

Toksoplazmozise Karşı Geliştirilen Biyoteknolojik Tabanlı Rekombinant Protein Aşıları

Biotechnological Based Recombinant Protein Vaccines Developed Against Toxoplasmosis

✉ Tuğba Karakavuk^{1,2}, ✉ Ceren Gül^{1,2}, ✉ Muhammet Karakavuk^{1,3}, ✉ Aytül Gül^{1,4}, ✉ Sedef Erkunt Alak¹, ✉ Hüseyin Can^{1,5}, ✉ Cemal Ün^{1,5}, ✉ Mert Döşkaya^{1,6}, ✉ Adnan Yüksel Gürüz^{1,6}, ✉ Aysu Değirmenci Döşkaya^{1,6}

¹Ege Üniversitesi, Aşı Geliştirme, Uygulama ve Araştırma Merkezi, İzmir, Türkiye

²Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

³Ege Üniversitesi, Ödemiş Meslek Yüksek Okulu, Laborant ve Veteriner Sağlık Programı, İzmir, Türkiye

⁴Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir, Türkiye

⁵Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

⁶Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Cite this article as: Karakavuk T, Gül C, Karakavuk M, Gül A, Erkunt Alak S, Can H, Ün C, Döşkaya M, Gürüz AY, Değirmenci Döşkaya A. Biotechnological Based Recombinant Protein Vaccines Developed Against Toxoplasmosis. Türkiye Parazit Derg 2022;46(4):342-57.

ÖZ

Toxoplasma gondii (*T. gondii*); sıcakkanlı hayvanların çoğunu ve insanları enfekte edebilen, geniş konakçı yelpazesine sahip zorunlu hücre içi apikompleksan bir parazittir. Bu parazit ile dünya nüfusunun yaklaşık üçte biri enfektedir. Toksoplazmozis, immün sistemi sağlam bireylerde asemptomatik seyrederken, immün sistemi baskılanmış bireylerde ise ciddi klinik tablolara ve ölümlere yol açabilmektedir. Parazit, insanlara kedi dışkıyla kontamine su ve gıdaların tüketiminin yanı sıra çiğ veya az pişmiş hayvansal ürünlerle, konjenital enfeksiyon ve kan/organ nakliyle bulaşmaktadır. *T. gondii*, koyun, keçi gibi çiftlik hayvanlarında da sıklıkla saptanmaktadır. Koyun ve keçilerde parazit nedeniyle oluşan klinik tablolar ve abortuslar dünya çapında büyük ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Günümüzde, *T. gondii*'ye karşı sadece koyunlarda kullanılabilen Toxovax (MSD, Yeni Zelanda) ticari aşısı bulunmaktadır. Bu nedenle zararsız, kolay üretilen, parazitin neden olduğu kayıpların önüne geçilebilecek ve tüm canlılarda kullanılabilir yeni ilaçlar *T. gondii* aşısına ihtiyaç duyulmaktadır. İmmünoloji, moleküler biyoloji, genetik, biyoteknoloji ve proteomik alanlarındaki gelişmeler aşı çalışmalarına yeni bakış açıları kazandırmaktadır. *T. gondii*'ye karşı geliştirilen aşı çalışmaları, yeni antijenlerin *in vitro* taramalar ve biyoinformatik analizler kullanılarak keşfi, çeşitli ekspresyon sistemleri ve yeni adjuvant tiplerinin kullanımı ile hız kazanmıştır. Rekombinant protein aşıları biyoteknolojik aşılar olup çeşitli ekspresyon sistemlerinde hızlı ve kolay üretilmeleri, çok miktarda ve yüksek saflıkta ürün elde edilebilirliği, manipülasyon kolaylığı ve hem hücresel hem de humoral immün yanıtı uyabilmeleri nedeniyle toksoplazmozise yönelik yapılan aşı çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Biyoteknolojik yöntemler kullanılarak geliştirilmekte olan bu aşılar toksoplazmozise karşı koruyucu immün yanıt sağlamak için umut vaat etmektedir. Bu derlemede, parazitin karmaşık yaşam döngüsü, patogenezi ve konakta oluşturduğu humoral ve hücresel immün yanıtın yanında özellikle, parazite yönelik gerçekleştirilen rekombinant protein aşı çalışmaları hakkında genel bir bakış sunulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Toxoplasma gondii*, rekombinant protein aşıları, biyoteknoloji, immünizasyon

ABSTRACT

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) that can infect most warm-blooded animals and humans, is an obligate intracellular apicomplexan parasite with a wide host range. About one-third of the world's population is infected with this parasite. While toxoplasmosis progresses asymptotically in individuals with a strong immune system, it can cause serious clinical manifestations and death in immunocompromised individuals. The parasite is transmitted to humans through the consumption of water and food contaminated with cat feces, as well as raw or undercooked animal products, congenital infection and blood/organ transplantation. Additionally, *T. gondii* is often observed in farm animals such as sheep and goats. Clinical manifestations and abortions caused by *T. gondii* in sheep and goats lead to enormous economic loss worldwide. There is a commercial vaccine against *T. gondii*, called Toxovax (MSD, New Zealand) that can only be used in sheep. For these reasons, there is a need for innovative *T. gondii* vaccine that is harmless, easily produced, which can prevent losses and be used in all living things. Advances in immunology, molecular biology, genetic,



Geliş Tarihi/Received: 07.12.2021 Kabul Tarihi/Accepted: 01.06.2022

Yazar Adresi/Address for Correspondence: Aysu Değirmenci Döşkaya, Ege Üniversitesi, Aşı Geliştirme, Uygulama ve Araştırma Merkezi; Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

Tel/Phone: +90 535 435 63 68 **E-Posta/E-mail:** aysu.degirmenci.doskaya@ege.edu.tr **ORCID ID:** orcid.org/0000-0003-0363-9099

biotechnology and proteomics bring new perspectives to vaccine studies. Studies in innovative vaccine studies against *T. gondii* have accelerated with the discovery of new antigens by *in vitro* screenings, and bioinformatic analyzes, the use of various expression systems and new adjuvant types. Recombinant protein vaccines are biotechnological vaccines that are frequently preferred due to their rapid and easy production in various expression systems, availability of very and high purity products, ease of manipulation and stimulation of both cellular and humoral immune responses. Recombinant protein vaccines, developed by biotechnological methods, are promising tools for providing a protective immune response against toxoplasmosis. In this review, an overview of the parasite complex life cycle, its pathogenesis, humoral and cellular immune responses in the host, and recombinant protein vaccine studies developed against the parasite are presented.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, recombinant protein vaccines, biotechnology, immunization

GİRİŞ

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) toksoplazmozise neden olan, insanları ve hayvanları enfekte edebilen geniş konakçı yelpazesine sahip zorunlu hücre içi bir parazittir. Yaşam döngüsü içinde yer alan kesin konak kedi ve kedigillerde eşeyli üreme ile oluşan sporozoit, ara konaklarında eşeysiz üreme sonucu oluşan takizoit ve bradizoit olmak üzere üç formu bulunmaktadır (1). Takizoitler, hareket yeteneği yüksek aktif formlardır ve akut enfeksiyona neden olmaktadır. Yapılarında bulunan proteinler sayesinde konak hücreye girerek parazitofor vakuol (PV) oluşturmada ve konağın immün sisteminden de bu strateji ile korunabilmektedir (2). İmmün sistem baskısından dolayı PV içinde daha yavaş bölünen formlar olan bradizoitler ise kronik enfeksiyonda görülmektedir. Konak canlıda hiçbir belirti göstermeden aylarca hatta yıllarca yaşamını devam ettirebilmektedir (3).

