10 μ l próbki pobranej przed indukcją IPTG (30°C)

3 – 10 μ l próbki pobranej 3 h po indukcji IPTG (30°C)

4 – 10 μ l próbki pobranej 6 h po indukcji IPTG (30°C)

5 – 10 μ l próbki pobranej 18 h po indukcji IPTG (30°C)

6 – 10 μ l próbki pobranej przed indukcją IPTG (37°C)

7 – 10 μ l próbki pobranej 3 h po indukcji IPTG (37°C)

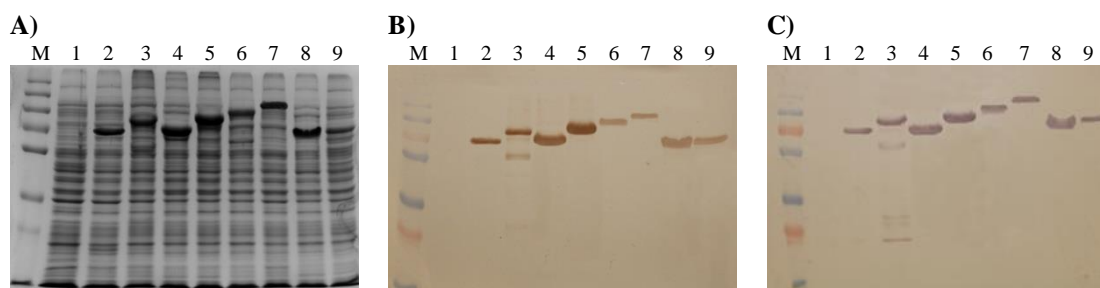
8 – 10 μ l próbki pobranej 6 h po indukcji IPTG (37°C)

9 – 10 μ l próbki pobranej 18 h po indukcji IPTG (37°C)

W zależności od szczepu *E. coli* transformowanego DNA plazmidów rekombinantowych kodujących odpowiednie antygeny chimeryczne obserwowano różne wydajności ekspresji genów kodujących badane białka chimeryczne. Na rozdzielach elektroforetycznych lizatów komórkowych *E. coli* BL21(DE3)pLysS zawierających plazmidy rekombinantowe, w większości przypadków nie zaobserwowano prążków, które mogłyby odpowiadać produkowanym białkom chimerycznym, co świadczy o braku lub bardzo niskim poziomie ekspresji genów. Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, iż wydajna ekspresja genów kodujących rekombinantowe antygeny chimeryczne zachodziła w przypadku zastosowania jako szczepu ekspresyjnego komórek *E. coli* Rosetta(DE3)pLacI (Rys. 21). Hodowle należało prowadzić z wytrząsaniem w 30°C lub 37°C przez 18 godz. od momentu indukcji roztworem IPTG.

5.4. Immunoidentyfikacja

W celu potwierdzenia obecności antygenów chimerycznych w całkowitych lizatach komórek *E. coli* Rosetta(DE3)pLacI produkujących białka rekombinantowe przeprowadzono testy Western blotting z użyciem przeciwciał skierowanych przeciw etykietom polihistydynowym oraz domenie S-Tag [Materiały 3.14]. Rekombinantowe plazmidy pET30 Ek/LIC oraz pUET1 kodujące odpowiednie białka zostały zaprojektowane tak, aby w wyniku ekspresji produkowane zostały rekombinantowe białka chimeryczne zawierające na obu końcach etykiety polihistydynowe oraz dodatkowo domenę S-Tag na N-końcu. Obecność tych domen miała na celu umożliwić w późniejszych etapach badań łatwą immunoidentyfikację oraz zastosowanie jednoetapowej procedury oczyszczania. Białka zawarte we frakcjach lizatów komórkowych zebranych po 18 godz. od momentu indukcji IPTG poddano trzem równoległym rozdzielom elektroforetycznym w 10% żelach poliakrylamidowych [Metody 4.4.2]. Pierwszy z uzyskanych żeli poddano barwieniu roztworem barwiącym [Materiały 3.11]. Pozostałe dwa żele wykorzystano do elektrotransferu białek na błonę nitrocelulozową [Metody 4.9]. Następnie przeprowadzono test Western blotting z wykorzystaniem przeciwciał anty-polihistydynowych lub przeciwciał skierowanych przeciw domenie S-Tag [Metody 4.9]. Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 22.



Rys. 22. A) Rozdział elektroforetyczny białek zawartych w poszczególnych lizatach komórkowych *E. coli* Rosetta(DE3)pLacI w 10% żelu poliakrylamidowym. B) Wynik testu Western blotting z użyciem przeciwciał anti-polihistydynowych. C) Wyniki testu Western blotting z użyciem przeciwciał skierowanych przeciw domenie S-Tag

Ścieżki:

M – marker wielkości PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas; #SM1811)

1 – 10 μ l lizatu komórek *E. coli* Rosetta(DE3)pLacI (kontrola)

2 – 10 μ l lizatu komórek *E. coli* Rosetta(DE3)pLacI + pUET1/MIC1-MAG1-SAG1_M 18 h po indukcji IPTG

3 – 10 μ l lizatu komórek *E. coli* Rosetta(DE3)pLacI + pUET1/MIC1-MAG1-SAG1_M 18 h po indukcji IPTG

4 – 10 μ l lizatu komórek *E. coli* Rosetta(DE3)pLacI + pET30/SAG1_M-MIC1-MAG1 18 h po indukcji IPTG

5 – 10 μ l lizatu komórek *E. coli* Rosetta(DE3)pLacI + pET30/SAG1_D-MIC1-MAG1 18 h po indukcji IPTG

6 – 10 μ l lizatu komórek *E. coli* Rosetta(DE3)pLacI + pET30/SAG2-GRA1-ROP1_M 18 h po indukcji IPTG

7 – 10 μ l lizatu komórek *E. coli* Rosetta(DE3)pLacI + pET30/SAG2-GRA1-ROP1_D 18 h po indukcji IPTG

8 – 10 μ l lizatu komórek *E. coli* Rosetta(DE3)pLacI + pET30/MAG1-MIC3-ROP1 18 h po indukcji IPTG

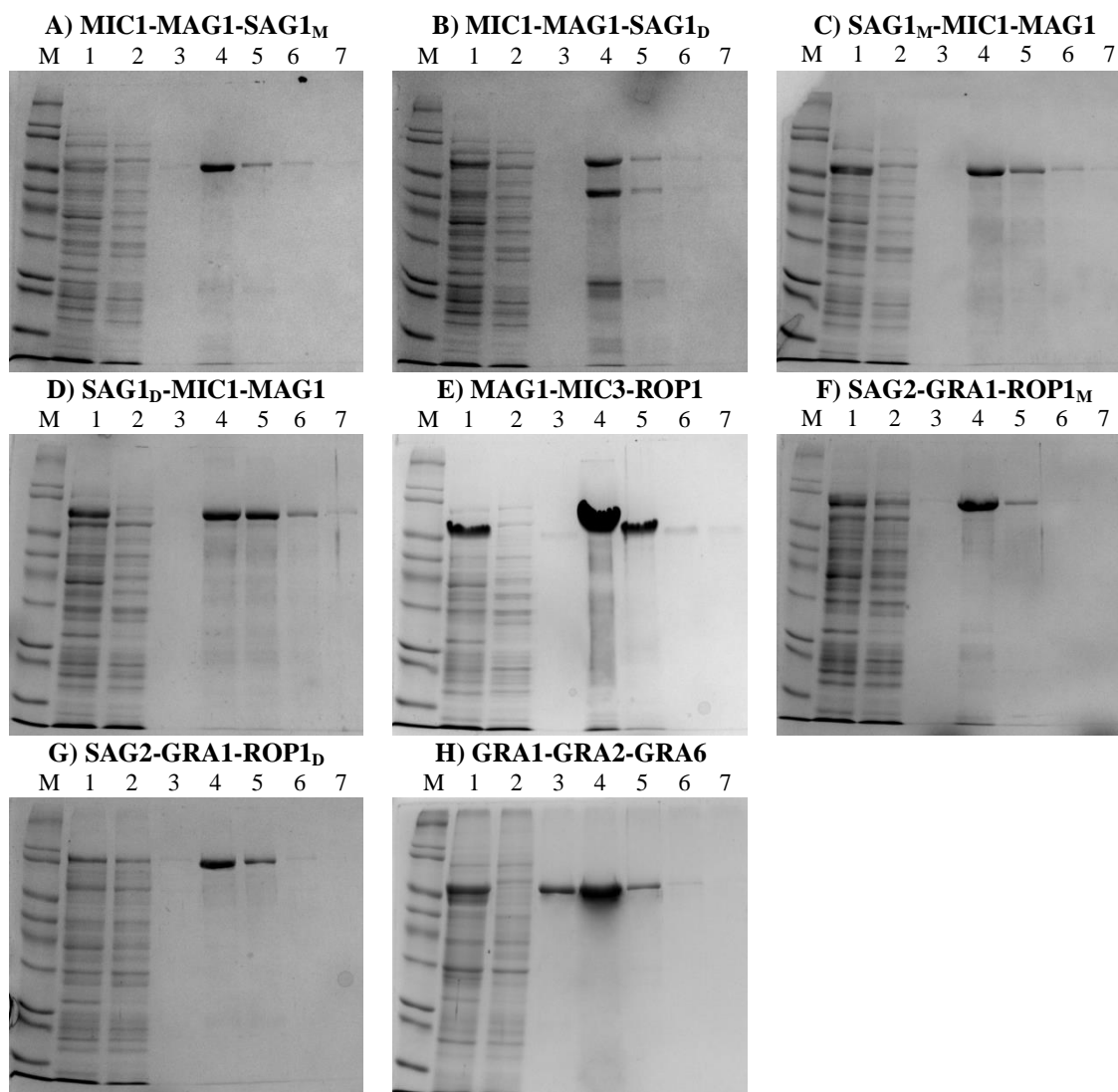
9 – 10 μ l lizatu komórek *E. coli* Rosetta(DE3)pLacI + pET30/GRA1-GRA2-GRA6 18 h po indukcji IPTG

Przeprowadzone testy Western blotting potwierdziły obecność rekombinantowych białek chimerycznych zawierających na obu końcach etykiety polihistydynowe oraz domeny S-Tag na N-końcach w całkowitych lizatach komórek *E. coli* Rosetta(DE3)pLacI zawierających odpowiednie plazmidy rekombinantowe. W przypadku białka chimerycznego MIC1-MAG1-SAG1_D zaobserwowano, iż C-końcowy fragment antygeny obejmujący sekwencję aminokwasową białka SAG1 ulega proteolitycznej degradacji, o czym świadczyć może obecność dodatkowych prążków uzyskanych na błonach nitrocelulozowych w teście Western blotting z zastosowaniem przeciwciał skierowanych przeciw domenie S-Tag oraz etykietom polihistydynowym.

5.5. Oczyszczanie

Do oczyszczania uzyskanych białek rekombinantowych wykorzystano metodę chromatografii metalopowinowactwa na złożu Ni²⁺ IDA – agarozą (His•Bind®; Novagen). Dzięki obecności domen polihistydynowych (wykazujących wysokie powinowactwo do jonów niklu) na obu końcach antygenów rekombinantowych, możliwa była jego adsorpcja na powierzchni złoża.

Osady komórek z hodowli nocnej bakterii zawieszano w buforze MA [Materiały 3.12] i dezintegrowano, następnie otrzymane na skutek wirowania supernatanty stanowiące całkowitą rozpuszczalną frakcję cytoplazmatyczną poddawano oczyszczaniu [Metody 4.7]. Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 23.



Rys. 23. Rozdział elektroforetyczny białek zawartych we frakcjach elucyjnych zebranych podczas oczyszczania białek chimerycznych w 10% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących.

Ścieżki:

- M – marker wielkości Molecular Weights Wide Range (Sigma; S8445)
- 1 – 10 μ l całkowitej frakcji cytoplazmatycznej przed naniesieniem na kolumnę
- 2 – 10 μ l frakcji lizatu komórkowego po przejściu przez kolumnę
- 3 – 10 μ l frakcji elucyjnej zebranej po pierwszym płukaniu buforem C
- 4 – 10 μ l frakcji elucyjnej zebranej po drugim płukaniu buforem C
- 5 – 10 μ l frakcji elucyjnej zebranej po trzecim płukaniu buforem C
- 6 – 10 μ l frakcji elucyjnej zebranej po czwartym płukaniu buforem C
- 7 – 10 μ l frakcji elucyjnej zebranej po piątym płukaniu buforem C

W wyniku zastosowanej procedury jednoetapowego oczyszczania antygenów rekombinantowych z wykorzystaniem chromatografii metalopowinowactwa otrzymano preparaty białkowe o wysokiej czystości elektroforetycznej przekraczającej 90%. Wyjątek stanowiły frakcje antygeny MIC1-MAG1-SAG1_D, które eluowały z kolumny razem z produktami degradacji (Rys. 23B), dlatego też nie prowadzono dalszych badań z wykorzystaniem tego antygeny chimerycznego. Stężenia białek w poszczególnych frakcjach elucyjnych wyznaczano z wykorzystaniem metody Bradford zgodnie

z procedurą opisaną w punkcie 4.8. Uzyskano preparaty białkowe o stężeniu od 0,1-0,4 mg/ml. Oszacowane ogólne ilości wyprodukowanych rekombinantowych antygenów chimerycznych oczyszczonych z 1 litra hodowli bakteryjnej zestawiono w tabeli 11.

Tab. 11. Ilość oczyszczonych preparatów białkowych uzyskanych z 1 litra hodowli oraz stężenia frakcji elucyjnych.

ANTYGEN	ILOŚĆ BIAŁKA Z 1 LITRA HODOWLI	STĘŻENIE FRAKCJI ELUCYJNEJ
MIC1-MAG1-SAG1 _M	30 mg	0,30 mg/ml
SAG1 _M -MIC1-MAG1	45 mg	0,38 mg/ml
SAG1 _D -MIC1-MAG1	52 mg	0,40 mg/ml
MAG1-MIC3-ROP1	38 mg	0,25 mg/ml
SAG2-GRA1-ROP1 _M	36 mg	0,35 mg/ml
SAG2-GRA1-ROP1 _D	37 mg	0,27 mg/ml
GRA1-GRA2-GRA6	48 mg	0,38 mg/ml

5.6. Test IgG ELISA z wykorzystaniem surowic ludzkich

W celu oszacowania przydatności uzyskanych białek chimerycznych *T. gondii* do serodiagnostyki toksoplazmozy u ludzi przeprowadzono pośredni test IgG ELISA. Studzienki mikropłytek opłaszczano antygenami chimerycznymi, mieszankami antygenów rekombinantowych wchodzących w skład białek chimerycznych, poliwalentnym antygenem natywnym TLA oraz oczyszczonym lizatem *E. coli*. Wyniki uzyskane dla mieszanek antygenów oraz TLA posłużyły do porównania reaktywności względem nowych antygenów chimerycznych.

5.6.1. Miareczkowanie stężenia antygenów rekombinantowych oraz rozcieńczenia przeciwciał przeciw ludzkim immunoglobulinom klasy IgG

Miareczkowanie miało na celu dobranie optymalnych warunków do przeprowadzania testów IgG ELISA na dużej puli surowic ludzkich. Jednocześnie optymalizowano stężenie poszczególnych antygenów rekombinantowych i rozcieńczenie przeciwciał przeciw ludzkim immunoglobulinom klasy IgG wyznakowanych peroksydazą chrzanową. Płytki opłaszczano preparatami antygenów chimerycznych, mieszankami antygenów rekombinantowych, poliwalentnym antygenem natywnym TLA oraz oczyszczonym lizatem *E. coli* o stężeniach 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml i 10 µg/ml. Przeprowadzano testy ELISA z wykorzystaniem dwóch surowic seropozytywnych i seronegatywnych rozcieńczonych 1:100 (rozcieńczenie standardowe). Następnie płytki inkubowano z różnymi rozcieńczeniami przeciwciał przeciw ludzkim immunoglobulinom klasy IgG (od 1:2000 do 1:128000).

Niezależnie od zastosowanego stężenia poszczególnych białek rekombinantowych uzyskane podczas odczytywania wyników sygnały były bardzo zbliżone, dlatego też ze względów ekonomicznych wybrano mniejsze stężenie białek rekombinantowych do opłaszczania płytek do testu ELISA. Jako optymalne stężenie dla białek rekombinantowych wyznaczono na 2,5 µg/ml, a optymalne stężenie TLA oraz oczyszczonego lizatu *E. coli* na 1 µg/ml.

W celu wyboru optymalnego rozcieńczenia przeciwciał przeciw ludzkim immunoglobulinom klasy IgG należało zwrócić uwagę na dwie rzeczy. A mianowicie na różnicę pomiędzy absorbancją dla surowic negatywnych i surowic pozytywnych oraz na to aby wartość absorbancji dla surowic ujemnych była możliwie najniższa, bowiem wpływa ona znacząco na współczynnik odcięcia (tzw. „cutoff”). Jako optymalne rozcieńczenie przeciwciał II-rzędowych wybrano rozcieńczenie 1:16000. W przypadku zastosowania niższych rozcieńczeń istniałoby duże ryzyko powstawania niespecyficznych wiązań pomiędzy przeciwciałami, a to z kolei zafałszowałyby wyniki poprzez podwyższanie wartości absorbancji, co miałyby znaczenie w szczególności dla surowic seronegatywnych. Wybór większego rozcieńczenia przeciwciał dostarczyłby wielu problemów związanych z interpretacją wyników oraz z czułością testu, ponieważ wartości otrzymywane dla surowic ujemnych i dodatnich byłyby bardzo zbliżone.

5.6.2. Wyznaczanie współczynników odcięcia

W celu wyznaczenia współczynników odcięcia (tzw. „cutoff”), czyli granicznej wartości absorbancji powyżej, której wszystkie wyniki uzyskane dla surowic seropozytywnych, zawierających przeciwciała anty-*T. gondii* uznawane są za dodatnie, wykonano pośredni test IgG ELISA [Metody 4.10] z wykorzystaniem puli 23 surowic seronegatywnych. Do opłaszczenia płytek wykorzystano oczyszczone preparaty rekombinantowych antygenów chimerycznych o stężeniu 2,5 µg/ml, mieszanki rekombinantowych białek wchodzących w skład antygenów chimerycznych o stężeniu 2,5 µg/ml każdego antygeny, poliwalentny antygen TLA oraz oczyszczony lizat *E. coli* o stężeniu 1 µg/ml. W teście stosowano rozcieńczenie przeciwciał II-rzędowych równe 1:16000. Z uzyskanych wyników dla puli surowic pobranych od seronegatywnych pacjentów obliczano wartość średnią oraz odchylenie standardowe. Wartości poszczególnych współczynników odcięcia obliczano według wzoru:

$$\text{„cutoff”} = \text{wartość średnia} + \text{dwa odchylenia standardowe}$$

Obliczone w ten sposób wartości współczynnika odcięcia zebrano w tabeli 12.

Tab. 12. Wartości współczynników odcięcia dla poszczególnych preparatów białkowych.

ANTYGEN	WARTOŚĆ WSPÓŁCZYNNIKA ODCIĘCIA „cutoff”
MIC1-MAG1-SAG1 _M	0,434
SAG1 _M -MIC1-MAG1	0,419
SAG1 _D -MIC1-MAG1	0,383
M: rMIC1+rMAG1+rSAG1	0,428
SAG2-GRA1-ROP1 _M	0,281
SAG2-GRA1-ROP1 _D	0,389
M: rSAG2+rGRA1+rROP1	0,504
MAG1-MIC3-ROP1	0,394
M: rMAG1+rMIC3+rROP1	0,385
GRA1-GRA2-GRA6	0,710
M: rGRA1+rGRA2+rGRA6	0,784
TLA	0,507
lizat <i>E. coli</i>	0,430

Poszczególne wartości „cutoff” różnią się między sobą, uzależnione jest to od czystości używanych preparatów antygenowych, jak i od jakości surowic negatywnych wykorzystanych w teście IgG ELISA. W niektórych surowicach mogą znajdować się również przeciwciała anty-*E. coli* reagujące z białkami bakteryjnymi, które mimo oczyszczania w śladowych ilościach pozostają w preparatach antygenowych. Powstają w ten sposób niespecyficzne oddziaływania, które podwyższają wartości absorbancji co ma swoje odzwierciedlenie w wartości obliczanych współczynników odcięcia. Stosunkowo wysoką wartość współczynnika odcięcia wyznaczono dla poliwalentnego antygeny natywnego TLA (0,507), co może wynikać z faktu, iż stanowi on pełną pulę antygenów pasożyta, które mogą niespecyficznie oddziaływać z przeciwciałami zawartymi w surowicach pacjentów seronegatywnych.

5.6.3. Oszacowanie przydatności rekombinantowych antygenów chimerycznych *T. gondii* w serodiagnostyce toksoplazmozy u ludzi

W celu oszacowania przydatności diagnostycznej rekombinantowych antygenów chimerycznych *T. gondii* przeprowadzono pośrednie testy IgG ELISA według procedury opisanej w punkcie 4.10. Mikropłytki opłaszczano preparatami białkowymi o takim samym stężeniu (2,5 µg/ml antygeny rekombinantowe, 1 µg/ml TLA oraz lizat *E. coli*), jak w przypadku wyznaczania współczynników odcięcia. We wszystkich testach IgG ELISA rozcieńczenie surowic wynosiło 1:100, a przeciwciał II-rzędowych 1:16000. W testach wykorzystano pulę 172 surowic seropozytywnych, zebranych

w ramach rutynowej diagnostyki toksoplazmozy oraz pulę 100 surowic pochodzących od osób zdrowych, która wykorzystana została do określenia specyficzności testów IgG ELISA. Surowice seropozytywne podzielono na trzy grupy [Materiały 3.15] w zależności od klasy i miana zawartych w nich przeciwciał IgM i IgG oraz wartości indeksu awidności przeciwciał IgG. W przypadku surowic z fazy przewlekłej toksoplazmozy dokonano dodatkowo podziału na cztery podgrupy w zależności od miana przeciwciał klasy IgG.

Podział puli surowic seropozytywnych:

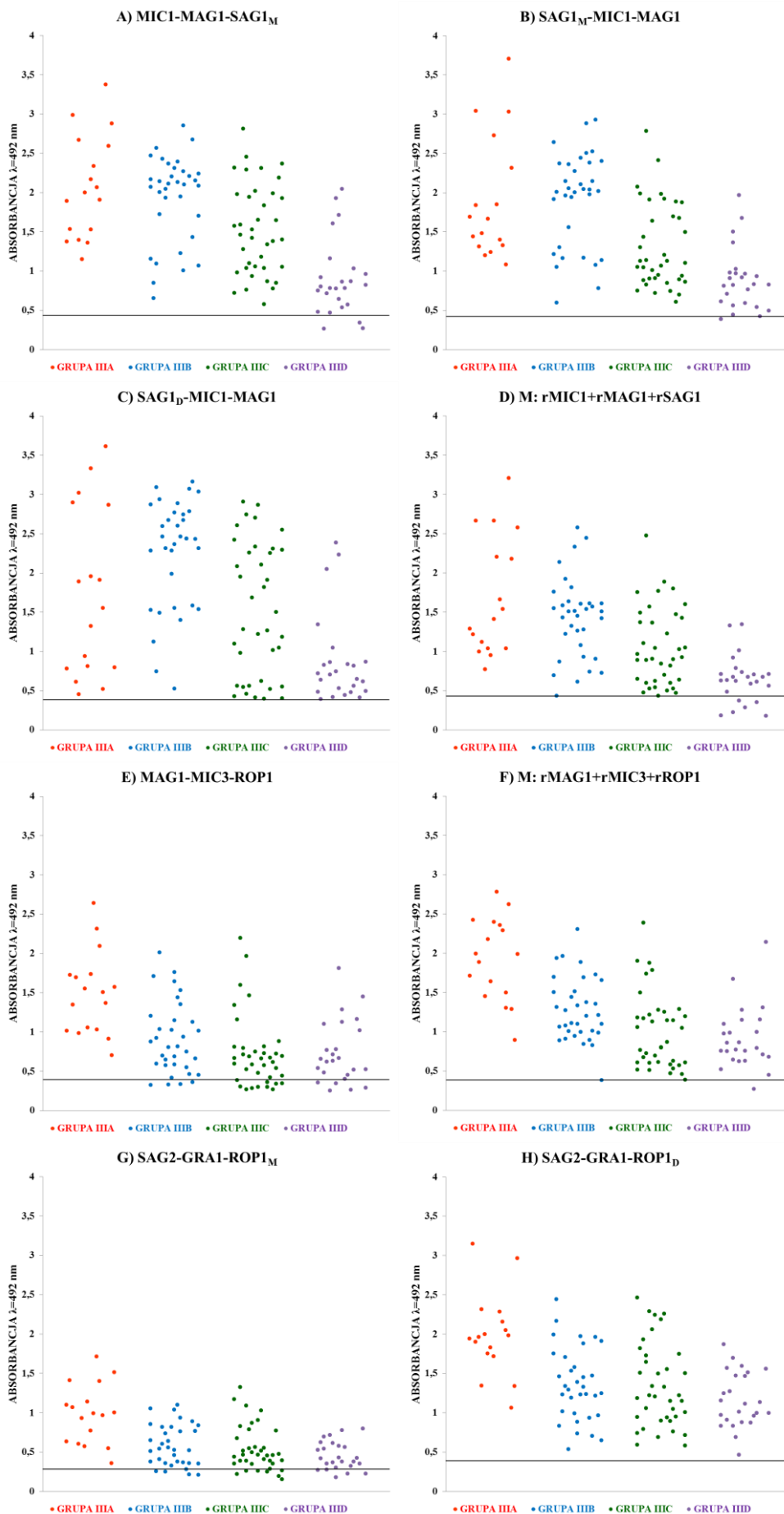
- grupa I (41 surowic) – podejrzenie wczesnej fazy choroby (IgG +; IgM +; niski indeks awidności IgG);
- grupa II (17 surowic) – podejrzenie podostrej fazy choroby (IgG +; IgM –; niski/pośredni indeks awidności IgG);
- grupa III (114 surowic) – przewlekła faza choroby (IgG +; IgM –/+; wysoki indeks awidności IgG):
 - grupa IIIA (17 surowic) – miano przeciwciał IgG > 300 IU/ml;
 - grupa IIIB (34 surowic) – miano przeciwciał IgG od 101-300 IU/ml;
 - grupa IIIC (38 surowic) – miano przeciwciał IgG od 51-100 IU/ml;
 - grupa IIID (25 surowic) – miano przeciwciał IgG od 1-50 IU/ml.

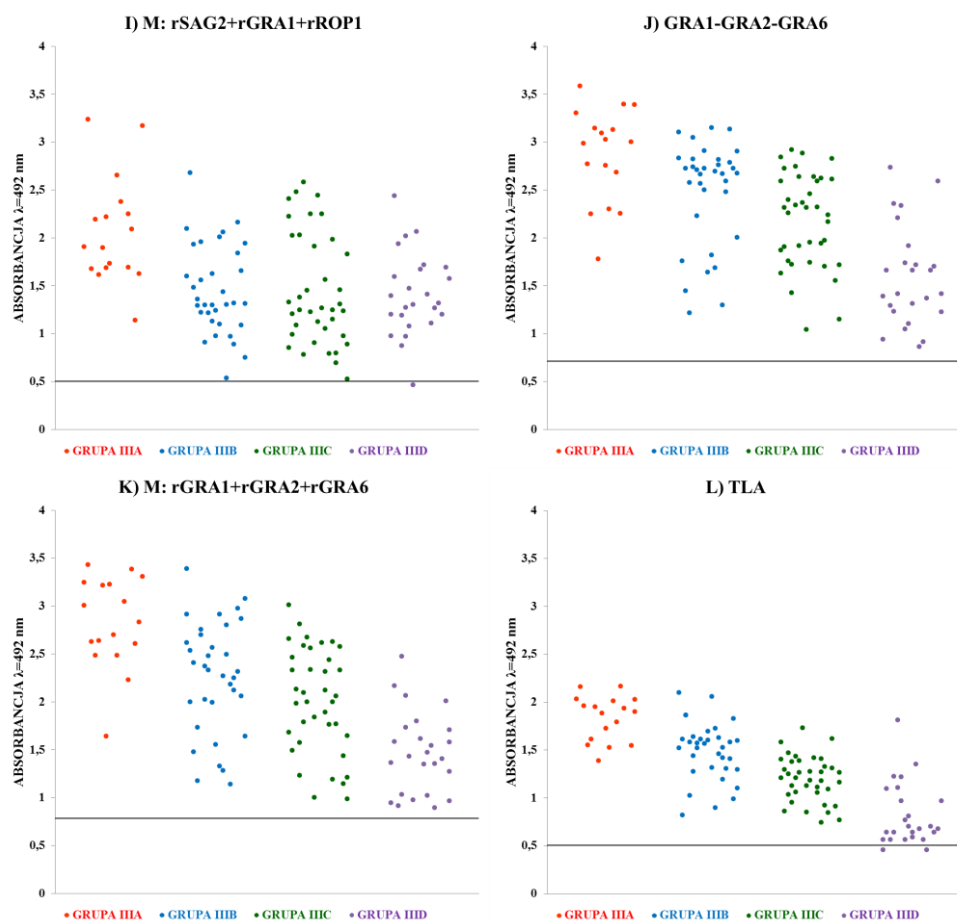
Uzyskane wyniki zebrano w tabeli 13 oraz przedstawiono na wykresach (Rys. 24).