Kedi ve kedigillerde eşeyli üreme sonucunda ookistler oluşur ve uygun koşullarda sporlanarak sporozoit form haline gelirler (4). Takizoitler enfeksiyondan sonra daha yavaş bölünebilen bradizoitlere farklılaşırlar (5). Enfeksiyon immün sistemi sağlam bireylerde asemptomatiktir. İmmün sistemi baskılanmış bireylerde ise ciddi komplikasyonlar görülebilmektedir (6). Bunların yanında toksoplazmozisin nöropsikiyatrik hastalıklar, depresyon ve intihar ile ilişkisi gösterilmiştir (7).

Parazit insanları etkilediği gibi koyun, keçi, domuz gibi çiftlik hayvanlarında da ciddi sorunlar oluşturmaktadır (8). Günümüzde yalnızca koyunlarda kullanımı olan bir aşı (Toxovax®, MSD hayvan sağlığı) mevcut olsa da oluşturduğu riskler nedeniyle insanlarda kullanılamamaktadır. Bu nedenle, insanlarda ve hayvanlarda hastalığın yayılımının önlenmesi ve hastalığın yarattığı klinik tabloların engellenebilmesi için güvenilir ve etkili bir aşıya ihtiyaç duyulmaktadır (9).

Rekombinant protein aşılarında patojene ait herhangi bir materyalin direkt kullanılmaması ve buna bağlı olarak enfektif formlara dönüşme riskinin bulunmaması, bu aşıları güvenli hale getirmektedir (10). Bunun yanında üretim prosesinde manipülasyon kolaylığı ve geleneksel aşılarla oranla düşük maliyetli üretilmeleri gibi avantajları da mevcuttur (11).

Bugüne dek yapılan aşı çalışmalarında, parazite ait uygun antijenik bölgelerin ve ekspresyon sistemlerinin seçilmemesi, aşı adaylarının düşük immün yanıt oluşturması gibi nedenlerden dolayı hastalığa karşı henüz klinik aşamada bir rekombinant protein aşısı bulunmamaktadır. Ancak gelişen teknolojinin yardımı ile yenilikçi yaklaşımlar, yeni antijen keşifleri, kombine üretim stratejilerinin kullanımı ve parazitin yaşam formlarında görülen stratejik proteinlerin seçimi, etkin rekombinant protein aşılarının geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda adjuvantlar ile birleştirilen aşı adaylarının güçlü immün yanıt oluşturması ve fare deneylerindeki hayatta kalma oranlarında görülen artışlar, yapılan rekombinant protein

aşılarının gelecekte toksoplazmozise karşı etkili ve güvenli olacağına dair olumlu bir bakış açısı sunmaktadır.

Toxoplasma gondii Genel Bilgi

Toxoplasma gondii ilk kez 1908 yılında tanımlanmıştır. Nicole ve Manceaux, *Leishmania* ve virüs çalışmaları sırasında kullandıkları *Ctenodactylus gundi* adlı kemirgende gerçekleştirdikleri deneyler sırasında paraziti ilk defa tespit etmişlerdir (12,13).

1950 yılında Türkiye'de ilk kez bir köpekten *T. gondii* izolasyonu Baran ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. İlk insan olgusu 1953 yılında Unat ve ark. tarafından bildirilmiştir. 1970'li yıllarda Türkiye'de parazit bir köpekten izole edilmiş ve daha sonra bir bebekte parazite rastlanmıştır. 1972 yılında Ekmen ve Altıntaş tarafından tespit edilen bu suş *T. gondii* Ankara suşu olarak adlandırılmıştır (14,15). 2020 yılında yapılan güncel çalışmada suşa ait tüm genom çalışılmış ve NCBI veritabanına *T. gondii* TR_01 ismi ile yüklenmiştir (16).

Morfoloji ve Yaşam Döngüsü

Toxoplasma gondii'nin yaşam döngüsü incelendiğinde akut enfeksiyona sebep olan takizoit, kronik enfeksiyona sebep olan bradizoit (doku kisti) ve sporlanmış ookistler içerisinde bulunan ve sporozoit adı verilen üç farklı formu bulunmaktadır (1).

Tüm çekirdekli hücreleri enfekte edebilen takizoitler hızlı bölünebilen ve hareket edebilen aktif bir formdur (6). Takizoitler hilal şeklinde olup 2x6 µm boyuta sahiptir. Takizoitlerin yapısında patogeneze başlıca rol oynayan konoid ile mikronem (MIC), roptri (ROP) ve yoğun granüller (GRA) proteinleri bulunmaktadır (3,17). Bu proteinler sayesinde konak hücreye girer ve kendilerini PV ile çevreleyerek ovalleşirler. Hücre içinde tekrarlayan endodiyogeni ile aseksüel çoğalma nedeniyle konak immün sisteminden korunabilmektedir (2).

Takizoitler enfeksiyondan yaklaşık 10-14 gün sonra daha yavaş bölünebilen bradizoitlere farklılaşmaktadırlar (3). Bu form konak dokularında, içinde yüzlerce bradizoit bulunan kistler oluşturarak uzun yıllar canlı kalabilmektedir (5). Kronik enfeksiyondan sorumlu olan doku kistlerinin etrafında konak hücreler bulunması nedeniyle immün sistem elemanlarından kaçabilmektedir. Bozulmamış doku kistleri hastalıkla ilişkili olmamakla birlikte konağın yaşamı boyunca enflamatuvar yanıtı neden olmadan varlığını sürdürebilmektedir. Fakat immün yetmezliği olan kişilerde doku kistlerinin yırtılması ile bradizoitler, tekrar takizoitlere dönüşerek hastalığın reaktivasyonuna neden olmaktadır (2,5).

Kesin konak olan kedi ve kedigillerin ince bağırsaklarında eşeyli üreme sonucunda oluşan ookistler dışkılama ile ortama bırakıldığında enfektif değildirler. Havalandırma ve sıcaklığa bağlı sporlanarak enfektif hale gelmekte ve birkaç ay boyunca çevrede canlı kalabilmektedir (4). Sporlanan ookistler içerisinde iki adet sporokist ve her sporokistte dört adet sporozoit olmak

üzere toplam sekiz adet sporozoit bulunmaktadır. Sporozoitler subterminal bir çekirdeğe sahiptir ve bol miktarda MIC, ROP ve amilopektin granülü bulundurmasıyla takizoite benzerlik göstermektedir (3).

Şekil 1'de görüldüğü gibi *T. gondii* iki yaşam döngüsüne sahiptir. Eşeyli döngü kedigillerin ince bağırsağında meydana gelirken, eşeysiz döngü insanların da dahil olduğu ara konaklarda ve kesin konak olan kedigillerde gerçekleşmektedir (6). Son konak kediler parazitin üç formundan herhangi biri ile enfekte olabilmekte ve ookistleri dışkı yolu ile çevreye yaymaktadır (18). İnsanlar ise doku kisti ile enfekte çiğ veya az pişmiş etlerin tüketimiyle, kedi dışkısı ile temasla ya da kedi dışkısında bulunan ookistlerin kontamine ettiği su ve sebze/ meyvelerin tüketimi ve bunların yanı sıra organ nakli, kan transfüzyonu ve konjenital geçiş yoluyla enfekte olabilmektedir (17).

Toksoplazmozis

Toksoplazmozis, immün sistemi sağlam olan bireylerde asemptomatik seyrederken bazı hastalarda servikal lenfadenopati, miyalji ve hafif grip benzeri semptomlara neden olabilmektedir (1). İmmün sistem yetmezliği olan bireylerde ise hastalığın daha ciddi semptomlarla seyrettiği bildirilmektedir. Ayrıca parazit, oküler ve konjenital toksoplazmozise neden olmaktadır (6). Gebelikte enfeksiyon ölü doğumlara ve abortlara, bebeklerde ise zeka geriliği, körlük, hidrosefali veya diğer doğumsal anomalilere neden olabilmektedir (19). Ayrıca, konjenital enfeksiyona rağmen normal doğan bebeklerde 30'lu yaşlarda toksoplazmik retinokoroidit oluşabilmektedir (20). Organ nakli alıcıları ve kanser hastaları gibi immün sistemi baskılanmış hastalarda birincil enfeksiyon veya tekrar aktivasyon ile ensefalit veya pnömöni gibi komplikasyonlara neden olabilmektedir (4,6). Bu ciddi klinik tabloların yanı sıra toksoplazmozis Alzheimer, bipolar bozukluk, şizofreni, obsesif kompulsif bozukluk, multipl skleroz ve epilepsi gibi nöropsikiyatrik hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Buna ek olarak, yapılan deneysel çalışmalarda toksoplazmozisin depresyon ve intihara neden olabileceği gösterilmektedir (7).

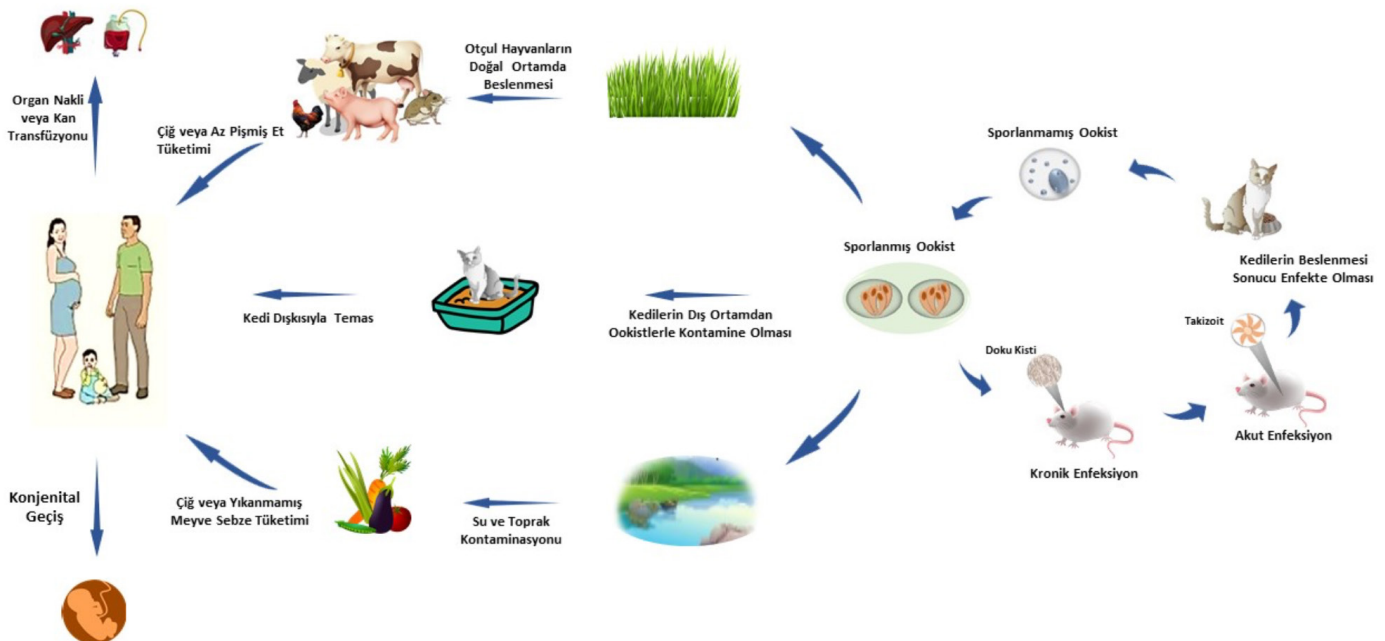
Yapılan diğer bir çalışmada *T. gondii* ile glioma riski arasında anlamlı pozitif bir ilişki gözlemlendiği belirtilmiştir (21).