Tab. 13. Wyniki testów IgG ELISA w zależności od wykorzystanego antygeny i grupy surowic.

ANTYGEN	SUROWICE SEROPOZYTYWNE			SUROWICE SERONEGATYWNE <i>n</i> = 100	WARTOŚĆ „cutoff”		
	GRUPA I <i>n</i> = 41	GRUPA II <i>n</i> = 17	GRUPA III <i>n</i> = 114			OGÓLEM <i>n</i> = 172	
MIC1-MAG1-SAG1 _M	1	41 (100)	17 (100)	111 (97,4)	169 (98,3)	0	0,434
	2	1,704 (0,670-2,961)	0,842 (0,482-1,487)	1,585 (0,264-3,373)	1,540 (0,264-3,373)	0,356 (0,220-0,432)	
SAG1 _M -MIC1-MAG1	1	41 (100)	17 (100)	113 (99,1)	171 (99,4)	0	0,419
	2	1,016 (0,450-1,707)	0,730 (0,437-1,295)	1,483 (0,385-3,705)	1,297 (0,385-3,705)	0,346 (0,157-0,418)	
SAG1 _P -MIC1-MAG1	1	41 (100)	17 (100)	114 (100)	172 (100)	0	0,383
	2	1,409 (0,860-2,074)	0,634 (0,395-1,032)	1,631 (0,392-3,616)	1,479 (0,392-3,616)	0,325 (0,207-0,383)	
M: rMIC1+rMAG1+rSAG1	1	41 (100)	13 (76,5)	108 (94,7)	162 (94,2)	0	0,428
	2	1,350 (0,652-2,873)	0,626 (0,279-1,108)	1,166 (0,177-3,204)	1,156 (0,177-3,204)	0,368 (0,253-0,427)	
MAG1-MIC3-ROPI	1	41 (100)	15 (88,2)	95 (83,3)	151 (87,8)	0	0,394
	2	1,716 (0,612-3,365)	0,640 (0,210-1,244)	0,892 (0,256-2,644)	1,064 (0,210-3,365)	0,294 (0,127-0,394)	
M: rMAG1+rMIC3+rROPI	1	41 (100)	16 (94,1)	112 (98,2)	169 (98,3)	0	0,385
	2	2,001 (0,599-3,682)	0,981 (0,331-1,931)	1,199 (0,272-2,779)	1,369 (0,272-3,682)	0,316 (0,126-0,385)	
SAG2-GRA1-ROPI _M	1	41 (100)	14 (82,4)	97 (85,1)	152 (88,4)	0	0,281
	2	1,387 (0,293-3,303)	0,529 (0,185-1,431)	0,593 (0,153-1,713)	0,778 (0,153-3,303)	0,166 (0,104-0,279)	
SAG2-GRA1-ROPI _D	1	41 (100)	17 (100)	114 (100)	172 (100)	0	0,389
	2	2,143 (0,887-3,626)	0,963 (0,482-2,184)	1,403 (0,464-3,148)	1,535 (0,464-3,626)	0,295 (0,109-0,387)	
M: rSAG2+rGRA1+rROPI	1	41 (100)	17 (100)	113 (99,1)	171 (99,4)	0	0,504
	2	2,153 (0,821-3,692)	0,972 (0,545-1,786)	1,531 (0,466-3,237)	1,624 (0,466-3,692)	0,443 (0,192-0,504)	
GRA1-GRA2-GRA6	1	41 (100)	17 (100)	114 (100)	172 (100)	0	0,710
	2	2,629 (0,896-3,827)	1,852 (0,712-3,360)	2,245 (0,864-3,582)	2,297 (0,712-3,827)	0,590 (0,245-0,710)	
M: rGRA1+rGRA2+rGRA6	1	40 (97,6)	17 (100)	114 (100)	171 (99,4)	0	0,784
	2	2,531 (0,741-3,631)	1,791 (0,790-3,433)	2,087 (0,894-3,428)	2,163 (0,741-3,631)	0,526 (0,216-0,782)	
TLA	1	41 (100)	17 (100)	112 (98,2)	170 (98,9)	0	0,507
	2	1,058 (0,512-1,798)	0,925 (0,510-1,976)	1,298 (0,460-2,165)	1,204 (0,460-2,165)	0,416 (0,213-0,507)	
lizat <i>E. coli</i>	1	0	0	0	0	8 (8)	0,430
	2	0,253 (0,160-0,352)	0,325 (0,206-0,424)	0,319 (0,212-0,429)	0,303 (0,160-0,429)	0,389 (0,223-0,708)	

Objaśnienia: 1 – liczba surowic, która dała wynik pozytywny (wyrażona w procentach), 2 – średnia wartość mierzonej absorbancji (zakres mierzonej absorbancji).





Rys. 24. Wykresy przedstawiające reaktywność A) antygeny chimerycznego MIC1-MAG1-SAG1_M; B) antygeny chimerycznego SAG1_M-MIC1-MAG1; C) antygeny chimerycznego SAG1_D-MIC1-MAG1; D) mieszanki antygenów rMIC1+rMAG1+rSAG1; E) antygeny chimerycznego MAG1-MIC3-ROP1; F) mieszanki antygenów rMAG1+rMIC3+rROP1; G) antygeny chimerycznego SAG2-GRA1-ROP1_M; H) antygeny chimerycznego SAG2-GRA1-ROP1_D; I) mieszanki antygenów rSAG2+rGRA1+rROP1; J) antygeny chimerycznego GRA1-GRA2-GRA6; K) mieszanki antygenów rGRA1+rGRA2+rGRA6; L) poliwalentnego antygeny natywnego TLA z przeciwciałami zawartymi w surowicach pacjentów ze stwierdzoną przewlekłą fazą toksoplazmozy. Linie poziome oznaczają wartości „cutoff” dla poszczególnych preparatów białkowych. Poszczególne kolory znaczników odpowiadają surowicom o odpowiednim mianie przeciwciał IgG: (●) miano IgG > 300 IU/ml; (●) miano IgG od 101-300 IU/ml; (●) miano IgG od 51-100 IU/ml; (●) miano IgG od 1-50 IU/ml.

Przeprowadzone badania z wykorzystaniem pośredniego testu IgG ELISA wykazały, iż rekombinantowe antygeny chimeryczne posiadają zróżnicowaną reaktywność w stosunku do przeciwciał anty-*T. gondii* zawartych w surowicach pacjentów ze stwierdzoną toksoplazmozą. Większość z nowo wyprodukowanych białek antygenowych posiada ogólną reaktywność porównywalną z poliwalentnym antygenem natywnym TLA (98,9%), wyjątek stanowią antygeny chimeryczne MAG1-MIC3-ROP1 (87,8%) oraz SAG2-GRA1-ROP1_M (88,4%). Analizując wyniki dla grupy pacjentów z podejrzeniem wczesnej toksoplazmozy można zaobserwować, iż wszystkie antygeny chimeryczne charakteryzują się 100% reaktywnością. Ponadto, średnie wartości absorbancji dla poszczególnych antygenów chimerycznych są na ogół wyższe niż dla poliwalentnego antygeny natywnego TLA (1,058). Najniższą średnią wartość

absorbancji odnotowano dla antygeny SAG1_M-MIC1-MAG1 (1,016), a najwyższą dla antygeny GRA1-GRA2-GRA6 (2,629). W przypadku grupy pacjentów z podejrzeniem podostrej fazy choroby 100% reaktywnością w pośrednim teście IgG ELISA charakteryzowały się antygeny złożone z fragmentów immunodominujących białek MIC1, MAG1 i SAG1 oraz antygeny chimeryczne SAG2-GRA1-ROP1_D i GRA1-GRA2-GRA6. Niższą reaktywność zaobserwowano dla antygeny złożonego z krótkich fragmentów immunodominujących MAG1-MIC3-ROP1 (88,2%), a najniższą na poziomie 82,4% dla antygeny SAG2-GRA1-ROP1_M zawierającego krótszy fragment immunodominujący białka ROP1. W tej grupie surowic niską reaktywność odnotowano również dla dwóch mieszanek rMIC1+rMAG1+rSAG1 (76,5%) oraz rMAG1+rMIC3+rROP1 (94,1%). Porównując średnie wartości absorbancji można zauważyć zdecydowanie większe zróżnicowanie, niż w przypadku grupy pacjentów z podejrzeniem wczesnej toksoplazmozy. Najbardziej zbliżoną do poliwalentnego antygeny natywnego TLA (0,925) średnią wartość absorbancji odnotowano dla antygeny SAG2-GRA1-ROP1_D (0,963), a najwyższą dla antygeny GRA1-GRA2-GRA6 (1,852). Surowice z grupy pacjentów z przewlekłą toksoplazmozą zostały w 100% rozpoznane prawidłowo w przypadku zastosowania do testu IgG ELISA antygenów chimerycznych SAG1_D-MIC1-MAG1, SAG2-GRA1-ROP1_D oraz GRA1-GRA2-GRA6, które składały się z dużych fragmentów immunodominujących poszczególnych białek pasożyta. Najniższą reaktywnością charakteryzowały się ponownie antygeny chimeryczne MAG1-MIC3-ROP1 (83,3%) oraz SAG2-GRA1-ROP1_M (85,1%). Antygeny te nie były rozpoznawane nawet przez swoiste przeciwciała zawarte w niektórych surowicach o wysokim mianie IgG pomiędzy 100-300 IU/ml. Wysoką reaktywnością porównywalną z TLA (98,2%) zaobserwowano dla antygenów chimerycznych MIC1-MAG1-SAG1_M (97,4%) oraz SAG1_M-MIC1-MAG1 (99,1%) oraz poszczególnych mieszanek antygenów. W przypadku tych antygenów oraz mieszanek poprawnie nie zostały rozpoznane surowice, które zawierały swoiste przeciwciała IgG o mianie poniżej 50 IU/ml (Rys. 24). Jest to naturalny stan rzeczy, bowiem po pewnym czasie od momentu pierwotnego zarażenia zarówno reaktywność jak i miano swoistych przeciwciał skierowanych przeciw konkretnym antygenom zaczyna spadać.

Analizując wyniki uzyskane dla antygenów chimerycznych złożonych z fragmentów immunodominujących białek MIC1, MAG1 oraz SAG1, zaobserwować można, iż średnia wartość mierzonej absorbancji jest najwyższa dla antygeny MIC1-MAG1-SAG1_M, co jednak nie wpływa na ogólną reaktywność antygeny. Prawdopodobnie epitopy w tym antygenie są lepiej eksponowane swoistym przeciwciałom anty-*T. gondii*. W zawiązku z powyższym, podczas konstrukcji antygenów chimerycznych, należy nie tylko zwrócić uwagę na wielkość fragmentów immunodominujących poszczególnych białek, ale także na ich kolejność w finalnym

konstrukcie. Świadczy o tym również fakt, iż antygen MIC1-MAG1-SAG1_D zawierający dłuższy fragment immunodominujący białka SAG1 na C-końcu uległ proteolitycznej degradacji na etapie produkcji, co uniemożliwiło jego efektywne oczyszczanie i późniejsze wykorzystanie w testach serologicznych. Nie mniej jednak racjonalny dobór wielkości fragmentów immunodominujących wydaje się kluczowy przy konstrukcji antygenów chimerycznych, co dokładnie ilustrują wyniki uzyskane dla antygenów chimerycznych SAG2-GRA1-ROP1_M oraz SAG2-GRA1-ROP1_D. Antygen zawierający dłuższy fragment antygeny ROP1 charakteryzował się zdecydowanie wyższą reaktywnością, a średnia wartość mierzonej absorbancji była dwukrotnie wyższa. Z drugiej strony, dobierając odpowiednie fragmenty immunodominujące białek charakterystycznych dla danej formy rozwojowej pasożyta można skonstruować antygen chimeryczny będący markerem danej fazy choroby. Świadczą o tym wyniki uzyskane dla antygeny chimerycznego MAG1-MIC3-ROP1, który był najlepiej rozpoznawany przez swoiste przeciwciała antytoksoplazmowe zawarte w surowicach pobranych od pacjentów z wczesną toksoplazmozą.

5.7. Test IgG ELISA w serodiagnostyce toksoplazmozy u zwierząt

Do niniejszego etapu badań wybrano antygeny chimeryczne, które charakteryzowały się najwyższą reaktywnością w testach IgG ELISA z wykorzystaniem surowic ludzkich. W celu oszacowania przydatności uzyskanych białek chimerycznych *T. gondii* do serodiagnostyki toksoplazmozy u zwierząt (koty, konie, owce i świnie) przeprowadzono pośrednie testy IgG ELISA. Studzienki mikropłytek opłaszczano antygenami chimerycznymi, mieszkami antygenów rekombinantowych wchodzących w skład białek chimerycznych oraz poliwalentnym antygenem natywnym. Wyniki uzyskane dla mieszanek antygenów oraz TLA posłużyły do porównania reaktywności względem nowych antygenów chimerycznych.

5.7.1. Miareczkowanie stężenia antygenów rekombinantowych oraz rozcieńczenia przeciwciał anti-kocich, anti-końskich, anti-owczych i anti-świńskich IgG

Analogicznie jak w przypadku testów IgG ELISA z wykorzystaniem surowic ludzkich miareczkowanie miało na celu dobranie optymalnych warunków do przeprowadzania testów IgG ELISA na dużych pulach surowic pochodzących od różnych grup zwierząt. Jednocześnie optymalizowano stężenie poszczególnych antygenów rekombinantowych i rozcieńczenie przeciwciał II-rzędowych wyznakowanych peroksydazą chrzanową. W celu optymalizacji warunków przeprowadzania testów IgG ELISA postępowano analogicznie jak w punkcie 5.6.1.

W wyniku przeprowadzonych testów IgG ELISA jako optymalne stężenie białek rekombinantowych wyznaczono stężenie równe 2,5 µg/ml, a optymalne stężenie TLA na poziomie 1 µg/ml.

W celu wyboru optymalnego rozcieńczenia przeciwciał II-rzędowych ponownie zwrócono uwagę na różnicę pomiędzy absorbancją dla surowic negatywnych i surowic pozytywnych oraz na to aby wartość absorbancji dla surowic ujemnych była możliwie najniższa. Jako optymalne rozcieńczenia przeciwciał II-rzędowych wybrano odpowiednio rozcieńczenia:

- 1:32000 – przeciwciała przeciw kocim immunoglobulinom klasy IgG;
- 1:40000 – przeciwciała przeciw końskim immunoglobulinom klasy IgG;
- 1:16000 – przeciwciała przeciw owczym immunoglobulinom klasy IgG;
- 1:16000 – przeciwciała przeciw świńskim immunoglobulinom klasy IgG.

5.7.2. Wyznaczanie współczynników odcięcia

W celu wyznaczenia współczynników odcięcia (tzw. „cutoff”) dla poszczególnych preparatów białkowych postępowano analogicznie jak w punkcie 5.6.2. Wykonano pośrednie testy IgG ELISA [Metody 4.10] z wykorzystaniem puli surowic seronegatywnych pochodzących od kotów (21 surowic), koni (32 surowice), owiec (24

surowcie) oraz świń (24 surowice). Do opłaszczenia płytek wykorzystano oczyszczone preparaty rekombinantowych antygenów chimerycznych o stężeniu 2,5 µg/ml, mieszanki rekombinantowych białek wchodzących w skład antygenów chimerycznych o stężeniu 2,5 µg/ml każdego antygeny oraz poliwalentny antygen TLA o stężeniu 1 µg/ml. W testach stosowano rozcieńczenia przeciwciał II-rzędowych zoptymalizowanych w punkcie 5.7.1. Na podstawie wyników uzyskanych dla puli surowic pobranych od zdrowych zwierząt obliczono współczynniki odcięcia, które zebrano w tabeli 14.

Tab. 14. Wartości współczynników odcięcia dla poszczególnych preparatów białkowych w zależności od badanej grupy zwierząt.

ANTYGEN	WARTOŚĆ WSPÓŁCZYNNIKA ODCIĘCIA „cutoff”			
	SUROWICE KOCIE	SUROWICE KOŃSKIE	SUROWICE OWCZE	SUROWICE ŚWIŃSKIE
MIC1-MAG1-SAG1 _M	0,237	0,828	0,373	0,404
SAG1 _D -MIC1-MAG1	0,231	0,793	0,487	0,393
M: rMIC1+rMAG1+rSAG1	0,331	0,799	0,574	0,415
SAG2-GRA1-ROP1 _M	0,337	0,517	0,400	0,262
SAG2-GRA1-ROP1 _D	0,329	0,437	0,406	0,384
M: rSAG2+rGRA1+rROP1	0,417	0,512	0,525	0,275
GRA1-GRA2-GRA6	0,556	1,002	0,433	0,387
M: rGRA1+rGRA2+rGRA6	0,490	1,021	0,505	0,677
TLA	0,293	0,443	0,314	0,369

5.7.3. Oszacowanie przydatności rekombinantowych antygenów chimerycznych *T. gondii* w serodiagnostyce toksoplazmozy u zwierząt

W celu oszacowania przydatności diagnostycznej rekombinantowych antygenów chimerycznych *T. gondii* przeprowadzono pośrednie testy IgG ELISA według procedury opisanej w punkcie 4.10. Mikro płytki opłaszczano preparatami białkowymi o takim samym stężeniu jak w przypadku wyznaczenia współczynników odcięcia. We wszystkich testach IgG ELISA rozcieńczenie surowic wynosiło 1:100.

W testach wykorzystano pulę:

- 75 surowic koci (30 pozytywnych, 45 negatywnych)
- 86 surowic końskich (36 pozytywnych, 50 negatywnych)
- 191 surowic owczych (140 pozytywnych, 51 negatywnych)
- 168 surowic świńskich (81 pozytywnych, 87 negatywnych)

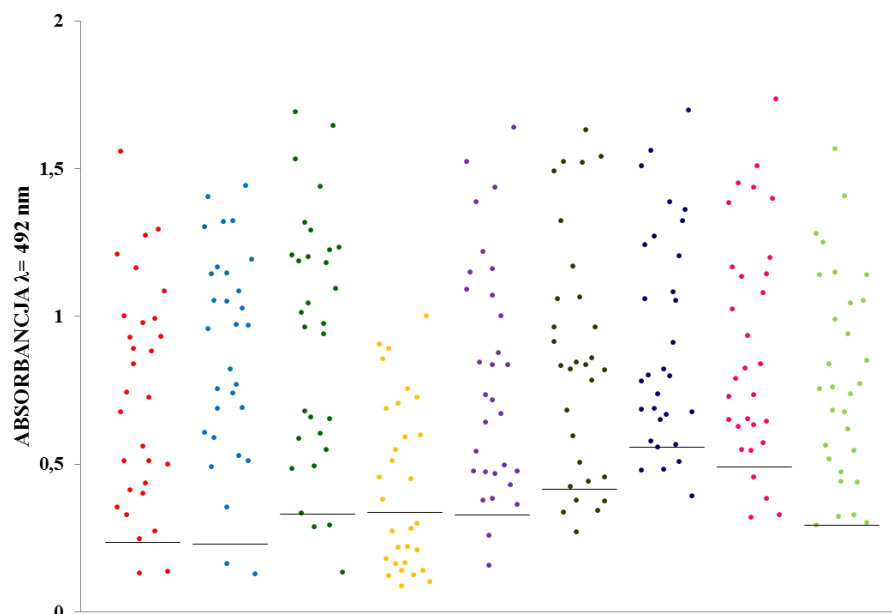
5.7.3.1. Oszacowanie przydatności rekombinantowych antygenów chimerycznych w serodiagnostyce toksoplazmozy u kotów

Wyniki uzyskane w pośrednich testach IgG ELISA z wykorzystaniem surowic kocich zebrano w tabeli 15 oraz przedstawiono na wykresie (Rys. 25). Reaktywność poszczególnych antygenów chimerycznych jest zdecydowanie bardziej zróżnicowana, niż w przypadku testów IgG ELISA z wykorzystaniem surowic ludzkich. Najwyższą reaktywność na poziomie 93,3% odnotowano dla antygenów chimerycznych MIC1-MAG1-SAG1_M, SAG1_D-MIC1-MAG1 oraz SAG2-GRA1-ROP1_D. Niższą reaktywność zaobserwowano dla mieszanek rMIC1+rMAG1+rSAG1 (90%) oraz rGRA1+rGRA2+rGRA6 (86,7%), a także antygenu chimerycznego GRA1-GRA2-GRA6 (86,7%). Analizując uzyskane wyniki zauważyć można, że średni zakres wartości mierzonych absorbancji w porównaniu do poliwalentnego antygeny natywnego (0,798) jest zbliżony dla wszystkich preparatów białkowych, wyjątek stanowi antygen SAG2-GRA1-ROP1_M (0,427), który był również najslabiej rozpoznawany przez swoiste przeciwciała antytoksoplazmowe (50%).

Tab. 15. Wyniki testów IgG ELISA dla surowic kocich w zależności od wykorzystanego antygeny.

ANTYGEN		SUROWICE	SUROWICE	WARTOŚĆ „cutoff”
		SEROPOZYTYWNE <i>n</i> = 30	SEROPOZYTYWNE <i>n</i> = 45	
MIC1-MAG1-SAG1 _M	1	28 (93,3)	0	0,237
	2	0,732 (0,133-1,558)	0,119 (0,072-0,223)	
SAG1 _D -MIC1-MAG1	1	28 (93,3)	0	0,231
	2	0,880 (0,130-1,444)	0,124 (0,081-0,227)	
M: rMIC1+rMAG1+rSAG1	1	27 (90)	0	0,331
	2	0,931 (0,133-1,691)	0,154 (0,090-0,329)	
SAG2-GRA1-ROP1 _M	1	15 (50)	0	0,337
	2	0,427 (0,087-1,002)	0,095 (0,061-0,327)	
SAG2-GRA1-ROP1 _D	1	28 (93,3)	0	0,329
	2	0,791 (0,157-1,639)	0,150 (0,071-0,317)	
M: rSAG2+rGRA1+rROP1	1	25 (83,3)	0	0,417
	2	0,859 (0,271-1,630)	0,195 (0,079-0,384)	
GRA1-GRA2-GRA6	1	26 (86,7)	0	0,556
	2	0,918 (0,394-1,697)	0,338 (0,104-0,524)	
M: rGRA1+rGRA2+rGRA6	1	26 (86,7)	0	0,490
	2	0,897 (0,320-1,736)	0,248 (0,107-0,489)	
TLA	1	30 (100)	0	0,293
	2	0,798 (0,295-1,566)	0,125 (0,074-0,226)	

Objaśnienia: 1 – liczba surowic, która dała wynik pozytywny (wyrażona w procentach), 2 – średnia wartość mierzonej absorbancji (zakres mierzonej absorbancji).



Rys. 25. Wykres przedstawiający reaktywność poszczególnych preparatów białkowych z przeciwciałami zawartymi w surowicach kocich. Poszczególne kolory znaczników odpowiadają następującym preparatom białkowym: (●) antygen chimeryczny MIC1-MAG1-SAG1_M; (●) antygen chimeryczny SAG1_D-MIC1-MAG1; (●) mieszanka antygenów rMIC1+rMAG1+rSAG1; (●) antygen chimeryczny SAG2-GRA1-ROP1_M; (●) antygen chimeryczny SAG2-GRA1-ROP1_D; (●) mieszanka antygenów rSAG2+rGRA1+rROP1; (●) antygen chimeryczny GRA1-GRA2-GRA6; (●) mieszanka antygenów rGRA1+rGRA2+rGRA6; (●) poliwalentny antygen natywny TLA. Linie poziome oznaczają wartości „cutoff” dla poszczególnych preparatów białkowych.

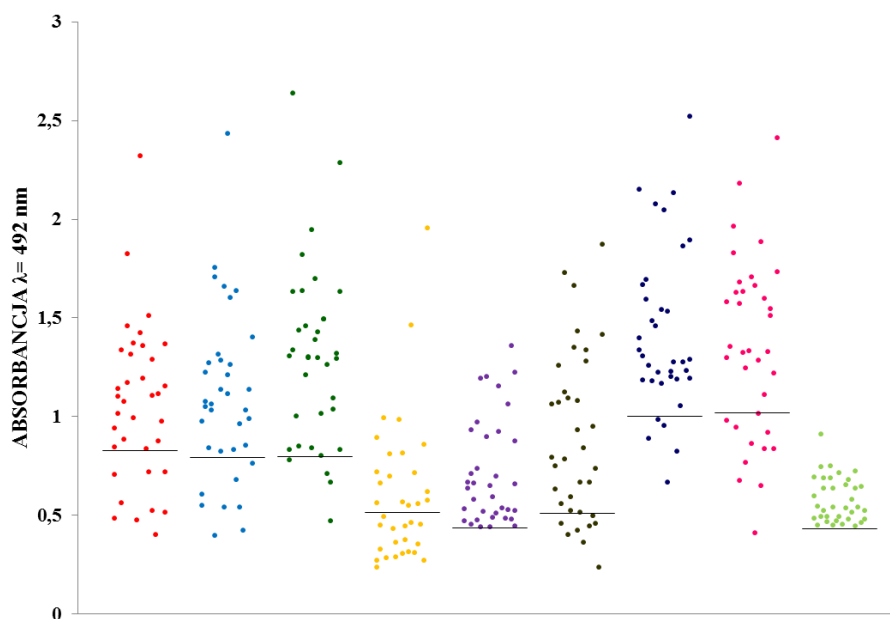
5.7.3.2. Oszacowanie przydatności rekombinantowych antygenów chimerycznych w serodiagnostyce toksoplazmozy u koni

Wyniki uzyskane w pośrednich testach IgG ELISA z wykorzystaniem surowic końskich zebrano w tabeli 16 oraz przedstawiono na wykresie (Rys. 26). Reaktywność na poziomie 100% zaobserwować można dla poliwalentnego antygenu natywnego TLA oraz antygenu chimerycznego SAG2-GRA1-ROP1_D. Stosunkowo wysoką reaktywność posiadała również mieszanka rMIC1+rMAG1+rSAG1 (88,9%) oraz antygen chimeryczny GRA1-GRA2-GRA6 (86,1%). Pozostałe preparaty białkowe charakteryzowały się zdecydowanie mniejszą przydatnością immunodiagnostyczną (reaktywność poniżej 80%). Ponownie najniższą reaktywność odnotowano dla antygenu chimerycznego SAG2-GRA1-ROP1_M (50%), co potwierdza fakt, iż przy konstrukcji antygenów chimerycznych kluczowy jest dobór wielkości fragmentów immunodominujących.

Tab. 16. Wyniki testów IgG ELISA dla surowic końskich w zależności od wykorzystanego antygeny.

ANTYGEN		SUROWICE	SUROWICE	WARTOŚĆ „cutoff”
		SEROPOZYTYWNE <i>n</i> = 36	SEROPOZYTYWNE <i>n</i> = 50	
MIC1-MAG1-SAG1 _M	1	27 (75)	0	0,828
	2	1,059 (0,401-2,321)	0,561 (0,299-0,797)	
SAG1 _D -MIC1-MAG1	1	28 (77,8)	0	0,793
	2	1,088 (0,397-2,435)	0,573 (0,283-0,790)	
M: rMIC1+rMAG1+rSAG1	1	32 (88,9)	0	0,799
	2	1,293 (0,470-2,637)	0,654 (0,329-0,788)	
SAG2-GRA1-ROP1 _M	1	18 (50)	0	0,517
	2	0,596 (0,236-1,956)	0,314 (0,154-0,458)	
SAG2-GRA1-ROP1 _D	1	36 (100)	0	0,437
	2	0,714 (0,439-1,358)	0,322 (0,129-0,433)	
M: rSAG2+rGRA1+rROP1	1	28 (77,8)	0	0,512
	2	0,889 (0,238-1,871)	0,388 (0,156-0,511)	
GRA1-GRA2-GRA6	1	31 (86,1)	0	1,002
	2	1,416 (0,669-2,518)	0,730 (0,313-0,986)	
M: rGRA1+rGRA2+rGRA6	1	24 (66,7)	0	1,021
	2	1,348 (0,409-2,412)	0,720 (0,375-1,002)	
TLA	1	36 (100)	0	0,433
	2	0,578 (0,445-0,910)	0,346 (0,202-0,429)	

Objaśnienia: 1 – liczba surowic, która dała wynik pozytywny (wyrażona w procentach), 2 – średnia wartość mierzonej absorbancji (zakres mierzonej absorbancji).



Rys. 26. Wykres przedstawiający reaktywność poszczególnych preparatów białkowych z przeciwciałami zawartymi w surowicach końskich. Poszczególne kolory znaczników odpowiadają następującym preparatom białkowym: (●) antygen chimeryczny MIC1-MAG1-SAG1_M; (●) antygen chimeryczny SAG1_D-MIC1-MAG1; (●) mieszanka antygenów rMIC1+rMAG1+rSAG1; (●) antygen chimeryczny SAG2-GRA1-ROP1_M; (●) antygen chimeryczny SAG2-GRA1-ROP1_D; (●) mieszanka antygenów rSAG2+rGRA1+rROP1; (●) antygen chimeryczny GRA1-GRA2-GRA6; (●) mieszanka antygenów rGRA1+rGRA2+rGRA6; (●) poliwalentny antygen natywny TLA. Linie poziome oznaczają wartości „cutoff” dla poszczególnych preparatów białkowych.

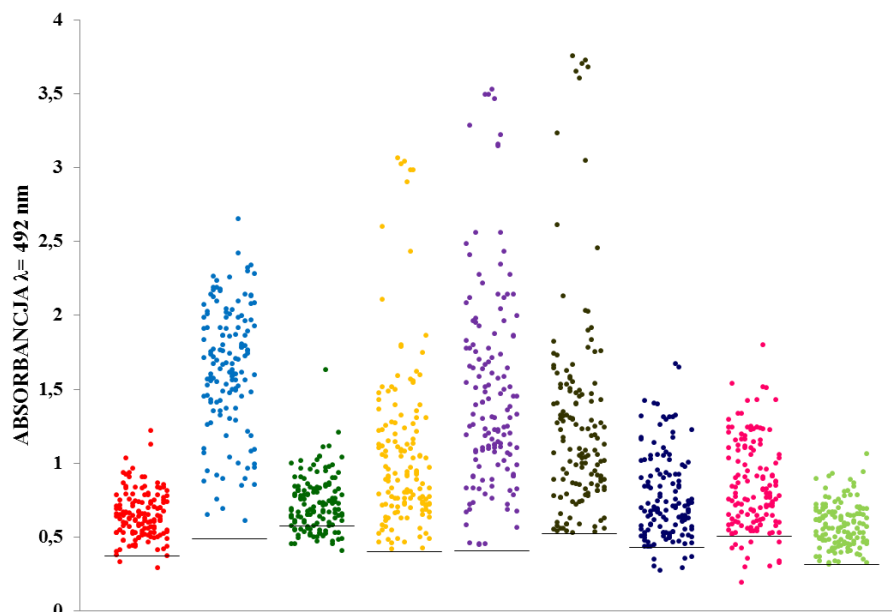
5.7.3.3. Oszacowanie przydatności rekombinantowych antygenów chimerycznych w serodiagnostyce toksoplazmozy u owiec

Wyniki uzyskane w pośrednich testach IgG ELISA z wykorzystaniem surowic owczych zebrano w tabeli 17 oraz przedstawiono na wykresie (Rys. 27). Porównywalną reaktywność z poliwalentnym antygenem natywnym TLA na poziomie 100% odnotowano dla antygenów chimerycznych MIC1-MAG1-SAG1_D, SAG2-GRA1-ROP1_M, SAG2-GRA1-ROP1_D oraz mieszanki rSAG2+rGRA1+rROP1. Analizując wyniki, zauważyć można, iż dla tych antygenów średnie wartości mierzonej absorbancji są również co najmniej dwukrotnie wyższe, niż dla TLA (0,544). Reaktywność powyżej 90% odnotowano również dla antygenów chimerycznych MIC1-MAG1-SAG1_M (97,9%) oraz GRA1-GRA2-GRA6 (95,7%), a także dla mieszanki rGRA1+rGRA2+rGRA6 (92,1%). Średnie wartości mierzonej absorbancji dla tych preparatów antygenowych były nieznacznie wyższe od średniej wartości absorbancji uzyskanej dla TLA. Najmniejszą przydatnością immunodiagnostyczną charakteryzowała się mieszanka rMIC1+rMAG1+rSAG1, która miała reaktywność na poziomie 77,9%, dodatkowo specyficzność testu IgG ELISA z wykorzystaniem tej mieszanki wynosiła tylko 92,2%.

Tab. 17. Wyniki testów IgG ELISA dla surowic owczych w zależności od wykorzystanego antygeny.

ANTYGEN		SUROWICE	SUROWICE	WARTOŚĆ „cutoff”
		SEROPOZYTYWNE <i>n</i> = 140	SEROPOZYTYWNE <i>n</i> = 51	
MIC1-MAG1-SAG1 _M	1	137 (97,9)	0	0,373
	2	0,658 (0,294-1,223)	0,271 (0,119-0,372)	
SAG1 _D -MIC1-MAG1	1	140 (100)	0	0,487
	2	1,650 (0,612-2,655)	0,380 (0,182-0,485)	
M: rMIC1+rMAG1+rSAG1	1	109 (77,9)	4 (7,8)	0,574
	2	0,724 (0,410-1,633)	0,433 (0,120-0,834)	
SAG2-GRA1-ROP1 _M	1	140 (100)	0	0,400
	2	1,079 (0,419-3,066)	0,273 (0,109-0,397)	
SAG2-GRA1-ROP1 _D	1	140 (100)	0	0,406
	2	1,479 (0,447-3,530)	0,258 (0,111-0,401)	
M: rSAG2+rGRA1+rROP1	1	140 (100)	0	0,525
	2	1,291 (0,530-3,753)	0,345 (0,106-0,500)	
GRA1-GRA2-GRA6	1	134 (95,7)	0	0,433
	2	0,762 (0,273-1,673)	0,262 (0,060-0,432)	
M: rGRA1+rGRA2+rGRA6	1	129 (92,1)	0	0,505
	2	0,847 (0,193-1,798)	0,280 (0,061-0,502)	
TLA	1	140 (100)	0	0,314
	2	0,544 (0,316-1,066)	0,266 (0,129-0,313)	

Objaśnienia: 1 – liczba surowic, która dała wynik pozytywny (wyrażona w procentach), 2 – średnia wartość mierzonej absorbancji (zakres mierzonej absorbancji).



Rys. 27. Wykres przedstawiający reaktywność poszczególnych preparatów białkowych z przeciwciałami zawartymi w surowicach owczych. Poszczególne kolory znaczników odpowiadają następującym preparatom białkowym: (●) antygen chimeryczny MIC1-MAG1-SAG1_M; (●) antygen chimeryczny SAG1_D-MIC1-MAG1; (●) mieszanka antygenów rMIC1+rMAG1+rSAG1; (●) antygen chimeryczny SAG2-GRA1-ROP1_M; (●) antygen chimeryczny SAG2-GRA1-ROP1_D; (●) mieszanka antygenów rSAG2+rGRA1+rROP1; (●) antygen chimeryczny GRA1-GRA2-GRA6; (●) mieszanka antygenów rGRA1+rGRA2+rGRA6; (●) poliwalentny antygen natywny TLA. Linie poziome oznaczają wartości „cutoff” dla poszczególnych preparatów białkowych.

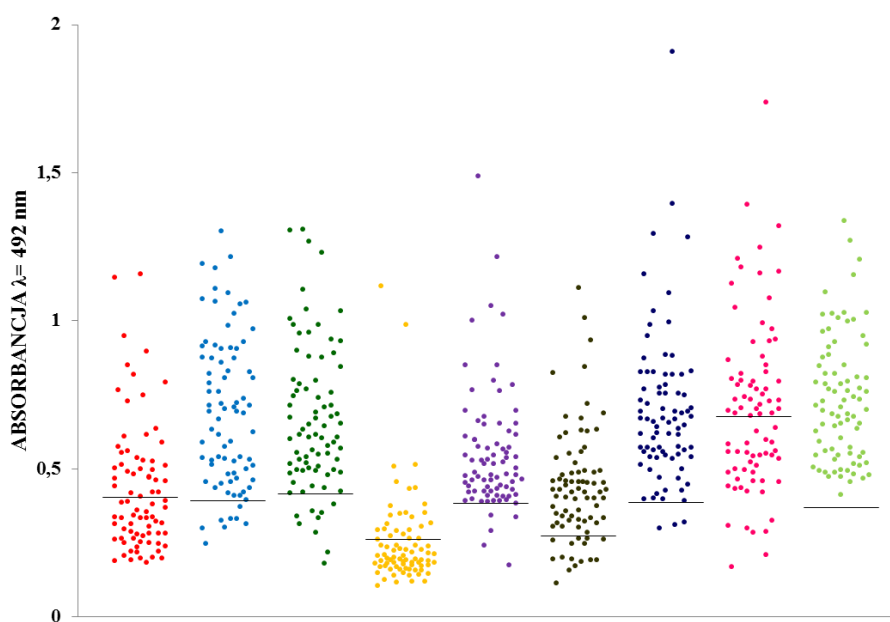
5.7.3.4. *Oszacowanie przydatności rekombinantowych antygenów chimerycznych w serodiagnostyce toksoplazmozy u świń*

Wyniki uzyskane w pośrednich testach IgG ELISA z wykorzystaniem surowic świńskich zebrano w tabeli 18 oraz przedstawiono na wykresie (Rys. 28). Reaktywność na poziomie 100% można zaobserwować wyłącznie dla poliwalentnego antygeny natywnego TLA. Biorąc pod uwagę wyniki uzyskane dla innych grup zwierząt, reaktywność poszczególnych antygenów chimerycznych w testach IgG ELISA z wykorzystaniem surowic świńskich jest zdecydowanie najbardziej zróżnicowana. Wysoką reaktywnością powyżej 90% charakteryzują się antygeny chimeryczne GRA1-GRA2-GRA6 (96,3%), SAG2-GRA1-ROP1_D (93,8%) oraz SAG1_D-MIC1-MAG1 (90,1%). Najniższą reaktywność wykazują antygeny chimeryczne zawierające mniejsze fragmenty immunodominujące SAG2-GRA1-ROP1_M (28,4%) oraz MIC1-MAG1-SAG1_M (45,7%). Stosunkowo wysoką reaktywność odnotowano również dla mieszanek rMIC1+rMAG1+rSAG1 (88,9%) oraz rSAG2+rGRA1+rROP1 (81,5%). Małą przydatnością diagnostyczną charakteryzuje się również mieszanka rGRA1+rGRA2+rGRA6 (54,3%), dla której ponadto wyznaczono stosunkowo wysoką wartość współczynnika odcięcia (0,677) w odniesieniu do pozostałych antygenów.

Tab. 18. Wyniki testów IgG ELISA dla surowic świńskich w zależności od wykorzystanego antygeny.

ANTYGEN		SUROWICE	SUROWICE	WARTOŚĆ „cutoff”
		SEROPOZYTYWNE <i>n</i> = 81	SEROPOZYTYWNE <i>n</i> = 87	
MIC1-MAG1-SAG1 _M	1	37 (45,7)	0	0,404
	2	0,433 (0,184-1,159)	0,271 (0,063-0,393)	
SAG1 _D -MIC1-MAG1	1	73 (90,1)	0	0,393
	2	0,691 (0,248-1,304)	0,321 (0,059-0,391)	
M: rMIC1+rMAG1+rSAG1	1	72 (88,9)	0	0,415
	2	0,664 (0,182-1,308)	0,284 (0,058-0,407)	
SAG2-GRA1-ROP1 _M	1	23 (28,4)	0	0,262
	2	0,252 (0,104-1,116)	0,179 (0,066-0,261)	
SAG2-GRA1-ROP1 _D	1	76 (93,8)	0	0,384
	2	0,550 (0,174-1,488)	0,273 (0,062-0,375)	
M: rSAG2+rGRA1+rROP1	1	66 (81,5)	0	0,275
	2	0,436 (0,114-1,112)	0,224 (0,062-0,274)	
GRA1-GRA2-GRA6	1	78 (96,3)	0	0,387
	2	0,694 (0,300-1,909)	0,329 (0,096-0,382)	
M: rGRA1+rGRA2+rGRA6	1	44 (54,3)	0	0,677
	2	0,705 (0,169-1,738)	0,432 (0,112-0,676)	
TLA	1	81 (100)	0	0,369
	2	0,734 (0,414-1,337)	0,297 (0,059-0,364)	

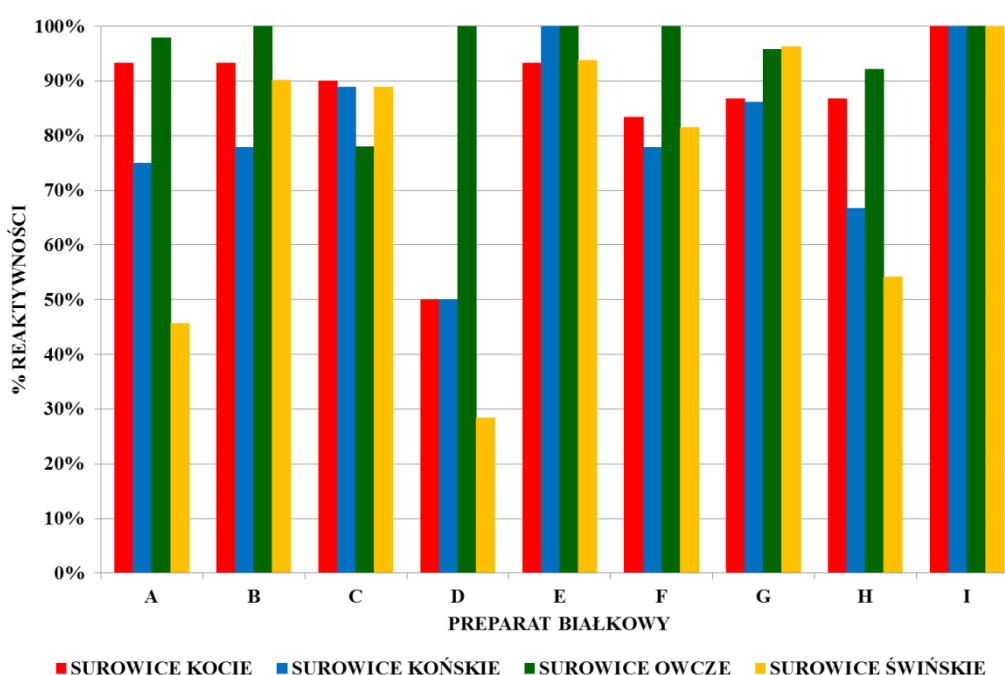
Objaśnienia: 1 – liczba surowic, która dała wynik pozytywny (wyrażona w procentach), 2 – średnia wartość mierzonej absorbancji (zakres mierzonej absorbancji).



Rys. 28. Wykres przedstawiający reaktywność poszczególnych preparatów białkowych z przeciwciałami zawartymi w surowicach świńskich. Poszczególne kolory znaczników odpowiadają następującym preparatom białkowym: (●) antygen chimeryczny MIC1-MAG1-SAG1_M; (●) antygen chimeryczny SAG1_D-MIC1-MAG1; (●) mieszanka antygenów rMIC1+rMAG1+rSAG1; (●) antygen chimeryczny SAG2-GRA1-ROP1_M; (●) antygen chimeryczny SAG2-GRA1-ROP1_D; (●) mieszanka antygenów rSAG2+rGRA1+rROP1; (●) antygen chimeryczny GRA1-GRA2-GRA6; (●) mieszanka antygenów rGRA1+rGRA2+rGRA6; (●) poliwalentny antygen natywny TLA. Linie poziome oznaczają wartości „cutoff” dla poszczególnych preparatów białkowych.

5.7.4. Podsumowanie

Analizując wyniki uzyskane dla wszystkich grup zwierząt (Rys. 29), zaobserwować można, iż najlepszą przydatnością immunodiagnostyczną porównywalną z poliwalentnym antygenem natywnym TLA (100%) charakteryzuje się antygen chimeryczny SAG2-GRA1-ROP1_D, który wykazuje najwyższą reaktywność niezależnie od badanej grupy zwierząt (od 93,3% dla IgG ELISA z wykorzystaniem surowic kocich do 100% dla IgG ELISA z wykorzystaniem surowic końskich i owczych). Stosunkowo wysoką reaktywnością charakteryzują się również antygeny chimeryczne GRA1-GRA2-GRA6 (od 86,1-96,3%) oraz SAG1_D-MIC1-MAG1 (od 77,8-100%). Zdecydowanie niższą reaktywność wykazują antygeny chimeryczne zawierające mniejsze fragmenty immunodominujące SAG2-GRA1-ROP1_M i MIC1-MAG1-SAG1_M oraz mieszanki antygenów. Antygeny charakteryzujące się wysoką reaktywnością w testach IgG ELISA z wykorzystaniem surowic ludzkich są w niektórych przypadkach bezużyteczne do diagnostyki toksoplazmozy u zwierząt (np. antygen chimeryczny SAG2-GRA1-ROP1_M wykazuje reaktywność $\leq 50\%$ w przypadku 3 grup zwierząt). Możliwe, iż sam proces inwazji *T. gondii* u różnych gatunków zwierząt przebiega odmiennie, co może mieć związek ze zróżnicowaniem szczepów pasożyta oraz ich zjadliwością, a to z kolei może wpływać na stymulację układu immunologicznego.



Rys. 29. Wykres przedstawiający reaktywność poszczególnych preparatów białkowych w testach IgG ELISA z wykorzystaniem surowic pochodzących od różnych gatunków zwierząt. Poszczególne litery odpowiadają następującym preparatom antygenowym: A – MIC1-MAG1-SAG1_M; B – SAG1_D-MIC1-MAG1; C – mieszanka rMIC1+rMAG1+rSAG1; D – SAG2-GRA1-ROP1_M; E – SAG2-GRA1-ROP1_D; F – mieszanka rSAG2+rGRA1+rROP1; G – GRA1-GRA2-GRA6; H – mieszanka rGRA1+rGRA2+rGRA6; I – poliwalentny antygen natywny TLA.

5.8. Ocena właściwości immunoprotekcyjnych wybranych antygenów chimerycznych na modelu mysiej toksoplazmozy

Badania na zwierzętach zostały przeprowadzone w ramach trzymiesięcznego wyjazdowego stażu badawczo-rozwojowego realizowanego pod opieką dr Justyny Gatkowskiej z Zakładu Immunoparazytologii Uniwersytetu Łódzkiego. Wszystkie doświadczenia przeprowadzono zgodnie z wnioskiem pt.: „Ocena właściwości immunoprotekcyjnych wybranych preparatów rekombinantowych antygenów chimerycznych *Toxoplasma gondii* na modelu mysiej toksoplazmozy” złożonym i zatwierdzonym przez Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach nr 9 w Łodzi (zgoda nr 36/ŁB718/2014 z 14 lipca 2014 r.). W celu oceny właściwości immunoprotekcyjnych rekombinantowych antygenów chimerycznych złożonych z trzech fragmentów immunodominujących białek pasożyta *T. gondii*, jako podjednostkowych szczepionek antytoksoplazmozowych przeprowadzono badania na modelu mysiej toksoplazmozy. Do przeprowadzenia doświadczeń na zwierzętach wytypowano rekombinantowe antygeny chimeryczne, które w testach serologicznych z wykorzystaniem ludzkich i zwierzęcych surowic, charakteryzowały się największą reaktywnością. Na podstawie uzyskanych wyników do badań wybrano antygeny chimeryczne SAG1_D-MIC1-MAG1 oraz SAG2-GRA1-ROP1_D.

Do przeprowadzenia doświadczenia wybrano 35 samców myszy szczepu C3H/HeOuJ, które losowo podzielono na trzy grupy liczące od 11-13 osobników.

Myszy immunizowano następującymi preparatami:

- PBS + IFA (grupa kontrolna) – 13 osobników;
- SAG1_D-MIC1-MAG1 + PBS/IFA (grupa badana I) – 11 osobników;
- SAG2-GRA1-ROP1_D + PBS/IFA (grupa badana II) – 11 osobników.

Preparaty szczepionkowe były podawane podskórnym w 3 dawkach w dwutygodniowych odstępach [Metody 4.11.2].

Po 2 tygodniach od podania ostatniej dawki preparatów szczepionkowych myszy zarażano pasożytem poprzez podanie dootrzewnowo 5 cyst mózgowych szczepu DX *T. gondii* [Metody 4.11.3], które uzyskano z pasażu *in vivo* cyst słabo zjadliwego szczepu DX *T. gondii* na myszach szczepu C57BL/6 [Metody 4.11.1]. Po upływie ok. 3 tygodni od momentu zarażenia padły 2 myszy z grupy kontrolnej (immunizowanej PBS + niekompletny adjuwant Freund), co mogło być konsekwencją rozwoju zbyt dużej liczby cyst *T. gondii* dla ich przeżycia lub uogólnionym stanem zapalnym spowodowanym zarażeniem pasożytem.

5.8.1. Ocena właściwości immunoprotekcyjnych

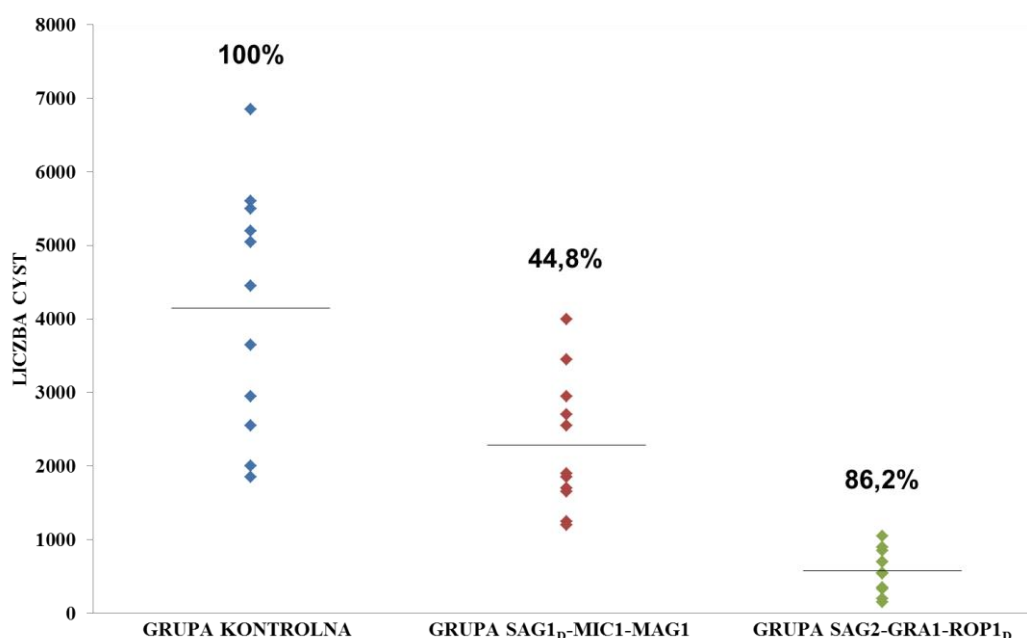
Po 30 dniach od momentu wywołania doświadczalnej toksoplazmozy wszystkie immunizowane myszy poddano eutanazji, izolowano mózgowia, które homogenizowano, a następnie określano liczbę cyst utworzonych w mózgowiach

poszczególnych osobników [Metody 4.11.4]. Liczbę cyst słabo zjadliwego szczepu DX *T. gondii* w mózgowiach immunizowanych myszy zestawiono w tabeli 19 oraz przedstawiono na wykresie (Rys.30).

Tab. 19. Liczba cyst *T. gondii* w mózgowiach immunizowanych myszy.

PREPARAT SZCZEPIONKOWY	LICZBA CYST W MÓZGOWIACH POSZCZEGÓLNYCH OSOBNIKÓW											ŚREDNIA
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
PBS + IFA	6850	5200	2550	4450	2950	2000	3650	5500	1850	5600	5050	4150
SAG1 _D -MIC1-MAG1 + PBS/IFA	1250	1650	1850	2950	1200	3450	1700	4000	2550	2700	1900	2291
SAG2-GRA1-ROP1 _D + PBS/IFA	333	533	550	850	350	700	150	200	900	1050	700	574

Objaśnienia: IFA – niekompletny adjuwant Freund'a



Rys. 30. Wykres przedstawiający liczbę cyst w mózgowiu myszy C3H/HeOuJ immunizowanych antygenami chimerycznymi SAG1_D-MIC1-MAG1 oraz SAG2-GRA1-ROP1_D w odniesieniu do grupy kontrolnej.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazują, iż antygeny chimeryczne mogą być potencjalnymi antytoksooplazmozowymi szczepionkami podjednostkowymi (Rys. 30). Immunizacja myszy antygenem chimerycznym SAG2-GRA1-ROP1_D spowodowała obniżenie liczby cyst w mózgowiu zarażonych myszy aż o 86,2% ($p < 0,001$), w odniesieniu do grupy kontrolnej. W grupie immunizowanej antygenem chimerycznym SAG1_D-MIC1-MAG1, redukcja liczby cyst wynosiła tylko 44,8% ($p = 0,008$). Uzyskane wyniki wstępnie wskazują, iż przy konstrukcji antygenów chimerycznych o potencjalnych właściwościach immunoprotekcyjnych szczególną uwagę należy zwrócić na dobór białek wchodzących w ich skład. Ponadto,

zdecydowanie korzystniej jest immunizować myszy antygenami chimerycznymi złożonymi z dużych fragmentów immunodominujących poszczególnych białek pasożyta (SAG2, GRA1, ROP1). Przeprowadzone badania pokazują również, iż wykorzystane w doświadczeniach rekombinantowe antygeny chimeryczne SAG1_D-MIC1-MAG1 oraz SAG2-GRA1-ROP1_D zdolne są do stymulacji układu odpornościowego myszy do produkcji swoistych produktów odpowiedzi immunologicznej, które rozpoznają natywne antygeny *T. gondii*, o czym świadczy przede wszystkim redukcja liczby cyst u myszy immunizowanych SAG2-GRA1-ROP1_D.

6. DYSKUSJA

W związku ze zdolnością pasożyta *T. gondii* do zarażania szerokiego spektrum zwierząt stałocieplnych oraz mnogością dróg transmisji pomiędzy różnymi żywicielami trudno jest ustalić właściwe algorytmy diagnostyczne dla toksoplazmozy u ludzi i zwierząt. Jedną z głównych dróg transmisji pasożyta do organizmu człowieka jest spożywanie niedogotowanego lub surowego mięsa oraz nieodpowiednio przetworzonych produktów mlecznych pochodzących od zwierząt hodowlanych. Niestety w wielu krajach nie monitoruje się sytuacji epidemiologicznej chorób pasożytniczych (w tym i toksoplazmozy) u zwierząt hodowlanych, co wynika najczęściej z braku odpowiednich regulacji prawnych. Kolejną przyczyną takiego stanu rzeczy jest brak tanich i wiarygodnych testów diagnostycznych, które pozwoliłyby na rutynową diagnostykę bardzo dużej liczby prób. Dlatego też cały czas prowadzi się intensywne badania nad nowymi narzędziami diagnostycznymi, które mogłyby być zastosowane do kontroli nad częstością występowania zarażenia *T. gondii* u zwierząt hodowlanych.

Sytuacja epidemiologiczna toksoplazmozy u ludzi jest zdecydowanie bardziej kontrolowana między innymi przez Światową Organizację Zdrowia (WHO). Na przestrzeni ostatnich 25 lat opublikowano wyniki wielu badań, które pozwoliły dokładnie poznać budowę antygenową oraz funkcję poszczególnych białek *T. gondii*, co pozwala na konstrukcję nowych narzędzi diagnostycznych. Diagnostyka toksoplazmozy u ludzi oparta jest głównie na testach serologicznych wykorzystujących poliwalentny antygen natywny TLA, które pozwalają na wykrywanie przeciwciał antytoksoplazmowych klas IgG, IgM i IgA. Czułość i swoistość tych testów uzależniona jest przede wszystkim od miana produkowanych przeciwciał poszczególnych klas, jak również od jakości wykorzystywanego w testach antygeny. Produkcja TLA jest niestety kosztowna, czasochłonna i pracochłonna oraz wiąże się z niebezpieczeństwem zarażenia pasożytem wynikającym z konieczności prowadzenia hodowli *T. gondii*. W związku z powyższym w wielu laboratoriach pracuje się nad otrzymywaniem rekombinantowych antygenów *T. gondii* w dobrze scharakteryzowanych układach ekspresyjnych. Daje to możliwość otrzymywania w łatwy i szybki sposób pojedynczych antygenów. Zaletą produkcji rekombinantowych antygenów *T. gondii* jest również możliwość stosowania pojedynczych białek lub ich mieszanek, które pozwolą na określenie fazy choroby, co jest szczególnie istotne z diagnostycznego punktu widzenia. Stosowanie rekombinantowych białek w testach daje lepszą powtarzalność wyników, a także wiąże się z łatwiejszą standaryzacją testu i możliwością doboru zawsze takiego samego składu preparatu białkowego.

Testowane pod kątem użyteczności diagnostycznej antygeny rekombinantowe są również wykorzystywane do badań, które pozwalają określić ich potencjalne

właściwości immunoprotekcyjne. Opracowanie szczepionki antytoksoplazmowej, którą można by uniwersalnie stosować u wszystkich zwierząt, jak również u ludzi wydaje się szczególnie istotne. Jedyna dopuszczona do użytku w niektórych krajach szczepionka OvilisTM Toxovax przeznaczona dla owiec nie uodparnia niestety immunizowanej populacji zwierząt na całe życie i nie może być stosowana u innych gatunków.

Niniejsza praca dotyczyła konstrukcji nowej generacji narzędzi diagnostycznych, w postaci rekombinantowych antygenów chimerycznych złożonych z fragmentów immunodominujących trzech białek *T. gondii*. Celem prowadzonych badań było również oszacowanie ich użyteczności diagnostycznej w serodiagnostyce toksoplazmozy u ludzi i różnych grup zwierząt. Wybrane preparaty antygenowe, charakteryzujące się największą przydatnością diagnostyczną oceniono również pod kątem ich potencjalnego zastosowania szczepionkowego na modelu mysiej toksoplazmozy.