Epidemiyoloji

Toxoplasma gondii dünyada oldukça yaygın olup enfeksiyonunun prevalansı üzerine yapılan epidemiyolojik çalışmalar dünya çapında farklılıklar göstermekle birlikte sosyal alışkanlıklar, hava koşulları, yaşam standartları ve coğrafik alan gibi farklı faktörlerin bu hastalığın prevalansını etkilediği bildirilmektedir (1). Afrika, Güneydoğu Asya'nın bazı kısımları ve Latin Amerika gibi gelişmekte olan veya az gelişmiş ülkelerde yüksek toksoplazmozis prevalans değerleri gözlenirken gelişmiş ülkelerde prevalansın düşük olduğu belirtilmektedir (22). 20. yüzyılda Orta Avrupa ülkelerinde seroprevalans değerleri %37-58 arasında değişirken Avusturalya ve Kuzey Afrika'da da benzer oranlar bildirilmiştir. Buna karşılık çoğu Latin Amerika ve Gine Körfezi'ndeki Batı Afrika ülkelerinde yüksek değerler gözlemlendiği bildirilmektedir (23). Güney Kore'de *T. gondii* prevalansı %1'in altındayken Brezilya'da bu oran %77'ye kadar ulaşmaktadır (24).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD) hastalık kontrol ve önleme merkezi raporlarına göre 2000'li yılların ortalarından sonlarına kadar toksoplazmozis ABD'de gıda kaynaklı hastalıklara bağlı ikinci en yaygın ölüm nedeni ve dördüncü hastaneye yatış nedeni (1). ABD'de yaşayan insanların %8-22'sinin enfekte olduğu ve Birleşik Krallıkta da benzer bir prevalansın olduğu belirtilmektedir (19). Dünya Sağlık Örgütü, Avrupa'da gıda yoluyla bulaşan hastalık yükünün %20'sinin *T. gondii*'den kaynaklandığını tahmin etmektedir (25). Yapılan bir çalışmadan elde edilen veriler Almanya'da yaşa bağlı olarak *T. gondii* enfeksiyon oranının %20 ile %77 arasında olduğunu ve bu durumun muhtemelen çiğ sosis ürünlerinin tüketimine bağlı olarak değiştiğini göstermektedir (26). Bir başka çalışmada ise Paris'te yaşayan kadınlarda çiğ ya da az pişmiş et tüketimine bağlı olarak Londra'da yaşayan kadınlara oranla daha yüksek oranda seropozitiflik saptanmıştır (3).

Dünya'da olduğu gibi Türkiye'de de geniş bir dağılım gösteren *T. gondii* seroprevalansının belirlenmesinde çeşitli illerde çalışmalar



Şekil 1. *Toxoplasma gondii*'nin yaşam döngüsü

yapılmıştır. 2004-2015 yılları arasında yapılan çalışmalarda seroprevalans değerleri %18 ile %52 arasında değişmektedir (27-29). 2000-2018 tarihleri arasında bölgesel olarak toplanan serum örnekleri incelendiğinde seropozitifliğin Ege Bölgesi'nde %30,5, İç Anadolu Bölgesi'nde %29,5, Marmara Bölgesi'nde %28,8, Karadeniz Bölgesi'nde %21,3 Akdeniz Bölgesi'nde %3 olduğu görülmüştür (14). Hastalığın yayılımdaki en büyük risk faktörünün çiğ veya az pişmiş etler ve iyi yıkanmamış sebze ve meyvelerin tüketimi olduğu saptanmaktadır. Büyük ekonomik kayıplara neden olan bu parazitin yarattığı sorunları azaltabilmek için koruyucu tedbirler ile etkili bir aşının kullanılması gerekmektedir (30).

Patogenez

Toxoplasma gondii konak hücreye giriş yapmak ve konak hücrede proteinlerin ekspresyonunu düzenlemek için MIC, ROP ve GRA dahil olmak üzere birçok protein salgılamaktadır. Konak hücreye ilk temas yüzey antijenleri tarafından yüzey reseptörlerinin tanınmasıyla başlamaktadır (31,32). Parazit konak canlıya ookist veya doku kisti formuyla girdikten sonra bu iki formdan serbestleşen bradizoit ve sporozoitler ince bağırsak lümenini geçerek enterosit veya lamina propriadaki hücreleri istila etmekte ve sonrasında takizoit formuna dönüşmektedir (3,33). Takizoitlerin yapısında bulunan ROP'ler konak hücrede takizoitin kendini PV ile çevreleyerek ovalleşmesini ve lizozomal enzimlerden korunmasını sağlarken GRA'lar vakuol içinde parazitin çoğalmasında görevlidir. Konak hücrenin sahip olduğu endolizozomal yol ve parazitin sahip olduğu çeşitli sinyal iletim yolları sayesinde parazit vakuol içinde yaşamını devam ettirebilmektedir (2,31). ROP'ler lokalizasyonlarına bağlı olarak ROP boyun proteinleri (RON) ve ROP proteinleri olarak iki alt sınıfa ayrılmaktadır (32). ROP2, ROP5 ve ROP8 gibi psödokinazların diğer proteinlerle etkileşime girerek *T. gondii* virülansında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (34). Takizoitlerin apikal ucunda bulunan MIC'ler ise istila sırasında hareketlilik ve bağlanma sağlayan çeşitli proteinlerin üretiminden sorumludur (35). Apikal bağlanma sırasında yüzeyde biriken MIC'lerden türetilen apikal membran antijeni (AMA1) yine bağlanma esnasında salgılanan RON'ler ile birleşmektedir (36). MIC2 proteini konak hücreye tutunmada ve parazit hareketliliğinde rol oynarken virülans ve konağa bağlanmada MIC1, MIC4 ve MIC6 proteinleri rol oynamaktadır (32). *T. gondii*'nin konak hücreden çıkışı MIC, RON ve ROP'lerin salgılanmasıyla artan kalsiyum seviyesine bağlı olarak gerçekleşmektedir (36). Bu proteinlere ek olarak BAG1 olarak da bilinen ısı şok proteini 30 (HSP30) ve HSP70 proteini gibi parazitin formuna özgü sentezlenen proteinler olduğu da bilinmektedir. BAG1 takizoitlerin bradizoitlere dönüşümünden sorumlu olan dolayısıyla paraziti çevreden gelebilecek tehlikelerden korumayı sağlayan bir proteindir (37). HSP70 proteini ise B ve yardımcı T-hücre (Th) yanıtlarının oluşmasını sağlayan, konak hücreyi öldürmeden önce takizoit formundan salgılanan bir proteindir (38). Parazitin her üç formunda ortak olarak bulunan proteinlerin toksoplazmozise karşı koruyucu bağışıklığı sağlayacak bir aşının geliştirilmesinde oldukça önemli olduğu belirtilmektedir (35,39).

Toksoplazmozise Karşı Gelişen İmmün Yanıt

Toxoplasma gondii'nin konağa bulaşması sonucu konak hücrede hem doğal hem de adaptif immün yanıt uyarımı gerçekleşmektedir. Bu uyarımın temelinde interlökin-12 (IL-12) ve interferon- γ (IFN- γ) üretimi yer almaktadır. Kimyasalların

yüksek seviyede üretimiyle patojenin yok edilmesini sağlayacak Th1 hücre yanıtı ve antijene özgü öldürücü yanıt oluşturacak CD8⁺ üretiminin artırılması sağlanır. *T. gondii* enfeksiyonu sırasında öncelikle, enfeksiyon bölgesinde bulunan hücrelerden kemokin salgılanmaktadır. Doğal immün yanıt hücreleri olan dentritik hücreler (DC), nötrofiller ve makrofajların yapısında bulunan toll benzeri reseptörler (*toll like receptor*) tarafından parazitin varlığı tespit edilerek ortamda IL-12 salgısı artırılmaktadır. CD4⁺, CD8⁺ ve doğal katil (NK) hücreler enfeksiyon bölgesine yönlendirilerek IFN- γ üretimi sağlanmaktadır. IL-12 ve IFN- γ , enfeksiyonun ilerlemesini engelleyerek konakçı hücrelerin parazitten korunmasında rol alan önemli sitokinlerdir (4,33).