6.1. Konstrukcja plazmidów rekombinantowych oraz produkcja antygenów

Pierwszym zasadniczym etapem pracy była konstrukcja plazmidów rekombinantowych, które umożliwią wydajną ekspresję genów kodujących chimeryczne antygeny rekombinantowe złożone z fragmentów immunodominujących trzech różnych białek *T. gondii*. Wyboru fragmentów genów kodujących takie białka pasożyta jak GRA1, GRA2, GRA6, MAG1, MIC1, MIC3, ROPI, SAG1 oraz SAG2 wykorzystanych do konstrukcji plazmidów rekombinantowych dokonano na podstawie wcześniejszych badań dotyczących ich użyteczności diagnostycznej [Holec-Gąsior, 2013]. Ponadto pod uwagę wzięto informacje dotyczące występowania białek u poszczególnych form rozwojowych *T. gondii* oraz ich roli podczas procesu inwazji do komórek żywiciela. W poprzednich latach ukazało się kilka prac dotyczących wysokiego potencjału diagnostycznego antygenów chimerycznych w serodiagnostyce toksoplazmozy u ludzi [Beghetto i wsp., 2006; Dai i wsp., 2012, 2013; Holec-Gąsior i wsp., 2012; Lau i wsp., 2011]. Uzyskane wyniki pokazują, iż stosowanie antygenów chimerycznych pozwala na zwiększenie czułości testów w porównaniu do pojedynczych antygenów, czy ich mieszanek. Dodatkowymi korzyściami płynącymi z wykorzystania antygenów chimerycznych jest możliwość obniżenia kosztów oraz czasu produkcji, łatwiejsza standaryzacja testów, wynikająca z faktu, iż stosuje się jeden ściśle zdefiniowany preparat białkowy, a nie tak jak w przypadku mieszanek, kilka preparatów pojedynczych białek, które trzeba zmieszać w odpowiednim stosunku.

Dodatkowo wykorzystując plazmidy rekombinantowe znajdujące się w kolekcji Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii oraz stosując wcześniej opisane warunki ekspresji genów [Hiszczyńska-Sawicka i wsp., 2003, 2005; Holec, 2007, Holec i wsp., 2007, 2008; Holec-Gąsior i wsp., 2009] wyprodukowano pojedyncze antygeny

rekombinantowe wchodzące w skład antygenów chimerycznych. Białka te natępnie posłużyły do przygotowania mieszanek, które również poddano analizie użyteczności w testach IgG ELISA. Uzyskane wyniki odnoszono do rezultatów uzyskanych w testach opartych na antygenach chimerycznych.

6.2. *Użyteczność antygenów chimerycznych w serodiagnostyce toksoplazmozy u ludzi*

Kolejny etap niniejszej pracy dotyczył oszacowania przydatności diagnostycznej poszczególnych rekombinantowych antygenów chimerycznych *T. gondii*. W tym celu w pośrednim teście IgG ELISA określano zdolność białek do detekcji swoistych przeciwciał antytoksoplazmowych w próbach surowic, co pozwalało by na wykrycie zarażenia pasożytem zarówno u pacjentów z wczesną fazą choroby, jak również u osób z dawno odbytym zarażeniem, u których w surowicach występuje najczęściej niskie miano swoistych przeciwciał anti-*T. gondii*. Z jednej strony diagnostyka pierwotnego zarażenia pasożytem jest szczególnie istotna w przypadku kobiet w ciąży oraz osób z nieprawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym, co może pozwolić na podjęcie odpowiedniej terapii lekowej spiramycyną, sulfadiazyną lub pirymetaminą. Z drugiej strony w świetle wielu badań przeprowadzonych w ostatnich latach diagnostyka dawno nabytego zarażenia również jest istotna i może stanowić wytłumaczenie zaburzeń behawioralnych oraz chorób neurologicznych. Przypuszcza się, iż dawne zarażenie pasożytem można powiązać między innymi z występowaniem drgawek, spowolnionym czasem reakcji, utratą pamięci, podwyższonym ryzykiem zachorowań na chorobę dwubiegunową, schizofrenię i depresję, a nawet wyższym odsetkiem samobójstw [Godwin, 2012; Henriquez i wsp., 2009; Pedersen i wsp., 2012; Stommet i wsp., 2001; Torrey i wsp., 2012; Webster i wsp., 2006, 2013].

Czułość testów IgG ELISA opartych na antygenach chimerycznych uzyskanych w niniejszej pracy była zróżnicowana i wynosiła od 88,4% do 100%, co w porównaniu do poliwalentnego antygeny natywnego TLA (98,9%) wskazuje na potencjalną użyteczność diagnostyczną tych preparatów białkowych do wykrywania zarażenia pasożytem (Tab. 13 i Rys. 24). Wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają zatem wcześniejsze doniesienia o dużym potencjale diagnostycznym antygenów chimerycznych, za pomocą których można dokonać detekcji swoistych przeciwciał antytoksoplazmowych w surowicach pacjentów niezależnie od fazy choroby. Pierwsza praca, w której wykazano użyteczność antygenów chimerycznych do serodiagnostyki toksoplazmozy u ludzi dotyczyła dwóch antygenów składających się z najbardziej immunoreaktywnych regionów antygenów MIC2₁₅₇₋₂₃₅, MIC3₂₃₄₋₃₀₇, SAG1₁₈₂₋₃₁₂ (GST-EC2) oraz GRA3₃₆₋₁₃₄, GRA7₂₄₋₁₀₂, M2AP₃₇₋₂₆₃ (GST-EC3) [Beghetto i wsp., 2006]. Czułość testów IgG ELISA dla obu antygenów EC2 i EC3 oszacowano na poziomie 100%, ponadto wykazano, iż antygeny te można również z powodzeniem zastosować

do wykrywania przeciwciał klasy IgM w surowicach pacjentów z wczesną fazą choroby; antygen EC2 charakteryzował się 98% reaktywnością, a EC3 84%. Kolejnym z antygenów, który został zastosowany do wykrywania immunoglobulin klasy IgG i IgM w surowicach ludzkich był antygen SAG1/2 [Lau i wsp., 2011]. W teście Western blotting wykazano wysoką użyteczność tego antygeny do wykrywania zarażenia zarówno u pacjentów z wczesną ostrą, z ostrą i przewlekłą fazą toksoplazmozy. Zespół Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej w jednej ze swoich wcześniejszych prac również wykazał potencjalną użyteczność antygeny chimerycznego MIC1-MAG1 do serodiagnostyki toksoplazmozy [Holec-Gąsior i wsp., 2012]. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż antygen chimeryczny MIC1-MAG1 (90,9%) charakteryzuje się reaktywnością zbliżoną do poliwalentnego antygeny natywnego TLA (91,8%), zdecydowanie większą niż pojedyncze białka rMIC1 (75,5%) i rMAG1 (60%) oraz mieszanka rMIC1+rMAG1 (69,1%). W pracy wykazano ponadto, iż antygen chimeryczny MIC1-MAG1 może mieć znaczący potencjał do określania indeksu awidności przeciwciał IgG. Ostatnim z zastosowanych dotychczas do diagnostyki toksoplazmozy u ludzi antygenów chimerycznych był multiepitopowy peptyd rMEP złożony z epitopów białek SAG1₃₀₉₋₃₁₈, SAG2₁₀₉₋₁₁₈ oraz SAG3₃₄₇₋₃₅₆ rozpoznawanych przez limfocyty B [Dai i wsp., 2012]. W pierwszym badaniu stwierdzono, iż białko rMEP charakteryzuje się wysoką reaktywnością w teście IgG ELISA zarówno w przypadku, gdy do badań zastosowano pulę surowic z wczesnej (87,5%), jak i przewlekłej (97,4%) fazy choroby. Ponadto, czułość testu IgM ELISA opartego na antygenie rMEP na poziomie 96,9% sugeruje, iż antygen ten może mieć znaczenie w różnicowaniu wczesnej i przewlekłej fazy choroby [Dai i wsp., 2012]. Zdolność różnicującą białka rMEP do detekcji swoistych przeciwciał antytoksoplazmowych klas IgG i IgM w surowicach kobiet z wczesną i przewlekłą toksoplazmozą potwierdzono w kolejnej pracy Dai i wsp. z 2013 roku. Uzyskane wyniki pokazują, iż dobierając odpowiednie stężenie antygeny rMEP do testu IgG i IgM ELISA można różnicować fazy zarażenia. Czułość testu IgG ELISA oszacowano odpowiednio na poziomie 25,9% dla surowic z wczesną fazą toksoplazmozy oraz 97,1% dla surowic z przewlekłą fazą choroby, podczas gdy czułość testu IgM ELISA wynosiła 96,6%.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy pokazują, iż czułość testów IgG ELISA opartych na antygenach chimerycznych SAG1_D-MIC1-MAG1, SAG2-GRA1-ROP1_D oraz GRA1-GRA2-GRA6 zawierających większe fragmenty immunodominujące poszczególnych białek pasożyta wynosi 100% i jest wyższa niż czułość testów IgG ELISA opartych na mieszkankach złożonych z trzech odpowiednich białek (Tab. 13). Reaktywność wyżej wymienionych antygenów chimerycznych jest też znacznie wyższa, niż wcześniej przetestowanych i opisanych w literaturze mieszanek takich jak: GRA7+GRA+SAG1 (98,4%) [Aubert i wsp., 2000], GRA7+ROP1 (96%) [Jacobs

i wsp., 1999], GRA1+GRA6 (98%) [Lecordier i wsp., 2000], GRA1+GRA7+SAG1 (100% surowic z fazy wczesnej oraz 91,1% dla surowic z przewlekłej fazy) [Pietkiewicz i wsp., 2004], GRA1+GRA7+SAG1 (88,9%), GRA6+GRA8+SAG2 (94,4%), MAG1+MIC1ex2+MIC3 (88,9%) [Holec i wsp., 2008], MAG1+SAG1+GRA5 (92,6%), GRA2+SAG1+GRA5 (93,1%), ROP1+SAG1+GRA5 (94,2%) [Holec-Gąsior i Kur, 2010]. Niższa czułość testów IgG ELISA opartych na mieszkankach antygenów może wynikać z faktu, iż opłaszczając płytkę preapratem kilku białek może dochodzić między nimi do zawady sferycznej, co skutkuje zasłonięciem ważnych determinant antygenowych, które nie są w konsekwencji tego rozpoznawane przez swoiste przeciwciała antytokosplazmowe. Należy również zaznaczyć, iż wartości współczynników odcięcia uzyskiwane dla mieszanek są zazwyczaj wyższe niż te uzyskiwane dla antygenów chimerycznych, a także od wartości „cut-off” wyznaczonych dla pojedynczych białek. Wyższe wartości współczynników odcięcia mogą wynikać z faktu, iż w mieszkankach występuje najprawdopodobniej więcej śladowych ilości białek *E. coli*, które mogą być rozpoznane przez przeciwciała anti-*E. coli* obecne w surowicach, co powoduje niespecyficzne oddziaływania, które wpływają na wzrost wartości „cut-off”. W związku z powyższym możliwe, iż niektóre surowice dodatnie, w których odnotowuje się niskie miano przeciwciał skierowanych przeciw poszczególnym białkom reagują nieznacznie powyżej wartości granicznej wyznaczonej dla pojedynczych antygenów, jednakże w momencie zastosowania mieszanki i po wyznaczeniu współczynników odcięcia surowice te dają na tyle słaby sygnał, iż znajdują się pod wartością graniczną i nie można ich prawidłowo zidentyfikować.

Rezultaty uzyskane dla antygenów chimerycznych złożonych z fragmentów immunodominujących białek MIC1, MAG1 oraz SAG1 *T. gondii* pokazują, iż podczas konstrukcji antygenów chimerycznych o potencjalnej użyteczności diagnostycznej oprócz doboru samych białek oraz wielkości ich fragmentów, należy zwrócić również uwagę na ich kolejność w finalnym konstrukcie. Analizując wyniki uzyskane dla poszczególnych antygenów chimerycznych można zaobserwować, iż dla antygenu SAG1_D-MIC1-MAG1 charakteryzującego się 100% reaktywnością odnotowywano znacznie wyższą wartość absorbancji od której poszczególne surowice seropozytywne dawały sygnał, a najwyraźniej widać to dla prób surowic od pacjentów z wczesną toksoplazmozą (Tab. 13). Wynika to najprawdopodobniej z faktu, iż C-końcowy fragment antygeny SAG1 zawiera ważne determinanty antygenowe rozpoznawane przez swoiste przeciwciała anti-*T. gondii* zawarte w próbach surowic od pacjentów z wczesną fazą choroby. Z drugiej strony rezultaty uzyskane dla antygeny MIC1-MAG1-SAG1_M mogą sugrować, iż w momencie, gdy fragment immunodominujący białka SAG1 znajduje się na C-końcu antygeny chimerycznego poszczególne determinanty antygenowe są lepiej eksponowane. Świadczyć o tym mogą zarówno wyższe średnie wartości absorbancji jak i zakresy absorbancji uzyskane dla

poszczególnych grup surowic seropozytywnych (Tab. 13 i Rys. 24A-C) zarówno w odniesieniu do antygeny SAG1_M-MIC1-MAG1 jak i SAG1_D-MIC1-MAG1. Analizując wyniki uzyskane dla antygenów chimerycznych SAG2-GRA1-ROP1_M i SAG2-GRA1-ROP1_D zaobserwować można jeszcze większe różnice w reaktywności poszczególnych preparatów w teście IgG ELISA (Tab. 13), co potwierdza, iż wielkość fragmentów immunodominujących wchodzących w skład antygeny chimeryczny może determinować jego zdolność do oddziaływania ze specyficznymi przeciwciałami anty-*T. gondii* skierowanymi przeciw danemu białku pasożyta. Średnia wartość absorbancji uzyskana dla antygeny SAG2-GRA1-ROP1_D (1,535), jest dwukrotnie wyższa niż odnotowana dla antygeny SAG2-GRA1-ROP1_M (0,778). Możliwe, iż krótszy fragment immunodominujący antygeny ROP1 w ogóle nie jest rozpoznawany przez swoiste przeciwciała anty-ROP1, a zmierzona wartość absorbancji pochodzi wyłącznie od swoistych przeciwciał IgG rozpoznających determinanty antygenowe białek SAG2 oraz GRA1. Hipotezę tę potwierdzają wyniki uzyskane dla mieszanki antygenów rSAG2+rGRA1+rROP1, która charakteryzuje się zbliżoną średnią wartością absorbancji, jak i zakresem odczytywanych absorbancji w porównaniu do antygeny SAG2-GRA1-ROP1_D. Przeprowadzone do tej pory badania pokazały, że w antygenie ROP1 występuje charakterystyczny asymetryczny ładunek, co sugeruje, iż może on brać udział w heterotypowym wiązaniu różnych białek. Dojrzałe białko ROP1 posiada w swojej sekwencji aminokwasowej tandemowe ośmioaminokwasowe powtórzenia bogate w reszty kwasu glutaminowego oraz proliny nadające kwaśny charakter N-końcowemu regionowi oraz centralnej części białka, natomiast region C-końcowy antygeny bogaty jest w reszty argininy nadające mu charakter zasadowy, który jest prawdopodobnie odpowiedzialny za stabilizowanie struktury całego białka [Bradley i Boothroyd, 1999; Ossorio i wsp., 1992; Soldati i wsp., 1995]. Możliwe jest zatem, iż zasadowy C-końcowy fragment antygeny ROP1 bogaty w reszty argininy posiada zasadnicze znaczenie i jest niezbędny do rozpoznania przez swoiste przeciwciała IgG. Innym wyjaśnieniem wysokiej reaktywności antygeny SAG2-GRA1-ROP1_D może być fakt, iż w C-końcowym regionie białka ROP1 występuje co najmniej jeden immunodominujący epitop dla limfocytów B, rozpoznawany przez większość populacji, podczas gdy odpowiedź na region N-końcowy białka jest zdecydowanie bardziej zmienna. Na podobny problem odnośnie reaktywności konkretnych regionów antygenów zwrócono uwagę już we wcześniejszych badaniach. W 2000 roku, Lecordier i wsp. zaobserwowali, iż tylko hydrofilowy N-końcowy region antygeny GRA6 jest rozpoznawany przez swoiste przeciwciała, podczas gdy C-końcowy region białka nie pozwalał na poprawne rozpoznanie tych samych surowic. Podobne różnice w immunoreaktywności występują dla różnych fragmentów antygeny MIC1, co udowodniono w teście IgG ELISA, w którym badano N-końcowy region antygeny (MIC1ex2), C-końcowy region (MIC1ex3ex4) oraz cały antygen MIC1 wykorzystując

do testów zarówno surowice od pacjentów z wczesną jak i przewlekłą fazą choroby. Uzyskane wyniki pokazały, iż tylko N-końcowy fragment antygeny reaguje ze swoistymi przeciwciałami IgG zawartymi w surowicach z wczesną (96,1%) i przewlekłą (75%) fazą choroby [Holec-Gąsior i wsp., 2008]. Rezultaty te sugerują, iż w przypadku niektórych antygenów tylko konkretny fragment białka może odpowiadać za oddziaływanie ze swoistymi immunoglobulinami, co może mieć miejsce również w przypadku antygeny ROP1.

Kolejny z uzyskanych w niniejszej pracy antygenów chimerycznych MAG1-MIC3-ROP1 składał się z krótkich fragmentów immunodominujących białek, które we wcześniejszych badaniach uznano za markery wczesnej fazy toksoplazmozy [Beghetto i wsp., 2003; Holec i wsp., 2007; Holec-Gąsior i wsp., 2009; Pfrepper i wsp., 2005]. Czulość testu IgG ELISA opartego na antygenie MAG1-MIC3-ROP1 wynosiła 87,8%, jednakże dokonując dokładnej analizy wyników można zauważyć, iż najwyższą 100% reaktywność odnotowano dla surowic z wczesnej fazy choroby, ponadto dla tej grupy surowic zaobserwowano najwyższą średnią wartość absorbancji oraz wartość absorbancji od której surowice dawały sygnał pozytywny. Można przypuszczać, iż swoiste przeciwciała antytoksoplazmowe zawarte w surowicach pacjentów z wczesną toksoplazmozą wykazują wyższe powinowactwo do determinant antygenowych zawartych w antygenie chimerycznym MAG1-MIC3-ROP1, niż przeciwciała zawarte w surowicach z przewlekłej fazy choroby, w których może znajdować się więcej przeciwciał skierowanych przeciw innym białkom pasożyta. O ile w świetle wyników uzyskanych dla antygenów SAG2-GRA1-ROP1_M i SAG2-GRA1-ROP1_D można spierać się na temat trafności wyboru fragmentu immunodominującego białka ROP1, wybór fragmentów białek MAG1 oraz MIC3 dokonany na podstawie wcześniej przeprowadzonych badań wydaje się jak najbardziej uzasadniony [Maksimov i wsp., 2012; Xiao i wsp., 2013]. Uzyskane rezultaty sugerują, iż dobierając odpowiednio krótkie fragmenty immunodominujące białek, które są prawdopodobnie najsilniej rozpoznawane przez swoiste przeciwciała anty-*T. gondii* można skonstruować antygen chimeryczny, który będzie markerem konkretnej fazy choroby, czego potwierdzeniem są również opisane wcześniej badania z wykorzystaniem antygeny rMEP [Dai i wsp., 2012, 2013]. Możliwe, iż dobierając odpowiednie stężenie antygeny chimerycznego MAG1-MIC3-ROP1 oraz rozcieńczenie przeciwciał drugorzędowych uzyskano by taki sam efekt jak Dai i wsp., co pozwoliłoby na różnicowanie wczesnej i przewlekłej fazy choroby już na podstawie testu IgG ELISA.

Podsumowując uzyskane wyniki dotyczące oszacowania przydatności rekombinantowych antygenów chimerycznych *T. gondii* do serodiagnostyki toksoplazmozy w teście IgG ELISA można stwierdzić, iż charakteryzują się one bardzo wysokim potencjałem diagnostycznym i stanowią alternatywę dla poliwalentnego antygeny natywnego TLA do wykrywania przeciwciał klasy IgG. 100% czulość testów

opartych na antygenach chimerycznych SAG1_D-MIC1-MAG1, SAG2-GRA1-ROP1_D oraz GRA1-GRA2-GRA6 składających się z większych fragmentów immunodominujących poszczególnych białek świadczy o przewadze tych preparatów nad mieszankami charakteryzującymi się niższą reaktywnością. Należy jednak pamiętać, iż przy konstrukcji antygenów chimerycznych trzeba zwrócić szczególną uwagę na wielkość fragmentów immunodominujących poszczególnych białek, a także na sam wybór antygenów pasożyta, ponieważ może to determinować reaktywność tych preparatów. Rezultaty uzyskane w niniejszej pracy dostarczają cennych informacji dotyczących sposobu konstrukcji antygenów chimerycznych, które mogą zostać wykorzystane również przy tworzeniu nowych narzędzi diagnostycznych do diagnostyki innych chorób. Niemniej jednak, aby w pełni poznać potencjał diagnostyczny uzyskanych antygenów chimerycznych należy przeprowadzić dodatkowe badania, w których oceniona zostałyby ich użyteczność do wykrywania przeciwciał klasy IgM oraz indeksu awidności przeciwciał klasy IgG, co może potwierdzić, iż są one również potencjalnymi narzędziami do różnicowania faz toksoplazmozy.

6.3. *Użyteczność antygenów chimerycznych w serodiagnostyce toksoplazmozy u zwierząt*

Zarażenie *T. gondii* jest szeroko rozpowszechnione zarówno wśród dziko żyjących, jak i domowych zwierząt. Wyniki przeprowadzonych do tej pory badań świadczą, iż zarażenie pasożytem stanowi szczególnie istotny problem także wśród zwierząt hodowlanych i wiąże się z poważnymi stratami reprodukcyjnymi oraz ekonomicznymi. Ponadto należy pamiętać, iż do transmisji pasożyta do człowieka dochodzi najczęściej poprzez spożywanie surowego lub niedogotowanego mięsa, niepasteryzowanych przetworów mlecznych, jak również wody, owoców czy warzyw zanieczyszczonych oocystami. Szacuje się, iż u kobiet ciężarnych od 30-63% zarażeń *T. gondii* wywołanych jest właśnie poprzez spożywanie nieodpowiednio przygotowanego mięsa [Cook i wsp., 2000]. O ile za czystość warzyw i owoców, które mogą być potencjalnie zanieczyszczone oocystami każdy konsument odpowiada samodzielnie i powinien pamiętać o ich dokładnym myciu. Tak w przypadku mięsa, które może zawierać cysty tkankowe pasożyta, konsument nie zawsze ma świadomość ryzyka zarażenia. Co prawda odpowiednia obróbka termiczna, peklowanie, jak i wcześniejsze mrożenie mięsa powoduje dezaktywację cyst, jednakże w kulturze wielu krajów w tradycje kulinarne wpisane są potrawy sporządzane ze świeżego, surowego mięsa. Z drugiej strony można przypuszczać, że większość konsumentów nie mając świadomości ryzyka zarażenia często spożywa niedogotowane mięso, co znajduje niejako potwierdzenie w badaniach, w których brano pod uwagę częstość występowania zarażenia pasożytem u osób spożywających mięso w porównaniu do wegetarian [Cook i wsp., 2000; Hall i wsp., 1999]. Wobec braku szczepionki, którą można by stosować

uniwersalnie u wszystkich zwierząt, a nawet ludzi, cały czas poszukuje się narzędzi diagnostycznych, które pozwoliłyby na szybkie i tanie badanie dużej liczby prób materiału biologicznego od zwierząt hodowlanych. Niektórzy badacze sugerują, konieczność badania najczęściej spożywanego przez konsumentów mięsa, które trafia na przysłowiową sklepową półkę. Kijlstra i Jongert proponują, aby po przebadaniu sprzedawać mięso oznaczone jako wolne od *T. gondii*, a mięso, w którym wykryto pasożyta, poddać wstępnej obróbce termicznej lub mrożeniu i następnie sprzedawać jako mięso bezpieczne od *T. gondii* [Kijlstra i Jongert, 2008, 2009]. Innym rozwiązaniem, może być zamieszczanie informacji z jakiego typu hodowli pochodzi mięso, czy hodowla jest prowadzona zgodnie z przyjętymi standardami i podlega ścisłej kontroli weterynaryjnej, w ramach, której przynajmniej reprezentacyjna grupa zwierząt została przebadana [Cook i wsp., 2000].

6.3.1. Przydatność antygenów chimerycznych w serodiagnostyce toksoplazmozy u kotów

We wcześniejszych latach zaledwie w kilku pracach wykazano użyteczność antygenów rekombinantowych w serodiagnostyce toksoplazmozy u kotów. Czułość testów IgG ELISA opartych na rekombinantowych antygenach chimerycznych przedstawionych w niniejszej pracy wynosiła od 50% do 93,3% (Tab. 15). Najwyższą reaktywnością na poziomie 93,3% charakteryzowały się antygeny MIC1-MAG1-SAG1_M, SAG1_D-MIC1-MAG1 oraz SAG2-GRA1-ROP1_D. Uzyskane wyniki po części potwierdzają wcześniejsze badania, w których oszacowano potencjalną przydatność diagnostyczną antygenów SAG1 i SAG2 w testach IgG ELISA. W 2001, Kimbita i wsp. wykazali, iż antygen SAG1 charakteryzuje się 100% reaktywnością wobec przeciwciał antytoksoplazmowych zawartych w surowicach kocich, co zostało potwierdzone w teście Western blotting oraz komercyjnym teście LAT. Podobne rezultaty uzyskano również w kolejnych badaniach, w których w teście IgG ELISA opartym na antygenie SAG1 zidentyfikowano 40 surowic seropozytywnych spośród puli 192 surowic, w porównaniu do 39 surowic, które dały wynik pozytywny w komercyjnym teście LAT [Huang i wsp., 2002a]. Wysoki potencjał diagnostyczny antygeny SAG1 wykazano również w szybkim teście immunodiagnostycznym RDT (ang. rapid diagnostic test), który charakteryzował się 100% czułością (specyficzność 99,2%), wobec komercyjnego testu IgG ELISA o czułości 91,2% (specyficzność 98,7%) [Chong i wsp., 2011]. Analizując wyniki uzyskane dla antygenów chimerycznych MIC1-MAG1-SAG1_M i SAG1_D-MIC1-MAG1 oraz mieszanki rMIC1+rMAG1+rSAG1, można zauważyć, iż zarówno średnie wartości absorbancji, jak i zakresy absorbancji uzyskane dla surowic dodatnich są zbliżone, co świadczyć może o fakcie, że o ile w przypadku wszystkich preparatów białkowych swoiste przeciwciała rozpoznają determinanty antygenowe białek MIC1 oraz MAG1, o tyle wielkość fragmentu immunodominującego antygeny

SAG1 nie wpływa znacząco na reaktywność. Z drugiej strony, krótszy fragment immunodominujący białka SAG1 (reszty aminokwasowe od 49-198), znajdujący się na C-końcu antygeny chimerycznego podobnie jak w przypadku badań z wykorzystaniem surowic ludzkich może być lepiej eksponowany swoistym przeciwciałom antytoksoplazmowym i mimo, że posiada mniej potencjalnych determinant antygenowych jego reaktywność jest zbliżona do antygeny chimerycznego SAG1_D-MIC1-MAG1, który posiada na N-końcu większy fragment antygeny SAG1 (reszty aminokwasowe od 49-311). Wcześniejsze prace przedstawiają również potencjał diagnostyczny antygeny SAG2, który co prawda był rozpoznawany przez swoiste przeciwciała antytoksoplazmowe, ale wobec rezultatów uzyskanych w testach komercyjnych, testy serologiczne oparte na białku SAG2 nie charakteryzowały się tak dobrą specyficnością, jak te wykorzystujące antygen SAG1. W testach IgG ELISA oraz teście immunochromatograficznym opartym na bakteryjnym antygenie SAG2, za każdym razem identyfikowano o kilka surowic seropozytywnych więcej, niż w przypadku komercyjnego testu LAT [Huang 2002a, 2002b, 2004]. Największą rozbieżność wyników w stosunku do testu komercyjnego LAT (18,7% surowic seropozytywnych), uzyskano kiedy do testu IgG ELISA wykorzystano antygen SAG2 uzyskany w bakulowirusowym systemie ekspresyjnym, w którym zidentyfikowano, aż 28,3% surowic seropozytywnych [Huang i wsp., 2002b]. W niniejszej pracy uzyskano dwa antygeny chimeryczne SAG2-GRA1-ROP1_M i SAG2-GRA1-ROP1_D, które zawierały fragment antygeny powierzchniowego SAG2. Czulość testów IgG ELISA opartych na tych preparatach białkowych nie wskazuje jednak na duży potencjał diagnostyczny samego białka SAG2. Uzyskane rezultaty pokazują, iż kluczową rolę w reaktywności tych antygenów chimerycznych odgrywa wielkość fragmentu immunodominującego białka roptrii ROP1. Podobnie jak w przypadku badań z wykorzystaniem surowic ludzkich, okazuje się, iż bardziej reaktywny jest antygen chimeryczny SAG2-GRA1-ROP1_D zawierający fragment immunodominujący białka ROP1 odpowiadający prawie całemu antygenowi (reszty aminokwasowe od 85-396), a więc posiadający C-końcowy region białka bogaty w reszty argininy, który oprócz tego, iż prawdopodobnie odpowiada za stabilizowanie całego białka ROP1, zawiera w swojej sekwencji silne determinanty antygenowe rozpoznawane przez swoiste przeciwciała antytoksoplazmowe. Świadczy o tym przede wszystkim reaktywność antygeny SAG2-GRA1-ROP1_D na poziomie 93,3%, w porównaniu do 50% reaktywności białka SAG2-GRA1-ROP1_M, zawierającego krótszy fragment antygeny ROP1 (reszty aminokwasowe od 85-250). Uzyskane w niniejszej pracy wyniki wykazują potencjalną użyteczność diagnostyczną antygenów chimerycznych w serodiagnostyce toksoplazmozy u kotów, jednak do tej pory w dwóch niezależnych badaniach największą reaktywnością w teście IgG ELISA na poziomie 95% i 100%

charakteryzowała się mieszanka antygenów rekombinantowych H4+H11 [Tenter i wsp., 1992, 1994] oraz wspomniany wcześniej antygen SAG1 [Kimbata i wsp., 2001].

Podsumowując, należy zaznaczyć, iż wykrycie zarażenia pasożytem może nie odgrywać większego znaczenia w samym zapobieganiu rozprzestrzeniania oocyst wydalanych przez koty do środowiska. Co prawda pierwotne zarażenie *T. gondii* u kotów nie powoduje immunosupresji [Davis i Dubey, 1995; Lappin i wsp., 1992], jednakże, stwierdzono, iż u kotów wydzielających oocysty występuje tzw. silna odporność jelitowa, w której istotnej roli nie odgrywają przeciwciała, a najprawdopodobniej komórki nabłonka błony śluzowej jelita [Dubey, 1995]. Ponadto, przeciwciała IgG, IgM i IgA pojawiają się w surowicy kotów dopiero w czasie, kiedy wydzielane są przez nie oocysty [Lappin i wsp., 1989]. Z tego punktu widzenia diagnostyka toksoplazmozy u kotów może mieć znaczenie w przypadku selekcji kotów, które można poddać szczepieniu. Szczególnie w świetle badań, w których wykazano, iż doustne szczepienie zdrowych kotów bradyzoitami zmutowanego szczepu T-263 *T. gondii*, prowadziło do jelitowego zarażenia pasożytem, ale nie wywoływało produkcji oocyst [Frankel i wsp., 1991, Freyre i wsp., 1993]. Ponadto, w jednym z długoletnich badań wykazano, iż kilka lat po szczepieniu kotów na farmach hodowlanych, nie stwierdzono zarażenia pasożytem u złapanych dzikich myszy, jak również odnotowano znaczny spadek odsetka seropozytywnych świń na tych farmach [Mateus-Pinilla i wsp., 1999]. Z drugiej strony szczepienie kotów zmutowanym szczepem T-263 *T. gondii* oprócz wywoływania odporności, wiązało się z bardzo małym ryzykiem tworzenia cyst, co w porównaniu do naturalnego zarażenia było bardzo korzystne [Choromański i wsp., 1994, 1995]. Mimo, iż u kotów pierwotne zarażenie najczęściej przebiega bezobjawowo, w dłuższej perspektywie czasu wiąże się często z niekorzystnymi dla zwierząt zmianami w obrębie jamy brzusznej oraz płuc. W badaniach histopatologicznych obrębu jamy brzusznej u kotów ze stwierdzoną toksoplazmozą wykryto między innymi ogniska martwiczego zapalenia wątroby, jak również przekrwienie oraz obrzęk wielu innych narządów wewnętrznych [Dubey i Carpenter, 1993].

6.3.2. Przydatność antygenów chimerycznych w serodiagnostyce toksoplazmozy u koni

Do tej pory w żadnej pracy nie pokazano zastosowania antygenów rekombinantowych do serodiagnostyki toksoplazmozy u koni. Ponadto, w porównaniu do innych zwierząt hodowlanych niewiele jest również prac, w których określano częstość występowania zarażenia *T. gondii* u koni. Z jednej strony wynika to zapewne z faktu, iż spożycie koniny jest mało rozpowszechnione, wyjątek stanowią kraje takie jak Belgia, Włochy, Francja czy Japonia [Gill, 2005]. Z drugiej strony wydawało się, iż zarażenie pasożytem wśród koni nie stanowi poważnego problemu epidemiologicznego.

Jednakże w 2007 roku, Tassi stwierdził, iż rozpowszechnienie *T. gondii* w krajach samej Unii Europejskiej wynosi średnio 25,8% i w zależności od kraju waha się od 0-80%. W związku z powyższym spożycie koniny w krajach, w których jest ona wpisana w tradycje kulinarne może stanowić potencjalną drogę transmisji pasożyta do człowieka. W niniejszej pracy w teście IgG ELISA oceniono przydatność diagnostyczną rekombinantowych antygenów chimerycznych, która wynosiła od 50-100% (Tab. 16). Największą czułością na poziomie 100% charakteryzował się test IgG ELISA oparty na antygenie chimerycznym SAG2-GRA1-ROP1_D, podobnie jak w przypadku badań z wykorzystaniem surowic kocich najmniejszą reaktywnością charakteryzował się antygen SAG2-GRA1-ROP1_M (50%) (Rys. 26). Pozostałe antygeny chimeryczne MIC1-MAG1-SAG1_M, SAG1_D-MIC1-MAG1 i GRA1-GRA2-GRA6 wykazywały reaktywność od 75-86,1%, jednakże w przypadku tych preparatów białkowych oraz mieszanek antygenów rMIC1+rMAG1+rSAG1 oraz rGRA1+rGRA2+rGRA6 wyznaczono wysokie współczynniki odcięcia (0,793-1,021), co sugeruje, iż białka te mogą nie mieć potencjalnej użyteczności diagnostycznej. Możliwe, iż tak wysokie współczynniki odcięcia są konsekwencją reakcji krzyżowych, które mogą wynikać z faktu, iż konie są zdecydowanie bardziej podatne na zarażenie innymi pasożytami z typu Apicomplexa, takimi jak *Neospora caninum* oraz *Neospora hughesi* [Ciaramella i wsp., 2004; Pitel i wsp., 2003]. Pasożyty z typu Apicomplexa są bardzo zbliżone antygenowo, więc jest bardzo prawdopodobne, iż swoiste przeciwciała anti-*Neospora* sp. rozpoznają rekombinantowe antygeny chimeryczne złożone z białek *T. gondii*.

Podsumowując, antygen chimeryczny SAG2-GRA1-ROP1_D może stanowić potencjalną alternatywę w stosunku do poliwalentnego antygeny natywnego TLA wykorzystywanego w komercyjnych testach LAT, MAT oraz IFAT do serodiagnostyki toksoplazmozy u koni. Jednak, aby w pełni ocenić potencjał diagnostyczny zarówno antygeny SAG2-GRA1-ROP1_D oraz pozostałych antygenów chimerycznych uzyskanych w niniejszej pracy konieczne jest przeprowadzenie badań na większej puli surowic, jak również wykluczenie reakcji krzyżowych w szczególności tych, które mogą powodować *Neospora caninum* oraz *Neospora hughesi*.

6.3.3. Przydatność antygenów chimerycznych w serodiagnostyce toksoplazmozy u owiec

Zarażenie *T. gondii* stanowi bardzo poważny problem w hodowli owiec, powodujący przede wszystkim znaczne ograniczenie zdolności reprodukcyjnych tych zwierząt. Szacuje się, iż w samej Europie średnia częstość występowania toksoplazmozy u owiec wynosi 35,9% i w poszczególnych krajach waha się od 4-92% [EFSA, 2007; Tenter i wsp., 2000]. Tak wysoka podatność owiec na zarażenie pasożytem uwarunkowana jest w dużej mierze faktem, iż hodowane są one głównie na pastwiskach, gdzie wraz z pokarmem i wodą mogą spożyć oocysty.

Z przeprowadzonych badań wynika, iż zarażenie pasożytem jest odpowiedzialne za 25% z wszystkich przypadków ronień stwierdzonych u owiec i w skrajnych przypadkach może prowadzić do niezdolności tych zwierząt do dalszej reprodukcji [Buxton, 1998; Pereira-Bueno i wsp., 2004]. O ile do pierwotnego zarażenia nie doszło w okresie ciąży stwierdza się, iż w większości przypadków owce pozostają odporne na ponowne zarażenie i tym samym ryzyko zarażenia płodów w kolejnych ciążach jest znikome. Jednak, w przypadku kiedy do pierwotnego zarażenia dochodzi w okresie ciąży prawdopodobieństwo przejścia tachyzoitów przez łożysko do płodu jest większe niż 80% i w zależności od momentu zarażenia może prowadzić do resorpcji, ronienia, porodu martwych jagniąt lub porodu jagniąt z licznymi wadami rozwojowymi [Buxton, 1998]. Przypuszcza się, iż cysty *T. gondii* można znaleźć nawet w 30% baraniny, która trafiła do sprzedaży, co powoduje, iż mięso owiec może stanowić potencjalne źródło transmisji pasożyta do człowieka [Hill i Dubey, 2013]. W związku z powyższym diagnostyka toksoplazmozy u owiec wydaje się kluczowa nie tylko ze względu na możliwość wyeliminowania potencjalnego źródła transmisji pasożyta, ale także przy selekcji zdrowych zwierząt, które można zaszczepić dopuszczoną w niektórych krajach szczepionką Ovilis™ Toxovax.

W niniejszej pracy wykazano wysoką potencjalną użyteczność rekombinantowych antygenów chimerycznych do serodiagnostyki toksoplazmozy u owiec, o czym świadczy wysoka czułość testów IgG ELISA na poziomie od 95,7-100%. Trzy z antygenów chimerycznych SAG1_D-MIC1-MAG1, SAG2-GRA1-ROP1_M oraz SAG2-GRA1-ROP1_D charakteryzowały się 100% reaktywnością (Tab. 17 i Rys. 27). Uzyskane wyniki potwierdzają, iż kluczową rolę w reaktywności antygenów chimerycznych odgrywa wielkość fragmentów immunodominujących poszczególnych białek *T. gondii*. Zarówno dla antygeny chimerycznego SAG1_D-MIC1-MAG1 i SAG2-GRA1-ROP1_D, które zawierały większe fragmenty immunodominujące białek pasożyta (odpowiednio SAG1 i ROP1) odnotowano zdecydowanie większe wartości średniej absorbancji, jak i zakresy absorbancji w porównaniu do antygenów chimerycznych MIC1-MAG1-SAG1_M i SAG2-GRA1-ROP1_M. O ile w przypadku testów IgG ELISA opartych na antygenach chimerycznych MIC1-MAG1-SAG1_M i SAG1_D-MIC1-MAG1 z wykorzystaniem surowic kocih i końskich nie obserwowano znaczącej różnicy w wartości odczytywanej absorbancji dla poszczególnych prób surowic, w przypadku owiec wielkość fragmentu immunodominującego białka SAG1 determinuje jego reaktywność. Średnia wartość absorbancji na poziomie 1,650 dla antygeny SAG1_D-MIC1-MAG1 jest ponad dwukrotnie wyższa w porównaniu do preapratu MIC1-MAG1-SAG1_M (0,658). Na tej podstawie można sądzić, iż antygen powierzchniowy SAG1 pełni istotną rolę w procesie inwazji pasożyta do komórek żywiciela u owiec, a C-końcowy fragment białka SAG1 zawiera ważne determinanty antygenowe odpowiedzialne za modulację silnej odpowiedzi immunologicznej, co skutkuje

produkcją dużej ilości przeciwciał antytoksoplazmowych skierowanych przeciw temu białku. Pierwsze badania dotyczące możliwości zastosowania antygenów rekombinantowych w serodiagnostyce toksoplazmozy u owiec dotyczyły białek H4 i H11, które charakteryzowały się wysoką reaktywnością w testach z wykorzystaniem surowic kocih, jednakże w przypadku owiec czułość testów IgG ELISA opartych na tych preparatach białkowych była już zdecydowanie niższa i wynosiła odpowiednio 79% i 43% oraz 79% dla mieszanki H4+H11 [Tener i wsp., 1992]. Bezżyteczność antygeny H11 potwierdzono również kilka lat później, kiedy oszacowano jego reaktywność zaledwie na poziomie 34%, dodatkowo stwierdzono, iż specyficzność testu IgG ELISA opartego na tym antygenie wynosi 89% [Sager i wsp., 2003]. Problem z oceną potencjalnej przydatności diagnostycznej pojawił się również w badaniach, w których w teście IgG ELISA zastosowano rekombinantowy antygen MAG1. Badając pulę 175 surowic owczych 29 zidentyfikowano jako seropozytywne w komercyjnym teście LAT, spośród tych surowic 27 dało również pozytywny wynik w teście rMAG1-ELISA, jednakże w teście tym stwierdzono, iż w 15 innych surowicach również znajdują się przeciwciała antytoksoplazmowe [Tumurjav i wsp., 2010]. Najbardziej obiecujące wyniki dotyczące potencjalnego zastosowania antygenów rekombinantowych do serodiagnostyki toksoplazmozy u owiec uzyskał zespół Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej, który na podstawie wstępnej analizy immunoreaktywności spośród 19 antygenów rekombinantowych wyselekcjonował 8 białek (GRA1, GRA9, SAG1, SAG2, SAG4, MIC1ex2, MIC3 i ROP1), które następnie przebadano pod kątem użyteczności diagnostycznej na dużej puli surowic [Holec-Gąsior i wsp., 2014]. Antygeny charakteryzujące się największą reaktywnością (GRA1, SAG2 i ROP1) w kolejnym etapie badań wykorzystano do przygotowania mieszanek złożonych z dwóch oraz wszystkich trzech białek rekombinantowych. Na podstawie uzyskanych rezultatów stwierdzono, iż największy potencjał diagnostyczny ma mieszanka rGRA1+rSAG2+rROP1, co znalazło również potwierdzenie w niniejszej pracy, niezależnie od wielkości fragmentu immunodominującego białka ROP1, zarówno oba antygeny chimeryczne SAG2-GRA1-ROP1_M i SAG2-GRA1-ROP1_D oraz mieszanka rGRA1+rSAG2+rROP1 reagowały na poziomie 100%.

6.3.4. Przydatność antygenów chimerycznych w serodiagnostyce toksoplazmozy u świń

Podobnie jak w przypadku owiec, zarażenie *T. gondii* jest jednym z najczęściej występujących u świń, szacuje się, iż w krajach Unii Europejskiej wynosi średnio 6% i waha się od 0-64% w poszczególnych krajach [EFSA, 2007; Tenter i wsp., 2000]. O ile obraz kliniczny pierwotnego zarażenia u świń jest zbliżony do tego występującego u owiec, to jednak znacznie rzadziej dochodzi do ronień u ciężarnych macior, co

związane jest najprawdopodobniej ze zdecydowanie mniejszym ryzykiem przejścia pasożyta przez łożysko do płodu [Dubey, 2009a]. Do zarażenia pasożytem dochodzi najczęściej u młodych świń, analogicznie jak u owiec poprzez spożycie zanieczyszczonego pokarmu i wody. Częstość występowania zarażenia zależy w przypadku świń przede wszystkim od typu hodowli, z przeprowadzonych badań wynika, iż bardzo wysoki odsetek seropozytywnych świń (do 100%) odnotowuje się w gospodarstwach, gdzie zwierzęta hoduje się na tzw. wolnym zewnętrznym wybiegu. Podczas gdy na tzw. farmach zamkniętych, gdzie przestzegane są rygorystyczne warunki sanitarne dotyczące zarówno warunków bytowania zwierząt jak i jakości pasz i wody podawanych zwierzętom wyeliminowano ryzyko zarażenia [Kijlstra i wsp., 2004; Tenter i wsp., 2000]. Mimo, wszystko spożycie wieprzowiny, która jest najczęściej konsumowanym mięsem stanowi prawdopodobnie główną przyczynę transmisji pasożyta do człowieka. O ile hodowla zamknięta zwierząt pozwala zminimalizować, a czasami nawet całkowicie wyeliminować ryzyko zarażenia pasożytem, może to już nie potrwać długo, szczególnie w świetle rozporządzeń Unii Europejskiej, z których wynika, iż powinno się prowadzić bardziej przyjazne hodowle zwierząt i zrezygnować z tzw. zamkniętych farm, gdzie zwierzęta są całkowicie odizolowane od świata zewnętrznego. Na problem ten zwrócili niedawno uwagę Dubey i wsp., którzy po raz pierwszy od kilku lat odnotowali w Stanach Zjednoczonych wysoki odsetek seropozytywnych świń właśnie w tzw. „organicznych” gospodarstwach [Dubey i wsp., 2012]. W związku z powyższym diagnostyka toksoplazmozy u świń nadal będzie bardzo istotna z punktu ograniczenia ryzyka transmisji pasożyta drogą pokarmową do człowieka, a co za tym idzie drogą wertykalną do płodu u ciężarnych kobiet.

W niniejszej pracy wykazano potencjalną dużą użyteczność trzech antygenów chimerycznych SAG1_D-MIC1-MAG1, SAG2-GRA1-ROP1_D i GRA1-GRA2-GRA6 do diagnostyki toksoplazmozy u świń. Czulość testów IgG ELISA opartych na tych antygenach wynosiła od 90,1-96,3% (Tab. 18 i Rys. 28). Uzyskane rezultaty potwierdziły, iż wielkość fragmentów immunodominujących poszczególnych białek determinuje reaktywność antygenów, o czym świadczy przede wszystkim czulość testów opartych na antygenach chimerycznych SAG1_D-MIC1-MAG1 (90,1%) i SAG2-GRA1-ROP1_D (93,8%) w porównaniu odpowiednio do czulości testów z wykorzystaniem MIC1-MAG1-SAG1_M (45,7%) i SAG2-GRA1-ROP1_M (28,4%). Na podstawie tych wyników, można przypuszczać, iż białka pasożyta ROP1 oraz SAG1 pełnią ważną rolę w procesie inwazji pasożyta u świń i odpowiadają za modulację silnej odpowiedzi immunologicznej. Immunogenność antygeny powierzchniowego SAG1 znajduje potwierdzenie we wcześniejszych badaniach dotyczących możliwości zastosowania antygenów rekombinantowych B427 (MAG1), C55 (GRA2), V22 (SAG2), MBP30 (SAG1) oraz C51 do wykrywania swoistych przeciwciał

antytoksoplazmowych u świń [Gamble i wsp., 2000]. Na podstawie uzyskanych rezultatów stwierdzono, iż w niedługim czasie od momentu zarażenia najlepiej rozpoznawane przez przeciwciała anti-*T. gondii* były antygeny C51, V22 (SAG2) i MBP30 (SAG1), jednakże po około roku od zarażenia rozpoznawane były już tylko antygeny C51 i MBP30 (SAG1). Wysoki potencjał diagnostyczny antygeny SAG1 potwierdzono również w kolejnych badaniach, które dotyczyły zastosowania antygeny MIC3 w teście LAT, w których uzyskane rezultaty odnoszono do tych uzyskanych w teście SAG1-ELISA [Jiang i wsp., 2008]. Oba antygeny MIC3 i SAG1 charakteryzowały się wysokim potencjałem diagnostycznym, o czym świadczy przede wszystkim pozytywny współczynnik zgodności pomiędzy testami na poziomie 96% w przypadku kiedy do testów wykorzystano surowice od eksperymentalnie zarażonych świń oraz 91,4% w przypadku niezdefiniowanej puli surowic świńskich. W swoich wcześniejszych badaniach zespół Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej również wykazał, iż stosując do testów pojedyncze antygeny rekombinantowe (MAG1, SAG1 i GRA7), najlepiej jest stosować antygen SAG1, który charakteryzował się 85,3% reaktywnością [Holec-Gąsior i wsp., 2010]. Niemniej jednak, przeprowadzone badania wykazały, iż najkorzystniej do diagnostyki toksoplazmozy u świń jest stosować mieszankę białek rMAG1+rSAG1+rGRA7, co pozwoliło na opracowanie testu IgG ELISA o czułości 97,3%. Antygen chimeryczny SAG2-GRA1-ROP1_D zawierający fragment immunodominujący białka ROP1 odpowiadający prawie całemu antygenowi (reszty aminokwasowe od 85-396), posiada jak opisano wcześniej w C-końcowym regionie białka prawdopodobnie silne determinanty antygenowe rozpoznawane przez swoiste przeciwciała antytoksoplazmowe, co w znaczący sposób wpływa na reaktywność. Wielkość fragmentu immunodominującego białka ROP1 wchodzącego w skład antygeny chimerycznego limituje więc zdolność do oddziaływania z przeciwciałami anti-*T. gondii*, co potwierdzają również wyniki uzyskane w testach IgG ELISA z wykorzystaniem surowic kocich i końskich. Dodatkowo można przypuszczać, iż u tych grup zwierząt w surowicach występuje stosunkowo niskie miano swoistych przeciwciał skierowanych przeciw antygenom SAG2 i GRA1. Potwierdzeniem takiego stanu rzeczy mogą być wspomniane wcześniej badania, w których wykazano, iż antygen V22 (SAG2) jest stosunkowo dobrze rozpoznawany przez przeciwciała tylko w stosunkowo niedługim czasie od momentu zarażenia świń pasożytem [Gamble i wsp., 2000]. Niski potencjał diagnostyczny antygeny SAG2 w testach IgG i IgM ELISA wykazano również w ostatnich badaniach dotyczących potencjalnego zastosowania antygenów rekombinantowych do serodiagnostyki toksoplazmozy u świń [Terkawi i wsp., 2013]. Z przeprowadzonych doświadczeń wynikało, iż spośród antygenów SAG2, GRA7 i GRA14 w testach IgG i IgM ELISA najlepiej jest stosować antygen GRA7, który może zostać również zastosowany do opracowania szybkiego

diagnostycznego testu immunochromatograficznego ICT (ang. ImmunoChromatographic Test).

6.3.5. Podsumowanie

Rozpowszechnienie toksoplazmozy wśród zwierząt stanowi istotny problem diagnostyczny, szczególnie z punktu widzenia badań przeprowadzonych w ostatnich latach, które dotyczyły wykrywania zarażenia pasożytem u coraz większej liczby gatunków zwierząt, wliczając w to ssaki wodne. Z jednej strony zasadność badań epidemiologicznych u zwierząt wynika często ze względów czysto ekonomicznych, czego doskonałym przykładem są owce, u których zarażenie pasożytem związane jest z poważnymi stratami reprodukcyjnymi. Z drugiej strony monitorowanie sytuacji epidemiologicznej narzucają odpowiednie regulacje prawne, jak na przykład dyrektywa Unii Europejskiej nr 2003/99/EC, która nakłada na kraje członkowskie obowiązek wprowadzenia programów umożliwiających określenie częstości występowania chorób pasożytniczych szczególnie wśród zwierząt hodowlanych (owce, kozy, świnie) [EFSA, 2007; Kijlstra i Jongert, 2009]. Niestety w większości krajów nie idą za tym konkretne działania, które pozwoliłyby określić rzeczywistą wartość problemu. Dostępne dane nie odnoszą się najczęściej do faktycznej sytuacji epidemiologicznej konkretnych chorób pasożytniczych w całym kraju, a dotyczą najczęściej konkretnych regionów, na terenie których jakiś ośrodek wykonał badania ze względów czysto naukowych. Z punktu widzenia zdrowia publicznego, diagnostyka toksoplazmozy u zwierząt hodowlanych wydaje się kluczowa w możliwości wyeliminowania głównego źródła transmisji pasożyta do człowieka, jakim jest spożywanie mięsa zarażonych zwierząt.

W niniejszej pracy przedstawiono potencjalną użyteczność rekombinantowych antygenów chimerycznych do serodiagnostyki toksoplazmozy u różnych grup zwierząt. Największą przydatnością immunodiagnostyczną porównywalną z poliwalentnym antygenem natywnym TLA (100%) charakteryzuje się antygen chimeryczny SAG2- GRA1-ROP_{1D}, który wykazuje najwyższą reaktywność niezależnie od badanej grupy zwierząt (od 93,3% dla IgG ELISA z wykorzystaniem surowic kocich do 100% dla IgG ELISA z wykorzystaniem surowic końskich i owczych). Uzyskane rezultaty pokazują, iż przy konstrukcji antygenów chimerycznych o potencjalnej przydatności diagnostycznej należy zwrócić przede wszystkim uwagę na dobór białek pasożyta oraz wielkość fragmentów immunodominujących poszczególnych antygenów. Pojedyncze antygeny dobrze rozpoznawne przez swoiste przeciwciała antytoksoplazmowe u jednej grupy zwierząt, mogą być kompletnie bezużyteczne do diagnostyki toksoplazmozy u innej grupy. Podobną prawidłowość można zaobserwować dla antygenów chimerycznych, co doskonale obrazuje przykład antygenów chimerycznych złożonych z fragmentów immunodominujących białek SAG2, GRA1 i ROP1. W przypadku zastosowania do testów IgG ELISA surowic owczych, niezależnie od wielkości

fragmentu białka ROP1 wchodzącego w skład antygeny chimerycznego uzyskano bardzo wysoką reaktywność (100%), co sugeruje, iż w surowicach tych znajdowały się przeciwciała skierowane przeciw wszystkim trzem białkom pasożyta. Znajduje to potwierdzenie we wcześniejszej pracy zespołu Katedry Biotechnologii Molekularnej i Mikrobiologii Politechniki Gdańskiej, w której określono zdolność przeciwciał antytoksoplazmowych do oddziaływania z pojedynczymi antygenami rekombinantowymi SAG2 (98,9%), GRA1 (100%) i ROP1 (100%) [Holec-Gąsior i wsp., 2014]. Zupełnie inaczej sytuacja wyglądała kiedy do testów wykorzystano surowice kocie, końskie i świńskie, w których zaobserwowano, iż wielkość fragmentu immunodominującego białka ROP1 limituje zdolność antygenów chimerycznych do oddziaływania ze swoistymi przeciwciałami anti-*T. gondii*. O ile w przypadku zastosowania antygeny SAG2-GRA1-ROP1_D niezależnie od badanej grupy zwierząt odnotowano wysoką czułość testów IgG ELISA powyżej 93,3%, tak w przypadku testów opartych na antygenie SAG2-GRA1-ROP1_M reaktywność była zdecydowanie niższa i wynosiła zaledwie 28,4% dla surowic świńskich i 50% dla surowic kocih i końskich. Uzyskane rezultaty sugerują, iż w surowicach tych zwierząt przeważają przede wszystkim przeciwciała skierowane przeciw antygenowi roptrii ROP1, a miano swoistych przeciwciał anti-SAG2 i anti-GRA1 jest zdecydowanie niższe i nie pozwala na poprawne wykrycie zarażenia pasożytem. Analogiczną sytuację można zaobserwować dla antygenów chimerycznych złożonych z fragmentów immunodominujących białek MIC1, MAG1 i SAG1. Wy tłumaczeniem takiego stanu rzeczy może być fakt, iż poszczególne gatunki zwierząt wykształciły zróżnicowaną odporność na zarażenie pasożytem i tak na przykład człowiek i owce są zdecydowanie bardziej podatni na zarażenie pasożytem, niż konie czy bydło [Innes, 1997]. Na drodze ewolucji u poszczególnych przedstawicieli ssaków doszło do różnych zmian w genomach, co spowodowało u niektórych gatunków między innymi wyciszenie pewnych genów, a u innych ich usunięcie. Przykładem doskonale obrazującym ten fakt może być zmienna liczba genów *irg* (ang. immunity-related GTPase), kodujących białka z rodziny GTPaz związanych z odpornością wrodzoną przeciwko wewnątrzkomórkowym patogenom. Geny kodujące białka IRG występują u praktycznie wszystkich ssaków, w genomie myszy można znaleźć łącznie 21 genów kodujących białka z rodziny IRG, jednakże w genomie człowieka zostały one zredukowane do 2 genów, a mianowicie *irgm* oraz *irgc*, przy czym drugi z genów prawdopodobnie nie koduje białka związanego z odpornością [Bekpen i wsp., 2005; Bernstein-Hanley i wsp., 2006; Collazo i wsp., 2001; Howard, 2008; MacMicking i wsp., 2003; MacMicking, 2005; Taylor i wsp., 2000; Taylor, 2007; Zhao i wsp., 2009]. Co więcej o zróżnicowanej odporności na zarażenie można mówić nawet na poziomie szczepów, które różnią się niekiedy pojedynczymi genami, co doskonale obrazuje model zwierzęcy wykorzystywany najczęściej do doświadczeń, a mianowicie różne szczepy

myszy laboratoryjnych [Araujo i wsp., 1976; McLeod i wsp., 1989; Suzuki i wsp., 1995; Williams i wsp., 1978]. Z wielu badań wynika, iż myszy wsojne szczepu BALB/c wykazują stosunkowo mniejszą wrażliwość na zarażenie pasożytem, szczep C3H/HeJ jest średnio wrażliwy, a szczep C57BL/6 wrażliwy na zarażenie. Oczywiście nie znaczy to, że u myszy BALB/c nie dojdzie do zarażenia pasożytem, wręcz przeciwnie jest to doskonały model zwierzęcy wykorzystywany do badań dotyczących ostrej fazy choroby. Wyżej wymienione szczepy myszy charakteryzują się przede wszystkim różną zdolnością do przeżycia w zależności od szczepu i formy rozwojowej pasożyta, którym zostały zarażone, co sugeruje również, iż w przypadku poszczególnych gatunków zwierząt będzie dochodziło do różnej odpowiedzi układu immunologicznego na skutek zarażenia danym szczepem *T. gondii*. Zjadliwość poszczególnych szczepów pasożyta może zatem determinować modulację odpowiedzi immunologicznej u różnych gatunków zwierząt, co więcej może to mieć również wpływ na miano swoistych przeciwciał skierowanych przeciw poszczególnym białkom pasożyta w surowicy. Ponadto, można przypuszczać, iż poszczególne gatunki zwierząt mogą być mniej lub bardziej podatne na zarażenie danym szczepem *T. gondii*.