Hücresel İmmün Yanıt

Parazit varlığının vücutta tespit edilmesinin ardından parazitin hücrede çoğalmasını engellemek amacıyla majör doku uyumluluk kompleksinin üretimi (MHC), parazite ait PV'nin oluşumunu engelleyecek genlerin ekspresyonu artırılır. Parazite ait yüzey antijenleri proteozomlar ile parçalanarak MHC-I ile hücre yüzeyinde sunulmakta ve CD8⁺ Th yüzeyinde bulunan Th reseptör ile MHC-I-Ag kompleksi oluşturulmaktadır. MHC-I ile CD8⁺ koreseptörü arasında güçlü bir kompleks sağlanmaktadır. Antijen sunan hücreler (APC) yüzeyinde yer alan CD80/86 molekülü ile CD8⁺ Th yüzeyinde bulunan CD28 reseptörü kompleks oluşturularak uyarımı artırmaktadır. CD8⁺ T perforin ve granzim salgıları ile APC üzerinde sitotoksik etki oluşturulmaktadır. Ayrıca, CD8⁺ Th'leri IFN- γ salgılayarak APC'den indüklenmiş nitrik oksit sentetaz salgısı ile hedef organizmanın ölümünde rol oynamaktadır (40).

Hücresel immün yanıt gelişiminde diğer bir yolak olarak patojene ait antijenler, APC tarafından peptitlerine ayrılırlar ve MHC II reseptörlerine bağlanıp APC yüzeyine iletilerek CD4⁺ T lenfositlerine sunulmaktadır. CD4⁺ T lenfositlerinin aktivasyonu CD3 koreseptörü ile gerçekleşmektedir. Bu aktivasyon, CD4⁺ Th yüzeyinde bulunan CD28 ve CD40L reseptörlerinin APC yüzeyinde yer alan CD80/86 ile CD40 reseptörlerinin birleşmesi sonucunda artırılmaktadır. MHC II-antijen kompleksi oluşumuyla APC'den IL-12 salgılanarak Th0 hücrelerinin Th1 hücrelerine dönüşümü sağlanmaktadır. Th1 hücrelerinin aktivasyonu, bu hücrelerden IFN- γ üretilerek NK hücrelerinin ve makrofajların üretimi ile hücresel immün yanıt oluşturulur. Makrofajlardan IL-12 salgılanmasıyla Th1 hücreleri miktar olarak artırılarak hücresel yanıtın güçlendirilmesi sağlanmaktadır (41,42). Aynı zamanda CD4⁺ hücreleri B lenfositleri uyararak humoral immün yanıtın oluşmasını sağlamaktadır (33).

Humoral İmmün Yanıt

Toxoplasma gondii antijenleri antijen sunan hücreler tarafından alınıp işlenerek MHC-II ile hücre yüzeyinde CD4⁺ Th'lere sunulmaktadır. CD4⁺ T hücreleri B lenfositlerini aktif hale getirerek plazmositlerin oluşumunu sağlamaktadır. *T. gondii*'nin neden olduğu enfeksiyona karşı gelişen humoral immün yanıtta görev alan plazma hücreleri IgM, IgG, IgA ve IgE üretimi gerçekleştirmektedir. Akut enfeksiyon sırasında IgM antikorunun yanında IgA ve IgE artışının da olduğu bildirilmektedir. Enfeksiyondan yaklaşık üç hafta sonra IgG antikorları ortaya çıkmaktadır. Üretilen antikorlar sayesinde parazitin konak hücrelere bağlanmasının engellenmesi ve klasik kompleman sistemin aktivasyonu sağlanmaktadır (4,40).

Toxoplasma gondii Genetik Çeşitliliğinin Aşı Çalışmalarındaki Önemi

Parazit, dünya üzerinde farklı coğrafik bölgelerde çeşitli tiplerde görülmektedir (43). *T. gondii* ile ilgili yapılan genetik çalışmalarda parazite ait soylar Tip 1, Tip 2, Tip 3 ve atipik olarak sınıflandırılmıştır (14). Sınıflandırmada genetik olarak birbirlerine yakın olan bu tiplerin patojenitelerinin birbirinden farklı olduğu gösterilmiştir. Farelerde yapılan deneylerde Tip 1 suşların tek bir canlı organizma varlığında dahi öldürücü olduğu görülmüştür. Tip 2 ve 3 suşlar Tip 1'e oranla daha az patojeniktir ve kronik enfeksiyon oluştururlar (4). Tip 1 suşlar ile enfekte olan konakçı immün sisteminde DC ve CD8⁺ Th uyarısının az olduğu, Tip 2 suşlar ile oluşan immün sistem tepkilerinde ise bu hücrelerde güçlü yanıtlar oluştuğu bildirilmektedir (44). *T. gondii*'ye ait 3 suş arasındaki bu farklılıklar yanında konakta akut ve kronik enfeksiyon sırasında oluşan patolojik farklılıklar, yoğun granül ve ROP salgı proteinlerinin varlığı ve ekspresyon düzeylerindeki değişimlerden kaynaklandığı bildirilmektedir. Atipik suşlar ile ilgili ise henüz çok fazla bilgi bulunmamaktadır (43). Tip 1, Tip 2 ve Tip 3 suşlar, Kuzey Amerika ve Avrupa'da yaygın olarak gözlemlenirken Güney Amerika'da ise başta atipik ve Tip 2 suşları yaygındır (45). Yapılan diğer çalışmalarda ise konakçının herhangi bir suş ile enfekte olması bir başka suşla tekrar enfekte olarak süper enfekte olabileceğini göstermektedir. Bu durum, konakçı immün sisteminin parazite ait farklı suşlar ile enfekte olma durumunda koruma sağlamadığını ve parazitin konakçı immün yanıtından kaçmada farklı stratejiler geliştirdiğini açıkça göstermektedir (4). *T. gondii*'ye ait karmaşık yaşam döngüsünün anlaşılmasında suşların genotiplendirilmesi büyük önem taşıdığı yapılan çalışmalarda açıkça görülmektedir (46).