Analizując wyniki uzyskane dla mieszanek w porównaniu do antygenów chimerycznych złożonych z większych fragmentów immunodominujących można zauważyć pewne prawidłowości wskazujące na wymienione wcześniej zalety stosowania antygenów chimerycznych do serodiagnostyki toksoplazmozy. Po pierwsze mieszanki antygenów na ogół charakteryzowały się znacznie niższą reaktywnością, co sugeruje, iż opłaszczenie płytki mieszaniną trzech białek rekombinantowych powoduje zawadę sferyczną pomiędzy białkami, na skutek której dochodzi do zasłonięcia ważnych determinant antygenowych, a tym samym utrudnia to możliwość ich rozpoznania przez swoiste przeciwciała antytoksoplazmowe. Drugą zaobserwowaną prawidłowością jest fakt, iż dla mieszanek wyznaczono wyższe wartości współczynników odcięcia. Należy pamiętać, iż w niniejszej pracy mieszanki powstały ze zmieszania trzech białek rekombinantowych, z których każde było oczyszczane osobno, a więc ilość pozostałych białek *E. coli*, która była mikroorganizmem producenckim, będzie w mieszankach wypadkową białek bakteryjnych obecnych w poszczególnych trzech preparatach, a nie tak jak w przypadku antygeny chimerycznego jednego. W związku z powyższym możliwe, iż przeciwciała anty-*E. coli*, które mogą być obecne w surowicach rozpoznały znajdujące się w śladowych ilościach białka bakteryjne, co spowodowało dodatkowe niespecyficzne oddziaływania. Uzyskane rezultaty potwierdzają zatem, iż zastosowanie antygenów chimerycznych może ułatwić standaryzację testów diagnostycznych dzięki temu, że stosuje się jeden ściśle zdefiniowany preparat.

Niniejsza praca przedstawia potencjalną użyteczność antygenów chimerycznych do serodiagnostyki toksoplazmozy u różnych grup zwierząt. Należy jednak pamiętać, iż

inne pasożyty z typu Apicomplexa są bardzo zbliżone antygenowo i do pełnej oceny potencjału diagnostycznego uzyskanych antygenów chimerycznych trzeba wykonać dodatkowe badania na surowicach pochodzących od zwierząt zarażonych tymi pasożytami, w szczególności dotyczy to gatunków *Neospora* spp. i *Sarcocystis* spp. Jak pokazują rezultaty uzyskane w niniejszej pracy problem reakcji krzyżowych może być szczególnie istotny u koni, które są zdecydowanie bardziej podatne na zarażenie *N. caninum* oraz *N. hughesi*, niż na zarażenie *T. gondii* [Ciaramella i wsp., 2004; Pitel i wsp., 2003].

6.4. Właściwości immunoprotekcyjne wybranych antygenów chimerycznych

Od wielu lat prowadzone są badania nad uzyskaniem uniwersalnej szczepionki, którą można stosować zarówno u ludzi jak i zwierząt. Otrzymanie skutecznej szczepionki dla ludzi pozwoli na zmniejszenie śmiertelności oraz pozwoli na redukcję innych niekorzystnych efektów, do których manifestacji dochodzi po zarażeniu pasożytem. Uzyskanie szczepionki będzie miało także korzyści ekonomiczne, bowiem pozwoli na zredukowanie nakładów finansowych na opiekę medyczną kobiet w ciąży, czy pacjentów z nieprawidłowo funkcjonującym układem odpornościowym, u których nawet przewlekła faza choroby może stanowić zagrożenie dla życia. Z kolei szczepionka o zastosowaniu weterynaryjnym oprócz korzyści ekonomicznych będzie się ściśle wiązała ze zdrowiem publicznym, poprzez zminimalizowanie ryzyka odzwierzęcego zarażenia pasożytem poprzez spożywanie surowego lub niedogotowanego mięsa. Dlatego też w ostatnim etapie niniejszej pracy oceniono właściwości immunoprotekcyjne antygenów chimerycznych SAG1_D-MIC1-MAG1 oraz SAG2-GRA1-ROP1_D na modelu mysiej toksoplazmozy.

Wymienione powyżej antygeny chimeryczne wybrano na podstawie wyników badań immunoserologicznych, w których oceniano ich potencjalną użyteczność diagnostyczną w wykrywaniu swoistych przeciwciał antytoksoplazmowych w próbach surowic ludzkich i zwierzęcych, a także bazując na rezultatach wcześniejszych prac, w których wykazano potencjalne właściwości immunoprotekcyjne białek pasożyta (Tab. 6). Uzyskane rezultaty świadczą o tym, iż oba antygeny chimeryczne SAG1_D-MIC1-MAG1 oraz SAG2-GRA1-ROP1_D zdolne są do stymulacji układu odpornościowego myszy do produkcji swoistych produktów odpowiedzi immunologicznej, które rozpoznają natywne antygeny *T. gondii*. Preparaty szczepionkowe różnią się jednak właściwościami immunoprotekcyjnymi, antygen SAG1_D-MIC1-MAG1 wywołuje tylko częściową ochronę przed przewlekłą toksoplazmozą, o czym świadczy redukcja liczby cyst o 44,8% ($p=0,008$). Potencjalne znaczenie szczepionkowe może mieć natomiast antygen SAG2-GRA1-ROP1_D, który pozwalał na redukcję liczby cyst w mózgowiu zarażonych myszy aż o 86,2% ($p<0,001$), w odniesieniu do grupy kontrolnej. Różnica w poziomie immunoprotekcji świadczy

o tym, iż zdecydowanie bardziej korzystnie jest immunizować myszy antygenami chimerycznymi złożonymi z dużych fragmentów immunodominujących, co ma również odzwierciedlenie we wcześniejszych wynikach wskazujących na użyteczność diagnostyczną tych antygenów chimerycznych. Niższą immunoprotekcję u myszy immunizowanych antygenem SAG1_D-MIC1-MAG1 można wytłumaczyć faktem, iż w niniejszym preparacie znajdowały się stosunkowo niewielkie fragmenty immunodominujące dwóch białek, a mianowicie N-końcowy region białka MIC1 (MIC1_{ex2}) oraz fragment antygeny macierzy cyst tkankowych MAG1 od reszty aminokwasowej 30 do 202, a tylko fragment antygeny SAG1 odpowiadał prawie całemu antygenowi pasożyta. O ile wybrane fragmenty białek MIC1 oraz MAG1 mają wysoki potencjał diagnostyczny, tak ich potencjalne właściwości immunoprotekcyjne mogą być stosunkowo niewielkie. Świadczyć o tym mogą wyniki badań, w których myszy szczepu Swiss-webster immunizowano rekombinantowym antygenem MAG1 odpowiadającym całemu białku pasożyta (reszty aminokwasowe od 26-452), co po zarażeniu cystami *T. gondii* szczepu ME49 pozwoliło na 65,1% redukcję liczby cyst pasożyta w mózgach [Parmley i wsp., 2012]. Wysoki 68,3% poziom immunoprotekcji uzyskano również u myszy szczepu C57BL/6 immunizowanych preparatem natywnych antygenów *TgMIC1+TgMIC4*, które również zarażono szczepem ME49 *T. gondii* [Lourenco i wsp., 2006]. Zróżnicowane wyniki w poziomie immunoprotekcji uzyskano dla natywnego antygeny SAG1 i różnych form rekombinantowych białka SAG1, co zależało od szczepu myszy użytego w badaniach, wielkości fragmentu białka rekombinantowego, zastosowanego adjuwantu, szczepu i formy rozwojowej pasożyta, drogi podania szczepionki oraz zarażenia (Tab. 6). Możliwe, iż na skutek immunizacji myszy antygenem SAG1_D-MIC1-MAG1, dochodzi głównie do produkcji swoistych przeciwciał skierowanych przeciw białku SAG1, a miano przeciwciał anti-MIC1 oraz anti-MAG1 stanowi tylko niewielki odsetek w całej puli przeciwciał zawartych w surowicach.

We wcześniejszych badaniach nad potencjalnymi właściwościami immunoprotekcyjnymi antygenów chimerycznych tylko w jednej pracy określano zdolność do redukcji liczby cyst w mózgowiu immunizowanych myszy, a więc pod kątem ochrony przed przewlekłą fazą choroby. W 2008 roku, Jongert i wsp. zastosowali do immunizacji myszy szczepu Swiss F1 rekombinantowy antygen chimeryczny rEC2 (złożony z fragmentów immunodominujących białek MIC2₁₅₇₋₂₃₅, MIC3₂₃₄₋₃₀₇, SAG1₁₈₂₋₃₁₂), odpowiednio w połączeniu z białkiem rGRA7 oraz z DNA plazmidu kodującego antygen GRA7. Po przeprowadzeniu dwóch niezależnych eksperymentów stwierdzono, iż po zarażeniu myszy cystami szczepu 76K pasożyta, zdecydowana redukcja liczby cyst w mózgach na poziomie od 60-79% występuje u myszy immunizowanych rEC2+rGRA7, w porównaniu do 24-28% redukcji u myszy immunizowanych rEC2+pGRA7. Pozostałe badania, w których wykorzystano antygeny chimeryczne

dotyczyły oceny potencjalnych właściwości ochronnych przed ostrą toksoplazmozą. W kilku wcześniejszych pracach wykazano, iż immunizacja myszy szczepu BALB/c antygenem SAG1/2 wpływa znacząco na ich zdolność do przeżycia po zarażeniu tachyzoitami *T. gondii* szczepu RH. Przeżywalność myszy wynosiła odpowiednio 73% po immunizacji bakteryjnym antygenem SAG1/2+Vet L-10 [Yang i wsp., 2004] oraz 77% po immunizacji drożdżowym antygenem SAG1/2+PBS [Lau i wsp., 2011]. Największe różnice w przeżywalności myszy po immunizacji bakteryjnym SAG1/2 wykazali w 2013 roku Chuang i wsp., wszystkie myszy immunizowane antygenem SAG1/2+PBS padły przed 14 dniem od momentu zarażenia, niską przeżywalność na poziomie 25% odnotowano dla myszy immunizowanych SAG1/2+Vet L-10, najwyższą 83% przeżywalność zaobserwowano dla myszy immunizowanych mikrokapsułkami PLG-SAG1/2. Kolejne opisane w literaturze antygeny chimeryczne pozwalały na wydłużenie czasu przeżywalności myszy o kilka dni w porównaniu do grupy kontrolnej, a były to drożdżowy antygen SAG1-GRA2 [Zhou i wsp., 2007] oraz multiepitopowy antygen zbudowany z epitopów SAG1₅₉₋₆₇, GRA1₁₇₆₋₁₈₆ oraz GRA4₂₃₁₋₂₄₅ [Wang i wsp., 2011]. Podobnie jak w przypadku diagnostyki toksoplazmozy również do badań szczepionkowych zastosowano mieszanki antygenów rekombinantowych, które charakteryzują się silnymi właściwościami immunoprotekcyjnymi i mogą w znaczący sposób zapobiegać powstawaniu cyst w mózгах. Jedną z pierwszych mieszanek charakteryzującą się 48,2% zdolnością do redukcji cyst w mózгах myszy szczepu CBA/J była mieszanka białek rekombinantowych rGRA2+rGRA6+MPL, jednakże przeprowadzone badania pokazały, iż korzystniej jest immunizować myszy samym antygenem rGRA2+MPL, co pozwalało na redukcję liczby cyst w mózгах, aż o 69,8% [Golkar i wsp., 2007]. Jeszcze wyższy poziom immunoprotekcji zademonstrowali w swojej pracy w 2008 roku, Gatkowska i wsp. Z przeprowadzonych przez nich badań wynikało, iż szczepiąc myszy szczepu C3H/HeJ mieszanką trzech rekombinantowych białek rSAG1+rGRA1+rMAG1 można zredukować liczbę cyst w mózгах o 89%. Najbardziej kompleksowe badania dotyczące możliwości zastosowania mieszanek białek rekombinantowych jako podjednostkowych szczepionek antytoksoplazmozowych zaprezentowane zostały w dwóch pracach z roku 2011 i 2012 opublikowanych przez Dziadek i wsp. Do swoich badań zespół wykorzystał trzy różne szczepy myszy C3H/HeJ, C57BL/6 oraz BALB/c, które immunizowano mieszankami złożonymi z trzech białek rROP2+rGRA4+rSAG1, rROP2+rROP4+rGRA4 oraz rROP2+rROP4+rSAG1. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, iż największy potencjał immunoprotekcyjny miała mieszanka rROP2+rROP4+rSAG1, która pozwalała na redukcję liczby cyst w mózгах o 71%, 90% i 77% w przypadku odpowiednio szczepu myszy C3H/HeJ, C57BL/6 oraz BALB/c. Mieszanka rROP2+rROP4+rGRA4 wykazywała niższą immunoprotekcję na poziomie 59% (C3H/HeJ), 41% (C57BL/6) i 84% (BALB/c). Najniższe właściwości

immunoprotekcyjne posiadała mieszanka rROP2+rGRA4+rSAG1, która w zależności od szczepu immunizowanych myszy pozwalała na redukcję liczby cyst od 16-55%.

Podsumowując należy podkreślić, iż wyniki uzyskane w niniejszej pracy są bardzo obiecujące i pozwalają sądzić, że w niedalekiej przyszłości uda się opracować szczepionkę antytoksoplazmozową. Przeprowadzone do tej pory badania pokazują, iż stosowanie do immunizacji mieszanek białek pasożyta oraz antygenów chimerycznych pozwala uzyskać wyższy poziom immunoprotekcji, aniżeli w przypadku stosowania pojedynczych białek. Wykazane dla antygeny SAG2-GRA1-ROP1_D właściwości immunoprotekcyjne są bardzo satysfakcjonujące, niemniej jednak, aby w pełni ocenić potencjał szczepionkowy tego antygeny konieczne jest przeprowadzenie dalszych badań. Można mieć nadzieję, iż konstruując antygen chimeryczny złożony z czterech fragmentów immunodominujących białek pasożyta uzyska się antygen, który w 100% będzie zapobiegał powstawaniu cyst w mózgu zarażonych myszy. Z drugiej strony, może wystarczy zmienić jeden fragment immunodominujący w antygenie chimerycznym SAG2-GRA1-ROP1_D na inny, na przykład zamiast fragmentu białka GRA1 wprowadzić fragment immunodominujący antygeny GRA2, który charakteryzuje się silnymi właściwościami immunoprotekcyjnymi.

7. PODSUMOWANIE I WNIOSKI KOŃCOWE

- Z wykorzystaniem metod inżynierii genetycznej skonstruowano osiem plazmidów rekombinantowych pUET1/MIC1-MAG1-SAG1_M, pUET1/MIC1-MAG1-SAG1_D, pET30/SAG1_M-MIC1-MAG1, pET30/SAG1_D-MIC1-MAG1, pET30/MAG1-MIC3-ROP1, pET30/SAG2-GRA1-ROP1_M, pET30/SAG2-GRA1-ROP1_D i pET30/GRA1-GRA2-GRA6 oraz w bakteryjnym systemie ekspresyjnym *E. coli* wyprodukowano siedem antygenów chimerycznych MIC1-MAG1-SAG1_M, SAG1_M-MIC1-MAG1, SAG1_D-MIC1-MAG1, MAG1-MIC3-ROP1, SAG2-GRA1-ROP1_M, SAG2-GRA1-ROP1_D i GRA1-GRA2-GRA6.
- Po raz pierwszy w testach IgG ELISA oszacowano przydatność rekombinantowych antygenów chimerycznych MIC1-MAG1-SAG1_M, SAG1_M-MIC1-MAG1, SAG1_D-MIC1-MAG1, MAG1-MIC3-ROP1, SAG2-GRA1-ROP1_M, SAG2-GRA1-ROP1_D i GRA1-GRA2-GRA6 do serodiagnostyki toksoplazmozy u ludzi. Uzyskane wyniki sugerują, iż antygeny te mogą stanowić potencjalną alternatywę dla wykorzystywanego w testach komercyjnych TLA.
- Po raz pierwszy w testach IgG ELISA oszacowano przydatność rekombinantowych antygenów chimerycznych MIC1-MAG1-SAG1_M, SAG1_D-MIC1-MAG1, SAG2-GRA1-ROP1_M, SAG2-GRA1-ROP1_D i GRA1-GRA2-GRA6 do serodiagnostyki toksoplazmozy u różnych grup zwierząt (koty, konie, owce i świny). Antygen chimeryczny SAG2-GRA1-ROP1_D charakteryzujący się największą reaktywnością niezależnie od badanej grupy zwierząt może zostać wykorzystany do opracowania uniwersalnego testu serologicznego do wykrywania zarażenia *T. gondii*.
- Po raz pierwszy na modelu mysiej toksoplazmozy oceniono właściwości immunoprotekcyjne antygenów chimerycznych SAG1_D-MIC1-MAG1 i SAG2-GRA1-ROP1_D. Antygen chimeryczny SAG2-GRA1-ROP1_D pozwolił na 86,2% redukcję liczby cyst w mózgowiu immunizowanych myszy wsobnych szczepu C3H/HeO_uJ.
- Uzyskane w niniejszej pracy wyniki dostarczają cennych informacji na temat sposobu konstruowania antygenów chimerycznych o potencjalnych właściwościach diagnostycznych oraz szczepionkowych.

8. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

AIDS	zespół nabytego niedoboru odporności (ang. Acquired Immunodeficiency Syndrome)
AMA	apikalny antygen błonowy (ang. Apical Membrane Antigen)
ang.	z angielskiego
APAAP	kompleks fosfatazy alkalicznej z anty-alkaliczną fosfatazą (ang. alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase complex)
BAG	antygen bradyzoitów (ang. bradyzoite antigen)
BMDCs	komórki dendrytyczne szpiku kostnego (ang. bone marrow-derived dendritic cells)
BSA	surowicza albumina wołowa (ang. bovine serum albumin)
Ca ²⁺	jony wapnia
CFA	kompletny adjuwant Freund'a (ang. complete Freund's adjuvant)
CT	toksyna cholery (ang. cholera toxin)
Da	dalton
DNA	kwas deoksyrybonuleinowy (ang. deoxyribonucleic acid)
DT	test barwny (ang. dye test)
EDTA	sól sodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego
EF	domena EF dłoni (ang. EF hand domain) złożona z α -helisy(E)-pętli- α -helisy(F)
EGF	domena wykazująca podobieństwo do naskórkowego czynnika wzrostu (ang. Epidermal Growth Factor-like domain)
ELFA	test immunofluorescencyjny (ang. Enzyme-Linked Fluorescent Assay)
ELISA	test immunoenzymatyczny (ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
ESA	antygeny sekrecyjno-wydzielnicze (ang. excreted-secreted antigens)
godz.	godzina
gr.	z greckiego
GPI	glikozylofosfatydyloinozytolo (ang. glycosylphosphatidylinositol)
GRA	antygeny granul o dużej gęstości (ang. dense granule antigens)
GST	transferaza S-glutationowa (ang. glutathione S-transferase)
GTPaza	guanozyno-5'-trifosfataza (ang. guanosine-5'-triphosphatase)
ICT	test immunochromatograficzny (ang. ImmunoChromatographic Test)
IFA	niekompletny adjuwant Freund'a (ang. incomplete Freund's adjuvant)
IgA	immunoglobulina klasy A
IgE	immunoglobulina klasy E
IgG	immunoglobulina klasy G
IgM	immunoglobulina klasy M
IL-12	interleukina 12 (ang. interleukin-12)
IRG	GTPazy związane z odpornością (ang. immunity-related GTPase)
ISAGA	test aglutynacji immunoabsorbcyjnej (ang. Immunosorbent Agglutination Assay)
ISCOMs	adjuwant immunostymulujący (ang. Immune stimulating complexes)
IU	jednostka międzynarodowa (ang. international unit)
IUP	wewnętrznie nieustrukturyzowane białka (ang. intrinsically unstructured proteins)
LAT	test aglutynacji lateksowej (ang. latex agglutination test)
LT	labilna enterotoksyna <i>E. coli</i> (ang. heat-labile enterotoxin from <i>E. coli</i>)
M	stężenie molowe [mol/dm ³]
MAG	antygen macierzy cyst tkankowych (ang. cyst matrix antigen)
M2AP	białko wiążące MIC2 (ang. MIC2-associated protein)

MAP	wielokrotne powtórzenia epitopu (ang. multiple antigenic peptide)
MAR	powtórzenia adhezyjne białek mikronem (ang. Micronem Adhesive Repeat)
MAT	zmodyfikowany test aglutynacyjny (ang. modified agglutination test)
MEP	peptyd multiepitopowy (ang. multiepitope peptide)
MIC	antygeny mikronem (ang. microneme antigen)
min	minuta
MJ	struktura ruchomego połączenia (ang. moving junction)
MNN	wewnętrzna sieć mikrotubul (ang. membranous nanotubular network)
MPL	monofosforylowy lipid A (ang. monophosphoryl lipid A)
MRC5	szczep 5 ludzkich fibroblastów płodowych uzyskany przez Medyczną Radę Naukową (ang. Medical Research Council cell strain 5)
MyoA	miozynowy kompleks motoryczny (ang. myosin A motor complex)
PAN	domena jabłka (ang. protein apple domain)
PAP	kompleks peroksydazy z anty-peroksydazą (ang. Peroxidase anti-Peroxidase complex)
PCR	łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. polymerase chain reaction)
PLG	kopolimer kwasu mlekowego i glikolowego (ang. Poly(Lactide-co-Glycolide))
PV	wakuola pasożytnicza (ang. parasitophorous vacuole)
PVM	membrana wakuoli pasożytniczej (ang. parasitophorous vacuole membrane)
RDT	szybki test diagnostyczny (ang. rapid diagnostic test)
ROM	proteazy romboidalne (ang. rhomboid-like proteases)
RON	białka szyjki roptrii (ang. rhotry neck protein)
ROP	antygeny roptrii (ang. rhoptry antigens)
RTG	badanie rentgenograficzne (ang. roentgenography)
s	sekunda
SAG	antygeny powierzchniowe (ang. surface antigens)
SRS	białka powiązane z sekwencją antygeny SAG1 (ang. SAG1-related sequence proteins)
THP	linia ludzkich komórek ostrej białaczki monocytarnej (ang. Human acute monocytic leukemia cell line)
TLA	poliwalentny antygen natywny (ang. <i>Toxoplasma</i> lysate antigen)
TM	domena transmembranowa (ang. transmembrane domain)
TSP1	sekwencje/domeny trombospondyno-podobne typu 1 (ang. thrombospondine-like sequence/domain type-1)
TSR1	domena powtórzeń domen TSP1 (ang. thrombospondin type-1 repeats)
USG	badanie ultrasonograficzne (ang. ultrasonography)

9. LITERATURA

- [1] Andrews C.D., Dubey J.P., Tenter A.M., Webert D.W. *Toxoplasma gondii* recombinant antigens H4 and H11: Use in ELISAs for detection of toxoplasmosis in swine. *Vet. Parasitol.* 1997. 70(1-3):1-11.
- [2] Araujo F.G., Williams D.M., Grumet F.C., Remington J.S., Strain-dependent differences in murine susceptibility to *Toxoplasma*. *Infect. Immun.* 1976. 13(5):1528-1530.
- [3] Ashburn D., Joss A.W.L., Pennington T.H., Ho-Yen D.O. Do IgA, IgE, and IgG avidity tests have any value in the diagnosis of *Toxoplasma* infection in pregnancy? *J. Clin. Pathol.* 1998. 51(4):312-315.
- [4] Aubert D., Maine G.T., Villena I., Hunt J.C., Howard L., Sheu M., Brojanac S., Chovan L.E., Nowlan S.F., Pinon J.M. Recombinant antigens to detect *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G and immunoglobulin M in human sera by enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 2000. 38(3):1144-1150.
- [5] Beghetto E., Spadoni A., Bruno L., Buffolano W., Gargano N. Chimeric antigens of *Toxoplasma gondii*: toward standardization of toxoplasmosis serodiagnosis using recombinant products. *J. Clin. Microbiol.* 2006. 44(6):2133-2140.
- [6] Beghetto E., Buffolano W., Spadoni A., Del Pezzo A., Di Cristina M., Minenkova O., Petersen E., Felici F., Gargano N. Use of an immunoglobulin G avidity assay based on recombinant antigens for diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *J. Clin. Microbiol.* 2003. 41(12):5414-5418.
- [7] Beghetto E., Pucci A., Minenkova O., Spadoni A., Bruno L., Buffolano W., Soldati D., Felici F., Gargano N. Identification of a human immunodominant B-cell epitope within the GRA1 antigen of *Toxoplasma gondii* by phage display of cDNA libraries. *Int. J. Parasitol.* 2001. 31(14):1659-1668.
- [8] Bekpen C., Hunn J.P., Rohde C., Parvanova I., Guethlein L., Dunn D.M., Glowalla E., Leptin M., Howard J.C. The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage. *Genome Biol.* 2005. 6(11):R92.
- [9] Bernstein-Hanley I., Coers J., Balsara Z.R., Taylor G.A., Starnbach M.N., Dietrich W.F. The p47 GTPases IGTP and IRGB10 map to the *Chlamydia trachomatis* susceptibility locus *Ctrq-3* and mediate cellular resistance in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. 103(38):14092-14097.
- [10] Bessieres M.H., Roques C., Berrebi A., Barre V., Cazaux M., Seguela J. P. IgA antibody response during acquired and congenital toxoplasmosis. *J. Clin. Pathol.* 1992. 45(7):605-608.
- [11] Bitkowska E., Walochowa M., Dziębski T.H. Wykrywanie swoistych przeciwciał toksoplazmowych klasy A: porównanie diagnostycznej przydatności zestawów dostępnych w handlu. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 1996. 48(3-4):197-200.
- [12] Bivas-Benita M., Laloup M., Verstehey S., Dewit J., De Braekeleer J., Jongert E., Borchard G. Generation of *Toxoplasma gondii* GRA1 protein and DNA vaccine loaded chitosan particles: preparation, characterization, and preliminary *in vivo* studies. *Int. J. Pharm.* 2003. 266(1-2):17-27.
- [13] Black M.W., Boothroyd J.C. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000. 64(3):607-623.
- [14] Blanchard N., Gonzales F., Schaeffer M., Joncker N.T., Cheng T., Shastri A.J., Robey E.A., Shastri N. Immunodominant, protective response to the parasite *Toxoplasma gondii* requires antigen processing in the endoplasmic reticulum. *Nat. Immunol.* 2008. 9(8):937-944.
- [15] Blumenschein T.M., Friedrich N., Childs R.A., Sauros S., Carpenter E.P., Campanero-Rhodes M.A., Simpson P., Chai W., Koutroukides T., Blackman M.J., Feizi T., Soldati-Favre D., Matthews S. Atomic resolution insight into host cell recognition by *Toxoplasma gondii*. *EMBO J.* 2007. 26(11):2808-2820.
- [16] Bonenfant C., Dimier-Poisson I., Velge-Roussel F., Buzoni-Gatel D., Del Giudice G., Rappuoli R., Bout D. Intranasal immunization with SAG1 and nontoxic mutant heat-labile enterotoxins protects mice against *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 2001. 69(3):1605-1612.