Rekombinant Protein Aşıları

Rekombinant protein aşıları, koruyucu immün yanıt uyarmak amacıyla enfeksiyona neden olan patojenin bir bölgesinin biyoteknolojik olarak üretilip aşı antijeni olarak kullanıldığı aşılardır. Günümüzde çeşitli patojenlere karşı geliştirilen ve geliştirilmekte olan aşılar da yüksek saflıkta rekombinant proteinler kullanılmaktadır. Rekombinant protein biyoprosesinde patojene ait antijenik gen bölgelerinin izole edilerek gen düzeyinde düzenlemeleri yapılmakta ve ardından patojenik olmayan canlılarda (bakteri, maya, böcek ve memeli hücreleri) protein ekspresyonu gerçekleştirilmektedir (47). Gen düzeyinde yapılan düzenlemeler gibi ekspresyon sistemlerinin seçimi de aşı çalışmalarında büyük önem taşımaktadır. Ekspresyon sistemi seçiminde hedef proteinin biyokimyasal özellikleri, hücre içinde salgılanma şekli ve yeri, ekspresyon seviyesi, post translasyonel modifikasyonlar ve proteolitik bozunuma dayanıklılığı gibi birçok faktör rol almaktadır (48). Bakteriyel ekspresyon sistemleri, heterolog proteinlerin üretiminde en çok kullanılan sistemlerden biridir. Hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde hızlı ve kolay üretilmeleri, yüksek ekspresyon seviyelerine sahip olmaları ve genetik manipülasyonlarının kolay olması gibi pek çok avantaj bu sistemlerin tercih edilme nedenlerindedir (49). Protein verimliliğinin artırılmasına yönelik yapılan çalışmalarda, maya ekspresyon sistemlerinin kullanımı büyük önem taşımaktadır. Mayalar, hem manipülasyon kolaylığı sağlamaları hem de ökaryotik organizmalar olmaları sebebiyle rekombinant proteinlerin üretimleri için uygun sistemlerdir. Yapılarında bulunan glikozilasyon ve fosforilasyon yolları yüksek protein verimliliği sağlamaktadır. En çok kullanılan maya

olan *Saccharomyces cerevisiae*'de protein üretim verimliliğinin yollar üzerinde gerçekleştirilebilecek genetik manipülasyonlar ile artırılabilirliğini bildirilmektedir (50). Böcek hücre kültürü sistemleri içinde en çok kullanılan vektör sistemi bakulovirüstür. Böcek ekspresyon sistemlerinde gerçekleşen translasyon sonrası modifikasyonlar ve doğru protein katlanmalarının memeli hücrelerine yakın olması bu sistemlerin kullanılabilirliğini artırmaktadır. Ancak, maliyetlerinin yüksek olması ve üretim zorluğu nedeniyle bakteri ve maya ekspresyon sistemlerine oranla daha az tercih edildiği bildirilmektedir (49). Translasyon sonrası modifikasyonların, glikozilasyon ve fosforilasyon mekanizmalarının doğru bir şekilde gerçekleştiği proteinlerin elde edilmesi için ise yüksek üretim sağlanabilen memeli ekspresyon sistemleri kullanılmaktadır. Bu sistemlerde de zayıf protein üretimi ve maliyetlerinin yüksek olması gibi nedenlerden dolayı kullanım zorlukları görülmektedir (48,49).

Günümüzde kullanımı devam eden ve rekombinant protein teknolojisi ile üretilen ilk aşı Hepatit B'ye karşı geliştirilmiştir. Hepatit B'ye karşı geliştirilen bu aşı yüksek immünojenik özellikte olan virüse ait yüzey antijeninin (HBsAg) maya hücrelerinde (*S. cerevisiae*) ekspresyonu ile oluşturulmuştur (11,48). Rekombinant protein teknolojisi ile oluşturulan diğer bir aşı insan papilloma virüsüne (HPV) karşı geliştirilmiştir. Günümüzde, virüs benzeri partiküller (VLP) kullanılarak hazırlanmış, maya ve böcek hücrelerinde protein ekspresyonları gerçekleştirilmiş iki adet HPV aşısı bulunmaktadır (11,51).

Rekombinant protein aşılarının diğer aşı teknolojilerine göre çeşitli avantajları vardır. Enfeksiyona neden olan patojene ait herhangi bir materyalin direkt kullanılmaması ve saflaştırma işlemlerinde kontaminasyon gerçekleşme ihtimalinin düşük olması en önemli avantajlardandır. Bunun yanında enaktif formlara dönüşme risklerinin az olması da bu aşıları güvenli hale getirmektedir (10). Ayrıca, geleneksel aşılarla oranla rekombinant protein aşılarının üretim maliyetleri oldukça düşüktür (11). Üretim aşamasında uygun promotörlerin kullanımı ve proteinin salgılanması sırasında kullanılan sinyal dizilerinin eklenmesi gibi düzenlenmeler sayesinde yüksek miktarda ürün elde edilebilmektedir (10,48). Bunların yanında, rekombinant protein aşılarının dezavantajlarının bulunduğu noktalar da bulunmaktadır. Konak hücrede hedef proteinin proteolitik stabilitesinin korunma güçlüğü ve translasyon sonrası modifikasyonların doğru şekilde gerçekleşmeme riskleri önemli dezavantajları arasındadır. Ayrıca, oluşturulan rekombinant proteinin tek başına güçlü bir immün yanıt oluşturamaması nedeniyle, protein ile birlikte çoğunlukla kimyasal yapıda adjuvantların kullanımına gerek duyulmaktadır (47).

Rekombinant Protein Aşılarında Kullanılan Adjuvantlar

Aşılar ile oluşturulmak istenen kalıcı ve güçlü immün yanıtın elde edilmesi amacıyla kullanılan adjuvantlar, rekombinant protein aşılarının önemli biyolojik bileşenleridir (52). Geleneksel aşılar da yüksek düzeyde immün yanıt oluşturmaları nedeniyle yeni nesil aşılarla oranla daha az adjuvant kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak, yeni nesil aşılar da gen düzeyinde yapılan manipülasyonlar sonucu yüksek saflıkta ürün elde edilmesi ve buna bağlı olarak aşılama sonucu hedef canlıda güçlü bir uyarım elde edilmemesi için adjuvant kullanımına olan ihtiyaç artmaktadır (53). Adjuvantlar, bağışıklık sisteminde yer alan antijen sunan hücreleri uyarak adaptif bağışıklığın etkin çalışmasını sağlamaktadır. Bu sayede

CD4⁺ T yardımcı hücrelerinin aktivitesini artırılmaktadır. Uyarılan Th1 hücreleri, bellek oluşumundan ve antijene spesifik antikor üretiminden sorumlu B-hücrelerin ve CD8⁺ Th'lerinin aktivitesinin artırılmasını sağlamaktadır. Bu sayede, aşılama sonucu yüksek immün yanıt elde edilmesi ve bellek oluşumu hedeflenmektedir (54).

Aşı çalışmalarında kullanılacak antijen, aşının uygulanma şekli ve oluşabilecek olası yan etkiler adjuvant seçiminde önemli faktörlerdir. Genellikle, adjuvantların güçlü immün yanıt oluşturmaları, biyolojik olarak parçalanabilir yapıda olmaları ve raf ömürlerinin uzun olması istenmektedir (55). Günümüzde aşı çalışmalarında tasarım stratejisine bağlı olarak değişen ve yaygın olarak kullanılan adjuvant tipleri ve oluşturduğu immün yanıtlar Tablo 1'de özetlenmiştir.

Toxoplasma gondii'ye Karşı Geliştirilmiş Rekombinant Protein Aşları

Parazitin hem insan hem de hayvan sağlığı üzerinde oluşturduğu sorunlar nedeniyle ülkeler ekonomik olarak etkilenmektedir. Günümüzde yalnızca koyunlarda yaşanan ölü doğumları önlemeye yönelik canlı zayıflatılmış bir aşı (Toxovax®, MSD Hayvan sağlığı) bulunmaktadır (9). Ancak, ticari olarak kullanılan aşının virülan suşlara dönüş riski, raf ömrünün kısa olması gibi birçok olumsuz durum vardır. Geleneksel aşılarla oranla yeni nesil aşıların güvenilir olmaları, üretimlerinin kolay ve düşük maliyet ile gerçekleştirilmeleri nedeniyle rekombinant protein aşları son yıllarda büyük bir değer kazanmıştır. Aşılarla kullanılacak yeni antijenlerin keşfi ve tasarım aşamalarında stratejik bölgelerin manipülasyonu aşı çalışmalarında önemli bir yere sahiptir.

Gelişen teknoloji ile adjuvant kullanımının çeşitlendirilmesi ve kombine üretim stratejilerinin kullanımıyla rekombinant protein aşı çalışmalarında karşılaşılan güçlükler azaltılmaya çalışılmaktadır. Son yıllarda, *T. gondii*'nin patogeneğinde rol oynayan proteinlerin seçilmesi, uygun ekspresyon sistemlerinin tercih edilmesi sonucunda toksoplazmozise yönelik aşı

çalışmaları da Tablo 2'de gösterildiği gibi hız kazanmıştır. *T. gondii*'ye karşı geliştirilen rekombinant protein aşı çalışmalarında parazite ait SAG proteinleri başta olmak üzere GRA, BAG, SRS, MIC ve çeşitli ROP proteinleri aşı adayı olarak kullanılmıştır. Bunların içinde en sık kullanılan antijenler SAG1, GRA1, ROP2, ROP18 olup, bu proteinlerin daha çok parazitin patogeneğinde konakçı yüzey reseptörlerinin tanınması, konak hücre lizozomal enzimlerinin korunma ve takizoitlerin PV içinde çoğalması gibi önemli rolleri bulunmaktadır. Bu çalışmalara örnek olarak, *T. gondii*'ye ait ROP13 antijenik bölgesi kullanılarak yapılan bir aşı çalışmasında bakulovirüste protein ekspresyonu gerçekleştirilmiş ve çalışma sonucunda hayatta kalma zamanında uzama gözlemlenmiştir (135). Yapılan çalışmalarda ekspresyon sistemi olarak bakteri, maya, böcek ve memeli sistemleri seçilmiştir. Bunların içinde heterolog proteinlerin üretiminde bu sistemlerin kullanılabilirliğinin en büyük sebepleri standardizasyonlarının ve manipülasyonlarının kolay, üretim maliyetlerinin düşük, ve hızlı sistemler olmasıdır. Parazite ait önemli salgı proteinlerinden biri olan SAG1 proteini ile virüs benzeri partikül (VLP) kombinasyonu kullanılan diğer bir çalışmada Sf9 böcek hücrelerinde protein eksprese edilmiş ve aşılama sonucunda güçlü bir immün yanıt elde edilerek hayatta kalma süresinde uzama sağlanmıştır (137). Aşı çalışmalarında mineral tuzları, lipid partiküller, immünoestimülator adjuvantlar, mikropartikül adjuvantlar ve mukozal adjuvant tipleri kullanılmıştır. Diğer bir örnek çalışmada ise MIC3, ROP8 ve SAG1 proteinleri Freund ve CaPNs adjuvantları ile birleştirilerek bakteriyel sistemde eksprese edilmiştir. Aşılama sonucunda immün yanıtta güçlü bir uyarılma gerçekleşmiş ve korunma zamanında uzama gözlemlenmiştir (142). Aşı çalışmalarında uygulama yolu olarak ise daha çok subkütan (S.C., deri altına) yol seçilmiş olup intramusküler (I.M., kas içine), intranasal (I.N., burun içine) ve intraperitoneal (I.P., periton içine) uygulama yolları da oldukça sık kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde yıllar içinde en kuvvetli immün yanıt ve/veya korunmanın SAG ve GRA antijenleri ile elde edildiği görülmektedir. İlgi çekici ve yenilikçi araştırmalardan bir diğeri SAG1, AMA1, ROP2 ve GRA4 proteinlerinin biyoinformatik yöntemlerle T ve B hücre epitoplalarının tahmin edilmesiyle MHC moleküllerine bağlanma yeteneklerinin tespitine dayanmaktadır. Bu multimerik aşı çalışmasında proteinlerin PLG mikropartikül adjuvantı ile kullanımı sonucu kontrollere oranla yüksek düzeyde Th1 yanıt, spesifik antikor titreri, IFN- γ ve IL-2 seviyelerinde artış ve hayatta kalma oranlarında ciddi uzamalar sağlanmıştır (124). Son olarak, yakın zamanda yapılan güncel bir çalışmada ise takizoit yüzeyinde bulunan *T. gondii* ribozomal protein P2 (TgRPP2) aşı adayı olarak seçilmiştir. İlgili protein prokaryotik ekspresyon sisteminde eksprese edilerek çeşitli saflaştırma işlemlerinin ardından farelere düşükleri. Aşılama sonucunda farelerde *in vivo* deneyler ile yüksek antikor seviyeleri, sitokin ve MHC üretimleri saptanmıştır. Bu moleküllerin üretimi sayesinde farelerde hayatta kalma seviyelerinde ciddi uzamalar gözlemlenmiştir. Sonuçlara bakıldığında TgRPP2 aşılmasının toksoplazmoz için potansiyel bir aşı adayı olduğu bildirilmektedir (144).

SONUÇ

Toxoplasma gondii enfeksiyonu sonucunda hem hayvanlarda hem de insanlarda yaşamı zorlaştıran ciddi sağlık sorunları ve ekonomik kayıplar gözlemlenmektedir.