- [17] Bradley P.J., Hsieh C.L., Boothroyd J.C. Unprocessed *Toxoplasma* ROPI is effectively targeted and secreted into nascent parasitophorous vacuole. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2002. 125(1-2):189-193.
- [18] Bradley P.J., Boothroyd J.C. The pro region of *Toxoplasma* ROPI is a rho-trypanin targeting signal. *Int. J. Parasitol.* 2001. 31(11):1177-1186.
- [19] Bradley P.J., Boothroyd J.C. Identification of the pro-mature processing site of *Toxoplasma* ROPI by mass spectrometry. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1999. 100(1):103-109.
- [20] Bulow R., Boothroyd J.C. Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infection by immunization with p30 antigen in liposomes. *J. Immunol.* 1991. 147(10):3496-3500.
- [21] Buxton D. Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Sarcocystis* spp.) in sheep and goats: recent advances. *Vet. Res.* 1998. 29(3-4):289-310.
- [22] Buxton D. Toxoplasmosis: the first commercial vaccine. *Parasitol. Today.* 1993. 9(9):335-337.
- [23] Cai Y., Wang Z., Li J., Li N., Wei F., Liu Q. Evaluation of an indirect ELISA using recombinant granule antigen GRA7 for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cats. *J. Parasitol.* 2015. 101(1):37-40.
- [24] Caldas L.A., De Souza W., Attias M. Microscopic analysis of calcium ionophore activated egress of *Toxoplasma gondii* from the host cell. *Vet. Parasitol.* 2010. 167(1):8-18.
- [25] Camargo M.E., Leser P.G. Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis. II Evolutionary study of antibodies and serological patterns in acquired toxoplasmosis, as detected by hemagglutination, complement fixation, IgG and IgM-immunofluorescence tests. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 1976. 18(4):227-238.
- [26] Carruthers V.B., Tomley F.M. Microneme proteins in apicomplexans. *Subcell Biochem.* 2008. 47:33-45.
- [27] Carruthers V.B., Boothroyd J.C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Curr. Opin. Microbiol.* 2007. 10(1):83-89.
- [28] Carruthers V.B. Host cell invasion by the opportunistic pathogen *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop.* 2002. 81(2):111-122.
- [29] Carruthers V.B., Hakansson S., Giddings O.K., Sibley L.D. *Toxoplasma gondii* uses sulfated proteoglycans for substrate and host cell attachment. *Infect. Immun.* 2000. 68(7):4005-4011.
- [30] Carruthers V.B., Sibley L.D. Mobilization of intracellular calcium stimulates microneme discharge in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Microbiol.* 1999. 31(2):421-428.
- [31] Carruthers V.B., Giddings O.K., Sibley L.D. Secretion of micronemal proteins is associated with *Toxoplasma* invasion of host cell. *Cell. Microbiol.* 1999. 1(3):225-235.
- [32] Carruthers V.B., Sibley L.D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblast. *Eur. J. Cell Biol.* 1997. 73(2):114-123.
- [33] Cerede O., Dubremetz J.F., Soete M., Deslee D., Vial H., Bout D., Lebrun M. Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence. *J. Exp. Med.* 2005. 201(3):453-463.
- [34] Cerede O., Dubremetz J.F., Bout D., Lebrun M. The *Toxoplasma gondii* protein MIC3 requires pro-peptide cleavage and dimerization to function as adhesin. *EMBO J.* 2002. 21(11):2526-2536.
- [35] Cesbron-Deleuw M.F., Guy B., Torpier G., Pierce R.J., Lenzen G., Cesbron J.Y., Charif H., Lepage P., Darcy F., Lecocq F., Capron A. Molecular characterization of a 23-kilodalton major antigen secreted by *Toxoplasma gondii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. 86(19):7537-7541.
- [36] Chong C.K., Jeong W., Kim H.Y., An D.J., Jeoung H.Y., Ryu J.E., Ko A.R., Kim Y.J., Hong S.J., Yang Z., Nam H.W. Development and clinical evaluation of a rapid serodiagnostic test for toxoplasmosis of cats using recombinant SAG1 antigen. *Korean J. Parasitol.* 2011. 49(3):207-212.
- [37] Choromański L., Freyre A., Popiel R., Brown K., Grieve R., Shibley G. Safety and efficacy of modified live feline *Toxoplasma gondii* vaccine. *Dev Biol. Stand.* 1995. 84:269-281.

- [38] Choromański L., Freyre A., Brown K., Popiel I., Shibley G. Safety aspects of a vaccine for cats containing a *Toxoplasma gondii* mutant strain. *J. Eukaryot. Microbiol.* 1994. 41(5):8S.
- [39] Chuang S.C., Ko J.C., Chen C.P., Du J.T., Yang C.D. Encapsulation of chimeric protein r SAG1/2 into poly(lactide-co-glycolide) microparticles induces long-term protective immunity against *Toxoplasma gondii* in mice. *Exp. Parasitol.* 2013b. 134(4):430-437.
- [40] Chuang S.C., Ko J.C., Chen C.P., Du J.T., Yang C.D. Induction of long-lasting protective immunity against *Toxoplasma gondii* in BALB/c mice by recombinant surface antigen 1 protein encapsulated in poly (lactide-co-glycolide) microparticles. *Parasit Vectors.* 2013a. 6:34.
- [41] Ciaramella P., Corona M., Cortese L., Piantedosi D., Santoro D., Di Loria A., Rigato R. Seroprevalence of *Neospora* spp. in asymptomatic horses in Italy. *Vet. Parasitol.* 2004. 123(1-2):11-15.
- [42] Collazo C.M., Yap G.S., Sempowski G.D., Lusby K.C., Tessarollo L., Woude G.F., Sher A., Taylor G.A. Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon gamma-inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection. *J. Exp. Med.* 2001. 194(2):181-188.
- [43] Cong H., Yuan Q., Zhao Q., Zhao L., Yin H., Zhou H., He S., Wang Z. Comparative efficacy of a multi-epitope DNA vaccine via intranasal, peroral, and intramuscular delivery against lethal *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Parasite Vectors.* 2014. 7:145
- [44] Cong H., Zhang M., Zhang Q., Gong J., Cong H., Xin Q., He S. Analysis of structures and epitopes of surface antigen glycoproteins expressed in bradyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Biomed. Res. Int.* 2013. doi:10.1155/2013/165342.
- [45] Cong H., Mui E.J., Witola W.H., Sidney J., Alexander J., Sette A., Maewal A., McLeod R. Towards an immunosense vaccine to prevent toxoplasmosis: Protective *Toxoplasma gondii* epitopes restricted by HLA-A*0201. *Vaccine.* 2011. 29(4):754-762.
- [46] Cong H., Mui E.J., Witola W.H., Sidney J., Alexander J., Sette A., Maewal A., McLeod R. Human immunome, bioinformatic analyses using HLA supermotifs and the parasite genome, binding assays, studies of human T cell responses, and immunization of HLA-A*1101 transgenic mice including novel adjuvants provide a foundation for HLA-A03 restricted CD8+T cell epitope based, adjuvanted vaccine protective against *Toxoplasma gondii*. *Immunome Res.* 2010. 6:12.
- [47] Cong H., Gu Q.M., Yin H.E., Wang J.W. Zhao Q.L., Zhou H.Y., Li Y. Zhang J.Q. Multiepitope DNA vaccine linked to the A2/B subunit of cholera toxin protect mice against *Toxoplasma gondii*. *Vaccine.* 2008. 26(31):3913-3921.
- [48] Cong H., Gu Q.M., Jiang Y., He S.Y., Zhou H.Y., Yang T.T., Li Y., Zhao Q.L. Oral immunization with a live recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* protects mice against *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 2005. 27(1-2):29-35.
- [49] Cook A.J.C., Gilbert R.E., Buffolano W., Zufferey J., Petersen E., Jenum A., Foulon W., Semprini A.E., Dunn D.T. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicenter case-control study. *BMJ.* 2000. 321(7254):142-147.
- [50] Coppens I., Andries M., Liu J.L., Cesbron-Delauw M.F. Intracellular trafficking of dense granule proteins in *Toxoplasma gondii* and experimental evidences for a regulated exocytosis. *Eur. J. Cell. Biol.* 1999. 78(7):463-472.
- [51] Cortez E., Stumbo A.C., Saldanha-Gama R., Villela C.G., Barja-Fidalgo C., Rodrigues C.A., das Gracas Henriques M., Benchimol M., Barbosa H.S., Porto L.C., Carvalho L. Immunolocalization of an osteopontin-like protein in dense granules of *Toxoplasma gondii* tachyzoites and its association with the parasitophorous vacuole. *Micron.* 2008. 39(1):25-31.
- [52] Cox F.E. Systematics of the parasitic Protozoa. *Trends Parsitol.* 2002. 18(3):108.
- [53] Cox F.E. Control of coccidiosis: lessons from other sporozoa. *Int. J. Parasitol.* 1998. 28(1):165-179.
- [54] Cunha-Júnior J.P., Silva D.A.O., Silva N.M., Souza M.A., Souza G.R.L., Prudencio C.R., Pirovani C.P., Cascardo J.C.M., Barbosa B.F., Goulart L.R., Mineo J.R. A4D12 monoclonal antibody recognizes a new linear epitope from SAG2A *Toxoplasma gondii* tachyzoites, identified by phage display bioselection. *Immunobiology.* 2010. 215(1):26-37.

- [55] Dai J.F., Jiang M., Qu L.L., Sun L., Wang Y.Y., Gong L.L., Gong R.J., Si J. *Toxoplasma gondii*: enzyme-linked immunosorbent assay based on a recombinant multi-epitope peptide for distinguishing recent from past infection in human sera. *Exp. Parasitol.* 2013. 133(1):95-100.
- [56] Dai J., Jiang M., Wang Y., Qu L., Gong R., Si J. Evaluation of a recombinant multiepitope peptide for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012. 19(3):338-342.
- [57] Darcy F., Maes P., Gras-Masse H., Auriault C., Bossus M., Deslee D., Godard I., Cesbron M.F., Tartar A., Capron A. Protection of mice and nude rats against toxoplasmosis by a multiple antigenic peptide construction derived from *Toxoplasma gondii* P30 antigen. *J. Immunol.* 1992. 149(11):3636-3641.
- [58] Davis S.W., Dubey J.P. Mediation of immunity to *Toxoplasma gondii* oocyst shedding in cats. *J. Parasitol.* 1995. 81(6):882-886.
- [59] Dąbrowski S., Kur J. Cloning, overexpression, and purification of the recombinant His-tagged SSB protein of *Escherichia coli* and use in polymerase chain reaction amplification. *Protein Expr. Purif.* 1999. 16(1):96-102.
- [60] Debard N., Buzoni-Gatel D., Bout D. Intranasal immunization with SAG1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection. *Infect. Immun.* 1996. 64(6):2158-2166.
- [61] Di Cristina M., Del Porto P., Buffolano W., Beghetto E., Spadoni A., Guglietta S., Piccolella E., Felisi F., Gargano N. The *Toxoplasma gondii* bradyzoite antigens BAG1 and MAG1 induce early humoral and cell-mediated immune responses upon human infection. *Microbes Infect.* 2004. 6(2):164-171.
- [62] Długońska H., Dytnerka K. Proteom *Toxoplasma gondii*. *Wiad. Parazytol.* 2003. 49(1):3-10.
- [63] Długońska H., Dytnerka K. Antygeny *Toxoplasma gondii*. *Wiad. Parazytol.* 1999. 45(4):473-480.
- [64] Doskaya M., Kalantari-Dehaghi M., Walsh C.M., Hiszczyńska-Sawicka E., Davies D.H., Felgner P.L., Larsen L.S.Z., Lathrop R.H., Hatfield G.W., Schulz J.R., Guruz Y., Jurnak F. GRA1 protein vaccine confers better immune response compared to codon-optimized GRA1 DNA vaccine. *Vaccine.* 2007. 25(10):1824-1837.
- [65] Dowse T., Soldati D. Host cell invasion by the apicomplexans: the significance of microneme protein proteolysis. *Curr. Opin. Microbiol.* 2004. 7(4):388-396.
- [66] Dubey J.P., Hill D.E., Rozeboom D.W., Rajedran C., Choudhary S., Ferreira L.R., Kwok O.C., Su C. High prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* isolated from organic pigs in northern USA. *Vet. Parasitol.* 2012. 188(1-2):14-18.
- [67] Dubey J.P. Toxoplasmosis in sheep – the last 20 years. *Vet. Parasitol.* 2009b. 163(1-2):1-14.
- [68] Dubey J.P. Toxoplasmosis in pigs – the last 20 years. *Vet Parasitol.* 2009a. 164(2-4):89-103.
- [69] Dubey J.P., Jones J.L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int. J. Parasitol.* 2008. 38(11):1257-1278.
- [70] Dubey J.P., Lindsay D.S., Speer C.A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites; bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998. 11(2):267-299.
- [71] Dubey J.P. Duration of immunity to shedding of *Toxoplasma gondii* oocysts by cats. *J. Parasitol.* 1995. 81(3):410-415.
- [72] Dubey J.P., Carpenter J.L. Histologically confirmed clinical toxoplasmosis in cats: 100 cases (1952-1990). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1993. 203(11):1556-1566.
- [73] Dytnerka K., Stączek P., Długońska H. *Toxoplasma gondii* – kosmopolityczny pasożyt o małym zróżnicowaniu genetycznym. *Post. Mikrobiol.* 2004. 43(2):141-154.
- [74] Dziadek B., Gatkowska J., Grzybowski M., Dziadek J., Dzitko K., Długońska H. *Toxoplasma gondii*: the vaccine potential of three trivalent antigen-cocktails composed of recombinant ROP2, ROP4, GRA4 and SAG1 proteins against chronic toxoplasmosis in BALB/c mice. *Exp. Parasitol.* 2012. 131(1):133-138.

- [75] Dziadek B., Gatkowska J., Brzostek A., Dziadek J., Dzitko K., Grzybowski M., Długońska H. Evaluation of three recombinant multi-antigenic vaccines composed of surface and secretory antigens of *Toxoplasma gondii* in murine models of experimental toxoplasmosis. *Vaccine*. 2011. 29(4):821-830.
- [76] European Food Safety Authority (EFSA). Surveillance and monitoring of *Toxoplasma* in humans, food and animals - Scientific Opinion on the Panel on Biological Hazards. *EFSA J*. 2007. 583:1-64.
- [77] Fermin Z., Bout D., Ricciardi-Castagnoli P., Hoebeke J. Salbutamol as an adjuvant for nasal vaccination. *Vaccine*. 1999. 17(15-16):1936-1941.
- [78] Fourmaux M.N., Achbarou A., Mercereau-Puijalon O., Biderre C., Briche I., Loyens A., Odberg-Ferragut C., Camus D., Dubremetz J.F. The MIC1 microneme protein of *Toxoplasma gondii* contains a duplicated receptor-like domain and binds to host cell surface. *Mol. Biochem. Parasitol*. 1996. 83(2):201-210.
- [79] Frenkel J.K., Pfefferkorn E.R., Smith D.D., Fishback J.L. Prospective vaccine prepared from a new mutant of *Toxoplasma gondii* for use in cats. *Am. J. Vet. Res*. 1991. 52(5):759-763.
- [80] Freyre A., Choromański L., Fishback J.L., Popiel I. Immunization of cats with tissue cysts, bradyzoites, and tachyzoites of the T-263 strain of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol*. 1993. 79(5):716-719.
- [81] Gamble H.R., Andrews C.D., Dubey J.P., Webert D.W., Parmley S.F. Use of recombinant antigens for detection of *Toxoplasma gondii* infection in swine. *J. Parasitol*. 2000. 86(3):459-462.
- [82] Garcia J.L., Gennari S.M., Navarro I.T., Machado R.Z., Sinhorini I.L. *Toxoplasma gondii*: isolation of tachyzoites rhoptries and incorporation into Iscom. *Exp. Parasitol*. 2004. 108(1-2):40-46.
- [83] Gatkowska J., Gašior A., Kur J., Długońska H. *Toxoplasma gondii*: chimeric Dr fimbriae as a recombinant vaccine against toxoplasmosis. *Exp. Parasitol*. 118(2):266-270.
- [84] Gendrin C., Bittame A., Mercier C., Cesbron-Delauw M.F. Post-translational membrane sorting of the *Toxoplasma gondii* GRA6 protein into the parasite-containing vacuole is driven by its N-terminal domain. *Int. J. Parasitol*. 2010. 40(11):1325-1334.
- [85] Gill C.O. Safety and storage stability of horse meat for human consumption. *Meat Sci*. 2005. 71(3):506-513.
- [86] Godwin R. *Toxoplasma gondii* and elevated suicide risk. *Vet. Rec*. 2012. 171(9):225.
- [87] Golkar M., Shokrgozar M.A., Rafati S., Musset K., Assmar M., Sadaie R., Cesbron-Delauw M.F., Mercier C. 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*. 2007. 25(21):4301-4311.
- [88] Gołąb E. Wykrywanie DNA *Toxoplasma gondii* w płynach ustrojowych metodą PCR. *Wiad. Parazytol*. 1995. 40(1):13-18.
- [89] Górecki M.T., Andrzejewska I., Streppa R. Is order of voluntarily entrance to milking parlour related to *Toxoplasma gondii* infection in sheep – A brief note. *Appl. Anim. Behav. Sci*. 2008. 110(3-4):392-396.
- [90] Graille M., Stura E.A., Bossus M., Muller B.H., Letourneur O., Battail-Poirot N., Sibai G., Gauthier M., Rolland D., Le Du M.H., Ducancel F. Crystal structure of the complex between the monomeric form of *Toxoplasma gondii* surface antigen 1 (SAG1) and a monoclonal antibody that mimics the human immune response. *J. Mol. Biol*. 2005. 354(2):447-458.
- [91] Hager K.M., Carruthers V.B. MARveling at parasite invasion. *Trends Parasitol*. 2008. 24(2):51-54.
- [92] Hall S.M., Pandit A., Golwilkar A., Williams T.S. How do Jains get *Toxoplasma* infection? *Lancet*. 1999. 354(9177):486-487.
- [93] He X.L., Grigg M.E., Boothroyd J.C., Garcia K.C. Structure of the immunodominant surface antigen from the *Toxoplasma gondii* SRS superfamily. *Nat. Struct. Biol*. 2002. 9(8):606-611.

- [94] Henriquez S.A., Brett R., Alexander J., Pratt J., Roberts C.W. Neuropsychiatric disease and *Toxoplasma gondii* infection. *Neuroimmunomodulation*. 2009. 16(2):122-133.
- [95] Hill D.E., Dubey J.P. *Toxoplasma gondii* prevalence in farm animals in the United States. *Int. J. Parasitol.* 2013. 43(2):107-113.
- [96] Hiszczyńska-Sawicka E., Kur J., Pietkiewicz H., Holec L., Gąsior A., Myjak P. Efficient production of the *Toxoplasma gondii* GRA6, p35 and SAG2 recombinant antigens and their applications in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Acta Parasitol.* 2005. 50(3):249-254.
- [97] Hiszczyńska-Sawicka E., Brillowska-Dąbrowska A., Dąbrowski S., Pietkiewicz H., Myjak P., Kur, J. High yield expression and single-step purification of *Toxoplasma gondii* SAG1, GRA1, and GRA7 antigens in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 2003. 27(1):150-157.
- [98] Holec-Gąsior L., Ferra B., Hiszczyńska-Sawicka E., Kur J. The optimal mixture of *Toxoplasma gondii* recombinant antigens (GRA1, P22, ROP1) for diagnosis of ovine toxoplasmosis. *Vet. Parasitol.* 2014. 206(3-4):146-152
- [99] Holec-Gąsior L. *Toxoplasma gondii* recombinant antigens as tools for serodiagnosis of human toxoplasmosis: Current status of studies. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013. 20(9):1343-1351.
- [100] Holec-Gąsior L., Ferra B., Drapała D., Lautenbach D., Kur J. A new MIC1-MAG1 recombinant chimeric antigen can be used instead of the *Toxoplasma gondii* lysate antigen in serodiagnosis of human toxoplasmosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012. 19(1):57-63.
- [101] Holec-Gąsior L., Kur J., Hiszczyńska-Sawicka E. Drapała D., Dominiak-Górski B., Pejsak Z. Application of recombinant antigens in serodiagnosis of swine toxoplasmosis and prevalence of *Toxoplasma gondii* infection among pigs in Poland. *Pol. J. Vet. Sci.* 2010. 13(3):457-464.
- [102] Holec-Gąsior L., Kur J. *Toxoplasma gondii*: Recombinant GRA5 antigen for detection of immunoglobulin G antibodies using enzyme-linked immunosorbent assay. *Exp. Parasitol.* 2010. 124(3):272-278.
- [103] Holec-Gąsior L., Kur J., Hiszczyńska-Sawicka E. GRA2 and ROP1 recombinant antigens as potential markers for detection of *Toxoplasma gondii*-specific immunoglobulin G in humans with acute toxoplasmosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009. 16(4):510-514.
- [104] Holec L., Gąsior A., Brillowska-Dąbrowska A., Kur J. *Toxoplasma gondii*: Enzyme-linked immunosorbent assay using different fragments of recombinant microneme protein 1 (MIC1) for detection of immunoglobulin G antibodies. *Exp. Parasitol.* 2008. 119(1):1-6.
- [105] Holec L., Hiszczyńska-Sawicka E., Gąsior A., Brillowska-Dąbrowska A., Kur J. Use of MAG1 recombinant antigen for detection of *Toxoplasma gondii* infection in humans. *Clin. Vac. Immunol.* 2007. 14(3):220-225.
- [106] Holec L. Rozprawa doktorska pt. Antygeny rekombinantowe *Toxoplasma gondii* jako narzędzie w diagnostyce toksoplazmozy. 2007.
- [107] Howard J. The IRG proteins: a function in search of a mechanism. *Immunobiol.* 2008. 213(3-4):367- 375.
- [108] Huang X., Xuan X., Hirata H., Yokoyama N., Xu L., Suzuki N., Igarashi I. Rapid immunochromatographic test using recombinant SAG2 for detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in cats. *J. Clin. Microbiol.* 2004. 41(1):351-353.
- [109] Huang X., Xuan X. Suzuki H., Sugimoto C., Nagasawa H., Fujisaki K., Mikami T., Igarashi I. Characterization of *Toxoplasma gondii* SAG2 expressed in insect cells by recombinant baculovirus and evaluation of its diagnostic potential in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Vaccine Immunol.* 2002b. 9(6):1343-1347.
- [110] Huang X., Xuan X., Kimbita E.N., Battur B., Miyazawa T., Fukumoto S., Mishima M., Makala L.H., Suzuki H., Sugimoto C., Nagasawa H., Fujisaki K., Mikami T., Igarashi I. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant SAG2 for diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cats. *J. Parasitol.* 2002a. 88(4):804-807.
- [111] Jacobs D., Vercammen M., Samana E. Evaluation of recombinant dense granule antigen 7 (GRA7) of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies and analysis of a major antigenic domain. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1999. 6(1):24-29.

- [112] Innes E.A. Toxoplasmosis: Comparative species susceptibility and host immune response. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 1997. 20(2):131-138.
- [113] Inouye S., Hasegawa A., Matsuno S., Katow S. Changes in antibody avidity after virus infections: detection by an immunosorbent assay in which a mild protein-denaturing agent is employed. *J. Clin. Microbiol.* 1984. 20(3):525-529.
- [114] Jiang T., Gong D., Ma L.A., Nie H., Zhou Y., Yao B., Zhao J. Evaluation of a recombinant MIC3 based latex agglutination test for the rapid serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in swines. *Vet. Parasitol.* 2008. 158(1-2):51-56.
- [115] Jongert E., Verhelst D., Abady M., Petersen E., Gargano N. Protective Th1 immune responses against chronic toxoplasmosis induced by a protein-protein vaccine combination but not by its DNA-protein counterpart. *Vaccine.* 2008. 26(41):5289-5295.
- [116] Jung C., Lee C.Y.F., Grigg M.E. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins. *Int. J. Parasitol.* 2004. 34(3):285-296.
- [117] Kasper L.H., Currie K.M., Bradley M.S. An unexpected response to vaccination with a purified major membrane tachyzoite antigen (P30) of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 1985. 134(5):3426-3431.
- [118] Khan I.A., Ely K.H., Kasper L.H. A purified parasite antigen (p30) mediates CD8+ T cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. *J. Immunol.* 1991. 147(10):3501-3506.
- [119] Kimbita E.N., Xuan X., Huang X., Miyazawa T., Fukumoto S., Mishima M., Suzuki H., Sugimoto C., Negasawa H., Fujisaki K., Suzuki N., Mikami T., Igarashi I. Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant SAG1. *Vet. Parasitol.* 2001. 102(1-2):35-44.
- [120] Kijlstra A., Jongert E. *Toxoplasma*-safe meat: close to reality? *Trends Parasitol.* 2009. 25(1):18-22.
- [121] Kijlstra A., Jongert E. Control of the risk of human toxoplasmosis transmitted by meat. *Int. J. Parasitol.* 2008. 38(12):1359-1370.
- [122] Kijlstra A., Eissen O.A., Cornelissen J., Munniksma K., Eijck I., Kortbeek T. *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004. 45(9):3165-3169.
- [123] Kruszewski J., Miller A. Toksoplazmoza. *Alergia.* 2004. 20(2):30-37.
- [124] Kur J., Holec-Gąsior L., Hiszczyńska-Sawicka E. Current status of toxoplasmosis vaccine development. *Expert. Rev. Vaccines.* 2009. 8(6):191-808.
- [125] Labruyere E., Lingnau M., Mercier C., Sibley D. Differential membrane targeting of the secretory proteins GRA4 and GRA6 within the parasitophorous vacuole formed by *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1999. 102(2):311-324.
- [126] Laguia-Becher M., Martin V., Kraemer M., Corigliano M., Yacono M.L., Goldman A., Clemente M. Effect of codon optimization and subcellular targeting on *Toxoplasma gondii* antigen SAG1 expression in tobacco leaves to use in subcutaneous and oral immunization in mice. *BMC Biotechnol.* 2010. 10:52.
- [127] Lappin M.R., Dawe D.L., Lindl P., Greene C.E., Prestwood A.K., Mitogen and antigen-specific induction of lymphoblast transformation in cats with subclinical toxoplasmosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1992. 30(2-3):207-220.
- [128] Lappin M.R., Greene C.E., Prestwood A.K., Dawe D.L., Tarleton R.L. Diagnosis of recent *Toxoplasma gondii* infection in cats by use of an enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin M. *Am. J. Vet. Res.* 1989. 50(9):1580-1585.
- [129] Lappalainen M., Hedman K. Serodiagnosis of toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. *Ann Ist Super Sanita.* 2004. 40(1):81-88.
- [130] Lau Y.L., Thiruvengadam G., Lee W.W., Fong M.Y. Immunogenic characterization of the chimeric surface antigen 1 and 2 (SAG1/2) of *Toxoplasma gondii* expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Parasitol. Res.* 2011. 109(3):871-878.

- [131] Lau Y.L., Fong M.Y. *Toxoplasma gondii*: serological characterization and immunogenicity of recombinant surface antigen 2 (SAG2) expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Exp. Parasitol.* 2008. 119(3):373-378.
- [132] Lecordier L., Fourmaux M.P., Mercier C., Dehecq E., Masy E., Cesbron-Delauw M.F. Enzyme-linked immunosorbent assays using the recombinant dense granule antigens GRA6 and GRA1 of *Toxoplasma gondii* for detection of immunoglobulin G antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2000. 7(4):607-611.
- [133] Lecordier L., Moleon-Borodowsky I., Dubremetz J.F., Tourvieille B., Mercier C., Deslee D., Capron A., Cesbron-Delauw M.F. Characterization of a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* (GRA6) associated to the network of the parasitophorous vacuole. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1995. 70(1-2):85-94.
- [134] Lekutis C., Ferguson D.J.P., Grigg M.E., Camps M., Boothroyd J.C. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme. *Int. J. Parasitol.* 2001. 31(12):1285-1292.
- [135] Lekutis C., Ferguson D.J.P., Boothroyd J.C. *Toxoplasma gondii*: Identification of a developmentally regulated family of genes related to SAG2. *Exp. Parasitol.* 2000. 96(2):89-96.
- [136] Letscher-Bru V., Pfaff A.W., Abou-Bacar A., Filisetti D., Antoni E., Villard O., Klein J.P., Candolfi E. Vaccination with *Toxoplasma gondii* SAG-1 protein is protective against congenital toxoplasmosis in BALB/c mice but not in CBA/J mice. *Infect. Immun.* 2003. 71(11):6615-6619.
- [137] Letscher-Bru V., Villard O., Risse B., Zauke M., Klein J.P., Kien T.T. Protective effect of vaccination with a combination of recombinant surface antigen 1 and interleukin-12 against toxoplasmosis in mice. *Infect. Immun.* 1998. 66(9):4503-4506.
- [138] Lin J., Lin X., Yang G.H., Wang Y., Peng B.W., Lin J.Y. *Toxoplasma gondii*: Expression of GRA1 gene in endoplasmic reticulum promotes both growth and adherence and modulates intracellular calcium release in macrophages. *Exp. Parasitol.* 2010. 125(2):165-171.
- [139] Lipska A., Wysocka J., Turowski D., Lipartowska R., Lipski M. Diagnostyka toksoplazmozy. *Diagn. Lab.* 2000. 36(2):199-207.
- [140] Lourenco E.V., Bernardes E.S., Silva N.M., Mineo J.R., Panunto-Castelo A., Roque-Barreira M.C. Immunization with MIC1 and MIC4 induces protective immunity against *Toxoplasma gondii*. *Microbes Infect.* 2006. 8(5):1244-1251.
- [141] Lourenco E.V., Pereira S.R., Faca V.M., Coelho-Castelo A.A., Minero J.R., Roque-Barreira M.C., Greene L.J., Panunto-Castelo A. *Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC1 is a lactose-binding lectin. *Glycobiology.* 2001. 11(7):541-547.
- [142] Lunden A., Parmley S.F., Bengtsson K.L., Araujo F.G. Use of a recombinant antigen, SAG2, expressed as a glutathione-S-transferase fusion protein to immunize mice against *Toxoplasma gondii*. *Parasitol. Res.* 1997. 839(1):6-9.
- [143] Macedo Junior A.G., Cunha Junior J.P., Cardoso T.H.S., Silva M.V., Santiago F.M., Silva J.S., Pirovani C.P., Silva D.O., Mineo J.R., Mineo T.W.P. SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* interacts with both innate and adaptive immune compartments of infected hosts. *Parasit. Vectors.* 2013. 6:163.
- [144] MacMicking J.D. Immune control of phagosomal bacteria by p47 GTPases. *Curr. Opin. Microbiol.* 2005 8(1):74-82.
- [145] MacMicking J.D., Taylor G.A., McKinney J.D. Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science.* 2003. 302(5645):654-659.
- [146] Maksimov P., Zerweck J., Maksimov A., Hotop A., Groß U., Pleyer U., Spekker K., Däubener W., Werdermann S., Niederstrasser O., Petri E., Mertens M., Ulrich R.G., Conraths F.J., Schares G. Peptide microarray analysis of *in silico*-predicted epitopes for serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in humans. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012. 19(6):865-874.
- [147] Mateus-Pinilla N.E., Dubey J.P., Choromański L., Weigel R.M. A field trial of the effectiveness of a feline *Toxoplasma gondii* vaccine in reducing *T. gondii* exposure for swine. *J. Parasitol.* 1999. 85(5):855-860.

- [148] McLeod R., Eisenhauer P., Mack D., Brown C., Filice G., Spitalny G. Immune responses associated with early survival after peroral infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 1989. 142(9):3247-3255.
- [149] Meissner M., Reiss M., Viebig N., Carruthers V.B., Toursel C., Tomavo S., Ajioka J.W., Soldati D. A family of transmembrane microneme proteins of *Toxoplasma gondii* contain EGF-like domain and function as escorters. *J. Cell Science.* 2002. 115(3):563-574.
- [150] Mercier C., Adjogble K.D.Z., Daubener W., Cesbron-Delauw M.F. Dense granules: Are they key organelles to help understand the parasitophorous vacuole of all apicomplexa parasites? *Int. J. Parasitol.* 2005. 35(8):829-849.
- [151] Mercier C., Dubremetz J.F., Rauscher B., Lecordier L., Sibley D.L., Cesbron-Delauw M.F. Biogenesis of nanotubular network in *Toxoplasma* parasitophorous vacuole induced by parasite proteins. *Mol. Biol. Cell.* 2002. 13(7):2397-2409.
- [152] Mercier C., Cesbron-Delauw M.F., Sibley D. The amphipathic helices of the *Toxoplasma* protein GRA2 mediate post-secretory membrane association. *J. Cell Scienc.* 1998. 111(15):2171-2180.
- [153] Mercier C., Lecordier L., Darcy F., Deslee D., Murray A., Tourvieille B., Maes P., Capron A., Cesbron-Delauw M.F., Molecular characterization of a dense granule antigen (GRA2) associated with the network of the parasitophorous vacuole in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1993. 58(1):71-82.
- [154] Michalski M., Platt-Samoraj A. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cats from Olsztyn City. *Wiad. Parazytol.* 2004. 50(2):303-305.
- [155] Mishima M., Xuan X., Shioda A., Omata Y., Fujisaki K., Nagasawa H., Mikami T. Modified protection against *Toxoplasma gondii* lethal infection and brain cyst formation by vaccination with SAG2 and SRS1. *J. Vet. Med. Sci.* 2001. 63(4):433-438.
- [156] Montoya J.G., Liesenfeld O. Toxoplasmosis. *Lancet.* 2004. 363(9425):1965-1976.
- [157] Nagel S.D., Boothroyd J.C. The major surface antigen P30 of *Toxoplasma gondii* is anchored by a glycolipid. *J. Biol. Chem.* 1989. 264(10):5569-5574.
- [158] Nichthauser-Chajęcka D. Toksoplazmoza wrodzona i nabyta u dzieci – praca poglądowa. *Nowa Pediatría.* 1999. 5.
- [159] Niewiadomska K., Pojmańska T., Machnicka B., Czubaj A. Zarys parazytologii ogólnej. *Wyd. Naukowe PWN Warszawa.* 2001.
- [160] Ossorio P.N., Schwartzman J.D., Boothroyd J.C. A *Toxoplasma gondii* rhoptry protein associated with host cell penetration has unusual charge asymmetry. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992. 50(1):1-15.
- [161] Parmley S.F., Slifer T., Araujo F. Protective effects of immunization with a recombinant cyst antigen in mouse models of infection with *Toxoplasma gondii* tissue cysts. *J. Infect. Dis.* 2002. 185(Suppl. 1):S90-S95
- [162] Parmley S.F., Weiss L.M., Yang S. Cloning of bradyzoite-specific gene of *Toxoplasma gondii* encoding a cytoplasmic antigen. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1995. 73(1-2):253-257.
- [163] Parmley S. F., Yang S., Harth G., Sibley L. D., Sucharczuk A., Remington J. S. Molecular characterization of a 65-kilodalton *Toxoplasma gondii* antigen expressed abundantly in the matrix of tissue cysts. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1994. 66(2):283-296.
- [164] Parmley S.F., Sgalato G.D., Remington J.S. Genomic and corrected sequence of the P28 gene from *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem Parasitol.* 1993. 57(1):161-166.
- [165] Paul M. Toksoplazmoza – groźna choroba pasożytnicza kobiet ciężarnych i pacjentów z osłabioną funkcją układu odpornościowego. *Kosmos - Problemy Nauk Biologicznych* 2005. 54(1):77-88.
- [166] Paul M. Kryteria wczesnego rozpoznawania i leczenia zarażenia *Toxoplasma gondii* u kobiet ciężarnych i noworodków. *Medycyna po Dyplomie* 2004. 13(6):30-40.
- [167] Pedersen M.G., Mortensen P.B., Norgaard-Pedersen B., Postolache T.T. *Toxoplasma gondii* infection and self-directed violence in mothers. *Arch. Gen.Psychiatry.* 2012. 69(11):1123-1130.

- [168] Pereira-Bueno J., Quintanilla-Gozaolo A., Perez-Perez V., Alvarez-Garcia G., Collantes-Fernandez E., Ortega-Mora L.M., Evaluation of ovine abortion associated with *Toxoplasma gondii* in Spain by different diagnostic techniques. *Vet. Parasitol.* 2004. 121(1-2):33-43.
- [169] Petersen E., Nielsen H.V., Christiansen L., Spenter J. Immunization with *E. coli* produced recombinant *T. gondii* SAG1 with alum as adjuvant protect mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. *Vaccine.* 1998. 16(13):1283-1289.
- [170] Pfrepper K.I., Anders G., Gohl M., Krczal D., Hlobil H., Wassenberg D., Soutschek E. Seroreactivity to and avidity for recombinant antigens in toxoplasmosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005. 12(8):977-982.
- [171] Pietkiewicz H., Hiszczyńska-Sawicka E., Kur J., Petersen E., Nielsen H.V., Stankiewicz M., Andrzejewska I., Myjak P. Usefulness of *Toxoplasma gondii*-specific recombinant antigens in serodiagnosis of human toxoplasmosis. *J. Clin. Microb.* 2004. 42(4):1779-1781.
- [172] Pitel P.H., Romand S., Pronost S., Foucher N., Gargala G., Maillard K., Thulliez P., Collobert-Laugier C., Tainturier D., Fortier G., Baller J.J. Investigation of *Neospora* sp. antibodies in aborted mares from Normandy, France. *Vet. Parasitol.* 2003. 118(1-2):1-6
- [173] Radkowski M., Roger S., Żarnowska H., Cholewińska G., Olszyńska M., Dziubek Z., Ślusarczyk J. Oznaczenie awidności przeciwciał w diagnostyce toksoplazmozy. *Pol. Tyg. Lek.* 1996. 51(23-26):336-337.
- [174] Reiss M., Viebig N., Brecht S., Fourmaux M.N., Soete M., Di Cristina M., Dubremetz J.F., Soldati D. Identification and characterization of an escorter for two secretory adhesions in *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Biol.* 2001. 152(3):563-578.
- [175] Rosenberg C., De Craeye S., Jongert E., Gargano N., Beghetto E., Del Porto P., Verup-Jensen T., Petersen E. Induction of partial protection against infection with *Toxoplasma gondii* genotype II by DNA vaccination with recombinant chimeric tachyzoite antigens. *Vaccine* 2009. 27(18):2489-2498.
- [176] Sabin A.B., Feldman H.A. Dyes as Microchemical Indicators of a New Immunity Phenomenon Affecting a Protozoon Parasite (*Toxoplasma*). *Science* 1948. 108(2815):660-663.
- [177] Saffer L.D., Mercereau-Puijalon O., Duremetz J.F., Schwartzman J.D. Localization of a *Toxoplasma gondii* rhoptry protein by immunoelectron microscopy during and after host cell penetration. *J. Parasitol.* 1992. 78(4):526-530.
- [178] Sager H., Gloor M., Tenter A., Maley S., Hassig M., Gottstein B. Immunodiagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in sheep by the use of a P30 IgG avidity ELISA. *Parasitol. Res.* 2003. 91(2):171-174.
- [179] Sambrook J., Russel D.W. Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.* New York. 2001.
- [180] Santana S.S., Silva D.A.O., Vaz L.D., Pirovani C.P., Barros G.B., Lemos E.M., Dietze R., Mineo J.R., Cunha-Junior J.P. Analysis of IgG subclasses (IgG1 and IgG3) to recombinant SAG2A protein from *Toxoplasma gondii* in sequential serum samples from patients with toxoplasmosis. *Immunol. Lett.* 2012. 143(2):193-201.
- [181] Saouros S., Edwards-Jones B., Reiss M., Sawmynaden K., Cota E., Simpson P., Dowse T. J., Jakle U., Ramboarina S., Shivarattan T., Matthews S., Soldati-Favre D. A novel galectinlike domain from *Toxoplasma gondii* micronemal protein 1 assists the folding, assembly and transport of a cell adhesion complex. *J. Biol. Chem.* 2005. 280(46):38583-38591.
- [182] Sawmynaden K., Saouros S., Friedrich N., Marchant J., Simpson P., Bleijlevens B., Blackman M. J., Soldati-Favre D., Matthews S. Structural insights into microneme protein assembly reveal a new mode of EGF domain recognition. *EMBO Reports* 2008. 9(11):1149-1155.
- [183] Siachoque H., Guzman F., Burgos J., Patarroyo M.E., Gomez-Marin J.E. *Toxoplasma gondii*: immunogenicity and protection by P30 peptides in a murine model. *Exp. Parasitol.* 2006. 114(1):62-65.
- [184] Sibley L.D., Niesman I.R., Parmley S.F., Cesbron-Delauw M.F. Regulated secretion of multi-lamellar vesicles leads to the formation of a tabulo-vesicular network in host cell vacuoles occupied by *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Science.* 1995. 108(4):1669-1677.

- [185] Sobieszcańska B.M. Ocena przydatności testu badania awidności przeciwciał klasy G w serodiagnostyce toksoplazmozy. *Pol. Merkur. Lekarski* 2002. 13(74):111-115.
- [186] Sobieszcańska B., Grzybek-Hryncewicz K., Rudzka A. Wykrycie przeciwciał klasy IgA ważnym markerem ostrego zarażenia pierwotniaka *Toxoplasma gondii*. *Pol. Merkur. Lekarski* 1997. 3(17):228-230.
- [187] Soldati D., Meissner M. *Toxoplasma* as a novel system for motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2004. 16(1):32-40.
- [188] Soldati D., Dubremetz J.F., Lebrun M. Microneme proteins: structural and functional requirements to promote adhesion and invasion by the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 2001. 31(12):1293-1302.
- [189] Soldati D., Lassen A., Dubremetz J.F., Boothroyd J.C. Processing of *Toxoplasma* ROP1 protein in nascent rhoptries. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1998. 96(1-2):37-48.
- [190] Soldati D., Kim K., Kampmeier J., Dubremetz J.F., Boothroyd J.C. Complementation of a *Toxoplasma gondii* ROP1 knock-out mutant using phleomycin selection. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1995. 74(1):87-97.
- [191] Sroka J., Ziomko I. Metody rozpoznawania toksoplazmozy. *Medycyna Wet.* 2008. 64(2):132-135.
- [192] Sroka J., Zwoliński J., Dutkiewicz J. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in farm and wild animals from the area of Lublin province. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 2007. 51:535-540.
- [193] Stommel E.W., Seguin R., Thadani V.M., Schwartzman J.D., Gilbert K., Ryan K.A., Tosteson T.D., Kasper L.H. Cryptogenic epilepsy: an infectious etiology? *Epilepsia.* 2001. 42(3):436-438.
- [194] Striepen B., Soldati D., Garcia-Reguet N., Dubremetz J.F., Roos D.S. Targeting of soluble proteins to the rhoptries and micronemes in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2001. 113(1):45-53.
- [195] Supply P., Sutton P., Coughlan S.N., Bilo K., Saman E., Trees A.J., Cesbron-Delauw M.F., Locht C. Immunogenicity of recombinant BCG producing the GRA1 antigen from *Toxoplasma gondii*. *Vaccine.* 1999. 17(7-8):705-714.
- [196] Suzuki Y., Yang Q., Remington J.S. Genetic resistance against acute toxoplasmosis depends on the strain of *Toxoplasma gondii*. *J. Parasitol.* 1995. 81(6):1032-1034.
- [197] Śmiełowska-Łoś E., Pacoń J. *Toxoplasma gondii* infection of cats in epizootiological and clinical aspects. *Pol. J. Vet. Sci.* 2002. 5(4): 227-230.
- [198] Śpiewak E., Małafiej E. Toksoplazmoza – wybrane zagadnienia epidemiologii, kliniki i diagnostyki. *Mikrobiol. Med.* 1996. 1:14-28.
- [199] Tan T.G., Mui E., Cong H., Witola W.H., Montpetit A., Muench S.P., Sidney J., Alexander J., Sette A., Grigg M.E., Maewal A., McLeod R. Identification of *T. gondii* epitopes, adjuvants, and host genetic factors that influence protection of mice and humans. *Vaccine.* 2010. 28(23):3977-3989.
- [200] Tassi P. *Toxoplasma gondii* infection in horses. A review. *Parassitologia.* 2007. 49(1-2):7-15.
- [201] Taylor G.A. IRG proteins: key mediators of interferon-regulated host resistance to intracellular pathogens. *Cell. Microbiol.* 2007. 9(5):1099-1107.
- [202] Taylor G.A., Collazo C.M., Yap G.S., Nguyen K., Gregorio T.A., Taylor L.S., Eagleson B., Secret L., Southon E.A., Reid S.W., Tessarollo L., Bray M., McVicar D.W., Komschlies K.L., Young H.A., Biron C.A., Sher A., Vande Woude G.F. Pathogen-specific loss of host resistance in mice lacking the IFN-gamma-inducible gene *igtp*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. 97(2):751-755.
- [203] Tenter A.M., Heckerth A.R., Weiss L.M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.* 2000. 30(12-13):1217-1258.
- [204] Tenter A.M., Vietmeyer C., Johnson A.M., Janitschke K., Rommel M., Lehmacher W. ELISAs based on recombinant antigens for seroepidemiological studies on *Toxoplasma gondii* infections in cats. *Parasitol.* 1994. 109(1):29-36.

- [205] Tenter A.M., Vietmeyer C., Johnson A.M. Development of ELISAs based on recombinant antigens for the detection of *Toxoplasma gondii*-specific antibodies in sheep and cats. *Vet. Parasitol.* 1992. 43(3-4):189-201.
- [206] Terkawi M.A., Kameyama K., Rasul N.H., Xuan X., Nishikawa Y. Development of an immunochromatographic assay based on dense granule protein 7 for serological detection of *Toxoplasma gondii* infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013. 20(4):596-601.
- [207] Torrey E.F., Bartko J.J., Yolken R.H. *Toxoplasma gondii* and other risk factors for schizophrenia: an update. *Schizophr. Bull.* 2012. 38(3):642-647.
- [208] Travier L., Mondragon R., Dubremetz J.F., Musset K., Mondragon M., Gonzales S., Cesbron-Delauw M.F., Mercier C. Functional domains of the *Toxoplasma* GRA2 protein in the formation of the membranous nanotubular network of the parasitophorous vacuole. *Int. J. Parasitol.* 2008. 38(7):757-773.
- [209] Tumurjav B., Terkawi M.A., Zhang H., Zhang G., Jia H., Goo Y.K., Yamagishi J., Nishikawa Y., Igarashi I., Sugimoto C, Xuan X. Serodiagnosis of ovine toxoplasmosis in Mongolia by an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant *Toxoplasma gondii* matrix antigen 1. *Jpn. J. Vet. Res.* 2010. 58(2):111-119
- [210] Umiński J., Cisak E., Chmielewska-Badora J., Zwoliński J. Toksoplazmoza u ludzi i zwierząt. *Medycyna Wet.* 1994. 50:589-591.
- [211] Velge-Roussel F., Moretto M., Buzoni-Gatel D., Dimier-Poisson I., Ferrer M., Hoebcke J., Bout D. Differences in immunological response to a *T. gondii* protein (SAG1) derived peptide between two strains of mice: effect on protection in *T. gondii* infection. *Mol. Immunol.* 1997. 34(15):1045-1053.
- [212] Walochowa M., Dzbeński T. H. Zastosowanie metody peroksydaza-antyperoksydaza do wykrywania inwazji *Toxoplasma gondii* w ośrodkowym układzie nerwowym doświadczalnie zarażonych myszy. *Wiad. Parazytol.* 1989. 35(4):277-281.
- [213] Wang Y., Wang M., Wang G., Pang A., Fu B., Yin H., Zhang D. Increased survival time in mice vaccinated with a branched lysine multiple antigenic peptide containing B- and T-cell epitopes from *T. gondii* antigens. *Vaccine.* 2011. 29(47):8619-8623.
- [214] Webster J.P., Kaushik M., Bristow G.C., McConkey G.A. *Toxoplasma gondii* infection, from predation to schizophrenia: can animal behaviour help us understand human behaviour? *J. Exp. Biol.* 2013. 216(1):99-112.
- [215] Webster J.P., Lamberton P.H., Donnelly C.A., Torrey E.F. Parasites as causative agents of human affective disorders? The impact of anti-psychotic, mood-stabilizer and anti-parasite medication on *Toxoplasma gondii*'s ability to alter host behaviour. *Proc. Biol. Sci.* 2006. 273(1589):1023-1030.
- [216] Weiss L. M., Kim K. *Toxoplasma gondii*: The model Apicomplexan. Perspectives and Methods. *Elsevier* 2007.
- [217] Williams D.M., Grumet F.C., Remington J.S. Genetic control of murine resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 1978. 19(2):416-420.
- [218] www.abbottdiagnostics.pl
- [219] Xiao J., Viscidi R.P., Kannan G., Pletnikov M.V., Li Y., Severance E.G., Yolken R.H., Delhaes L. The *Toxoplasma* MAG1 peptides induce sex-based humoral immune response in mice and distinguish active from chronic human infection. *Microbes Infect.* 2013. 15(1):74-83.
- [220] Yang C.D., Chang G.N., Chao D. Protective immunity against *Toxoplasma gondii* in mice induced by a chimeric protein SAG1/2. *Parasitol. Res.* 2004. 92(1):58-64.
- [221] Zhao Y.O., Rohde C., Lilue J.T., Konen-Waisman S., Khaminets A., Hunn J.P., Howard J.C. *Toxoplasma gondii* and the immunity-related GTPase (IRG) resistance system in mice: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2009. 104(2):234-240.
- [222] Zhou H., Gu Q., Zhao Q., Zhang J., Cong H., Li Y., He S. *Toxoplasma gondii*: expression and characterization of a recombinant protein containing SAG1 and GRA2 in *Pichia pastoris*. *Parasitol. Res.* 2007. 100(4):829-835.

10. DOROBEK NAUKOWY, STYPENDIA, GRANTY, ITP.

Publikacje

1. **Ferra B.**, Holec-Gąsior L., Kur J. Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in farm animals (horses, swine, and sheep) by enzyme-linked immunosorbent assay using chimeric antigens. *Parasitol. Int.* 2015. – przyjęta do druku.
2. Holec-Gąsior L., **Ferra B.**, Hiszczyńska-Sawicka E., Kur J. The optimal mixture of *Toxoplasma gondii* recombinant antigens (GRA1, P22, ROP1) for diagnosis of ovine toxoplasmosis. *Vet. Parasitol.* 2014. 206(3-4):146-152.
3. Drapała D., Holec-Gąsior L., Kur J., **Ferra B.**, Hiszczyńska-Sawicka E., Lautenbach D. A new human IgG avidity test, using mixtures of recombinant antigens (rROP1, rSAG2, rGRA6), for the diagnosis of difficult-to-identify phases of toxoplasmosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2014. 79(3):342-346.
4. Holec-Gąsior L., **Ferra B.**, Drapała D. MIC1-MAG1-SAG1 chimeric protein, a most effective antigen for detection of human toxoplasmosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012. 19(12):1977-1979.
5. Holec-Gąsior L., **Ferra B.**, Drapała D., Lautenbach D., Kur J. A new MIC1-MAG1 recombinant chimeric antigen can be used instead of the *Toxoplasma gondii* lysate antigen in serodiagnosis of human toxoplasmosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012. 19(1):57-63.

Doniesienia konferencyjne

Wystąpienia ustne

1. Użyteczność rekombinantowego antygeny chimerycznego MIC1-MAG1-SAG1 *Toxoplasma gondii* w serodiagnosticsy toksoplazmozy u owiec – XXIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Parazytologicznego, Szklarska Poręba-Piechowice, 4-7.09.2013. *Annals of Parasitology*. Vol. 59Supplement, s.82
2. Produkcja antygeny chimerycznego MIC1-MAG1-SAG1 *Toxoplasma gondii* w bakteryjnym systemie ekspresyjnym – XXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów „Drobnoustroje bez granic”, Lublin, 5-8.09.2012.
3. Detection of *Toxoplasma gondii* in meat – available techniques – 15th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers, Gdańsk, 16-19.05.2012.
4. Nieswoiste zapalenie jelit – Wpływ Młodych Naukowców na Osiągnięcia Polskiej Nauki, Gdańsk, 21.04.2012.
5. The recombinant chimeric *Toxoplasma gondii* MIC1ex2MAG1 antigen – obtaining and estimating the usefulness for the serodiagnosis of toxoplasmosis - II International Student Conference of Biotechnology/XII Ogólnopolskie Akademickie Seminarium Studentów Biotechnologii, Wrocław, 19-21.11.2010.

Postery

1. **Ferra B.**, Holec-Gąsior L., Kur J. “Construction of a bacterial expression system for the production of GRA1-GRA2-GRA6 *Toxoplasma gondii* recombinant chimeric antigen with potential diagnostic utility” – V4 Parasitological Meeting „Parasites in the Heart of Europe”, Congress Center Academia, Stará Lesná – The High Tatra Mountains. 25-30.05.2014. Book of abstracts, p. 74, ISBN 978-80-968473-7-2, ©Slovak Society for Parasitology at SAS, Košice, May 2014.
2. Holec-Gąsior L., **Ferra B.**, Dominiak-Górski B., Drapała D. Antygeny rekombinantowe *Toxoplasma gondii* w serodiagnosticsy toksoplazmozy u owiec” – Konferencja: „Parazytologia – nie kończąca się opowieść”. Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN, Warszawa, 12.12.2012.
3. Drapała D., Kordalewska M., **Ferra B.** “PCR-ELISA: inexpensive alternative to quantitative PCR” – International Conference BioTech. Gdańsk, 28-30.09.2012.

4. Drapała D., Brillowska-Dąbrowska A., Holec-Gąsior L., **Ferra B.** "Production of *Toxoplasma gondii* MAG1 recombinant antigen in *Leishmania tarentolae* expression system" – 47th Congress of the Polish Biochemical Society, Polish-German Biochemical Societies Joint Meeting, Poznań, 11-14.09.2012. *Acta Biochimica Polonica*. 2012. 59(Supplement 3):37.
5. **Ferra B.**, Góra-Gębka M., Kotłowski R., Holec-Gąsior L., Drapała D. "Genetic predisposition to inflammatory bowel disease" – 47th Congress of the Polish Biochemical Society, Polish-German Biochemical Societies Joint Meeting, Poznań, 11-14.09.2012. *Acta Biochimica Polonica* 2012. 59(Supplement 3):219.
6. Drapała D., Holec-Gąsior L., Brillowska-Dąbrowska A., **Ferra B.** „Produkcja antygeny rekombinantowego MAG1 *Toxoplasma gondii* w systemie ekspresyjnym *Pichia pastoris*” – XXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów „Drobnoustroje bez granic”, Lublin, 5-8.09.2012.

Artykuły w materiałach konferencyjnych/pokonferencyjnych

1. Drapała D., Kordalewska M., **Ferra B.** PCR-ELISA: inexpensive alternative to quantitative PCR. PhD Interdisciplinary Journal. 2012. s. 7-12.
2. Drapała D., **Ferra B.** Problem reakcji krzyżowych w immunodiagnostyce na przykładzie neosporozji i toksoplazmozy. Młodzi naukowcy dla polskiej nauki Część 5 - Nauki przyrodnicze. Wpływ młodych naukowców na osiągnięcia polskiej nauki - Nowe trendy w naukach przyrodniczych. Tom II, Kraków 2012, CREATIVETIME, s. 50-55.
3. Drapała D., **Ferra B.** Reakcje krzyżowe w immunodiagnostyce. Nowe trendy w naukach przyrodniczych 2. Tom II, Kraków 2012, CREATIVETIME, s. 49-54.
4. **Ferra B.**, Drapała D. Nieswoiste zapalenie jelit. Młodzi naukowcy dla polskiej nauki Część 5 - Nauki przyrodnicze. Wpływ młodych naukowców na osiągnięcia polskiej nauki - Nowe trendy w naukach przyrodniczych. Tom II, Kraków 2012, CREATIVETIME, s. 32-38.
5. **Ferra B.**, Drapała D. Podłoże nieswoistego zapalenia jelit. Nowe trendy w naukach przyrodniczych 2. Tom II, Kraków 2012, CREATIVETIME, s. 18-27.
6. **Ferra B.**, Drapała D. Detection of *Toxoplasma gondii* in meat - available techniques. 15th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers "Advances in Chemical and Mechanical Engineering" Volume I/II, 2012, s. 151-156.
7. Drapała D., **Ferra B.** Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental samples. 15th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers "Advances in Chemical and Mechanical Engineering" Volume I/II, 2012, s. 123-128.
8. Kordalewska M., Drapała D., **Ferra B.** Real-Time PCR: molecular technique of many applications. 15th International Symposium of Students and Young Mechanical Engineers "Advances in Chemical and Mechanical Engineering" Volume I/II, 2012, s. 269-274.

Udział w projektach grantowych

1. „Nowe odczynniki do badań immunochemicznych na bazie indykatorów i znaczników akrydynowych połączonych z białkami” Grant nr 2012/05/B/ST5/01680 przyznany przez NCN w ramach konkursu Opus 3. Kierownik projektu: dr hab. Karol Krzywiński, prof. UG. Okres realizacji: 27.03.2013-26.03.2016. Charakter pracy w projekcie – wykonawca.
2. „Nowe testy diagnostyczne oparte na antygenach rekombinantowych pasożyta *Toxoplasma gondii* do wykrywania toksoplazmozy u zwierząt hodowlanych” Grant nr IP2011 017571 przyznany przez MNiSW. Kierownik projektu: dr inż. Lucyna Holec-Gąsior. Okres realizacji: 10.04.2012-09.07.2014. Charakter pracy w projekcie – wykonawca.

Stypendia

1. Stypendium stażowe w ramach projektu Advanced PhD "Centrum Studiów Zaawansowanych - rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w obszarach kluczowych w kontekście celów Strategii Europa 2020" współfinansowanego przez Unię Europejską

Dorobek naukowy, stypendia, granty, itp.

- w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego - Program Operacyjny Kapitał Ludzki. 3.09.2014-3.12.2014.
2. Stypendium w ramach projektu „InnoDoktorant – stypendia dla doktorantów, VI edycja”, realizowanego przez Departament Rozwoju Gospodarczego Urzędu Marszałkowskiego Województwa Pomorskiego, w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, Priorytetu VIII, Działania 8.2, Poddziałania 8.2.2: Regionalne Strategie Innowacji. 1.02.2014-31.07.2014.
 3. Stypendium w ramach projektu Inter PhD "Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii" współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego - Program Operacyjny Kapitał Ludzki. 1.10.2012-31.07.2013.
 4. Stypendium w ramach projektu Inter PhD "Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii" współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego - Program Operacyjny Kapitał Ludzki. 1.10.2010-31.07.2011.

Staż naukowy

1. Krajowy trzymiesięczny wyjazdowy staż badawczo-rozwojowy dla doktorantów w Zakładzie Immunoparazytologii, Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytetu Łódzkiego w Łodzi w okresie 3.09.2014-3.12.2014.