Tablo 1. Rekombinant protein aşı çalışmalarında yaygın olarak kullanılan adjuvantlar

Adjuvant	İçerik	Oluşturduğu immün yanıt
Alüminyum hidroksit Alüminyum fosfat Kalsiyum fosfat	Mineral tuzları	B ve Th2 hücre yanıtları Zayıf Th1 hücre yanıtı
Emülsiyonlar (MF59, Freund, Montanide, vb.) Lipozomlar Virozomlar	Lipid partiküller	Güçlü B ve Th1 hücre yanıtları
MPL (Monofosforil lipid A) CpG ODN Saponinler Sitokinler (IL-2, IL-12, vb.)	İmmünoestimülator adjuvantlar	Th1, CD8 ⁺ T-hücreleri
Virüs benzeri partiküller (VLP) PLG (polilaktideoglikolikolit) mikropartikülleri	Mikropartikül adjuvantlar	Th1, CD8 ⁺ T-hücreleri
Kitosan Kolera toksini Mutant toksinler Polimerize lipozomlar	Mukozal adjuvantlar	Th1 ve B-hücre yanıtları

Tablo 2. Toksoplazmozise karşı yapılan rekombinant protein aşı çalışmaları

Aşı adayları	Ekspresyon sistemi	Adjuvant	Aşılama yolu	Sonuçlar	Yazar	Yılı
rSAG1 proteini	<i>E. coli</i>	Alum	I.P.	İmmün yanıtta uyarılma, korunma süresinde uzama	Petersen ve ark. (56)	1998
rSAG1 proteini	<i>E. coli</i>	IL-12	I.P.	İmmün yanıtta uyarılma, beyin kistlerinde %40 azalma	Letscher ve ark. (57)	1998
rGRA1 proteini	<i>M. bovis</i>	Freund	I.P.	İmmün yanıtta uyarılma, korunma süresinde uzama	Supply ve ark. (58)	1999
rSAG1 proteini	<i>P. pastoris</i>	SBAS1	S.C.	Konjenital bulaştan %48 koruma	Haumont ve ark. (59)	2000
rSAG1, rSAG2, rSAG3, rSRS1, rP54 proteinleri	<i>E. coli</i>	Freund	I.P.	Korunma süresinde %17 uzama	Mishima ve ark. (60)	2001
rSAG1 proteini	<i>E. coli</i>	-	S.C.	İmmün yanıtta uyarılma, bulaşta azalma	Letscher-Bru ve ark. (61)	2003
GRA4, rROP2 proteinleri ve karışımı	<i>E. coli</i>	Alum	I.M.	GRA4 ile beyin kistinde azalma	Martin ve ark. (62)	2004
rROP2-Hsp83 füzyon proteini	<i>E. coli</i>	-	Ayak tabanı	İmmün yanıtta uyarılma, korunma süresinde uzama	Echeverria ve ark. (63)	2006
rGRA2, rGRA6 proteinleri ve karışimleri	<i>E. coli</i>	MPL	S.C.	GRA2 beyin kistinde %69,8 azalma, rGRA2+ rGRA6 beyin kistinde %48,2 azalma	Golkar ve ark. (64)	2007
rSAG1-GRA2 füzyon proteini	<i>P. pastoris</i>	Freund	S.C.	İmmün yanıtta uyarılma, korunma süresinde uzama	Zhou ve ark. (65)	2007
rGRA1 proteini	<i>E. coli</i>	Provac	I.P.	İmmün yanıtta uyarılma, hayatta kalma sürelerinde iki kat uzama	Döşkaya ve ark. (66)	2007
rROP2 proteini	<i>M. bovis</i>	-	S.C.	İmmün yanıtta uyarılma, korunma süresinde uzama	Wang ve ark. (67)	2007
Serin proteaz inhibitörü-1 proteini	<i>E. coli</i>	Alum	I.M.	İmmün sistemde uyarılma, beyin kistlerinde azalma, korunma süresinde %40 uzama	Cuppari ve ark. (68)	2008
rROP2+ rGRA5+ rGRA7	<i>E. coli</i>	Kolera toksini	I.N.	İmmün uyarılma, beyin kist oluşumunda %58,3 azalma	Igarashi ve ark. (69)	2008
rSAG1, rGRA1, rMAG1 epitoplari ve karışimleri	<i>E. coli</i>	Freund	S.C./I.P.	Beyin kistlerinde %89 azalma, immün uyarılma	Gatkowska ve ark. (70)	2008
rROP2+rROP4	<i>E. coli</i>	Freund	S.C.	İmmün uyarılma, beyin kistlerinde %46 azalma	Dziadek ve ark. (71)	2009
rSAG1 proteini	Bakulovirüs	-	I.M.	Korunma süresinde %50 uzama, immün yanıtta uyarılma	Fang ve ark. (72)	2010
rSAG2 proteini	Rekombinant influenza ve adenovirüs	-	I.N.	Beyin kistlerinde %85 azalma	Machado ve ark. (73)	2010
rRON4 proteini	Schneider böcek hücreleri	Freund	I.M.	İmmün yanıtta uyarılma	Rashid ve ark. (74)	2011
rROP2, rGRA4 proteinleri ve karışımı	<i>E. coli</i>	-	I.M.	Beyin kistlerinde %63-66 azalma	Sánchez ve ark. (75)	2011
rROP2+rROP4, rGRA4 ve rROP2+rROP4+ rSAG1	<i>E. coli</i>	Freund	S.C.	rROP2+rROP4+rGRA4 beyin kistlerinde %59 azalma; rROP2 + rROP4 + rSAG1 ile %90 beyin kistlerinde azalma	Dziadek ve ark. (76)	2011
rSAG1, rGRA1, rGRA4 epitop peptitleri	-	Freund	I.M.	Korunma süresinde uzama, immün yanıt uyarımı	Wang ve ark. (77)	2011

Tablo 2. Devamı

Aşı adayları	Ekspresyon sistemi	Adjuvant	Aşılama yolu	Sonuçlar	Yazar	Yılı
rROP2+rROP4+ rGRA4 ve rROP2+rROP4+ rSAG1	<i>E. coli</i>	Freund	S.C.	rROP2 + rROP4 + rGRA4 ile beyin kistlerinde %84 azalma, rROP2+ rROP4 + rSAG1 ile %77 beyin kistlerinde azalma	Dziadek ve ark. (78)	2012
rGRA4 proteini	Tütün bitkisi hücreleri (<i>Nicotiana tabacum</i>)	-	P.O.	Güçlü immün yanıt uyarımı, korunma süresinde %59 uzama	Del ve ark. (79)	2012
rGRA7 proteini	<i>E. coli</i>	Freund	S.C./I.M.	DNA aşısı + protein aşısı uygulama; korunma süresinde %60 uzama, immün yanıtta uyarılma	Min ve ark. (80)	2012
rROP5+rSAG1	<i>E. coli</i>	Freund	S.C.	İmmün uyarılma ve korunma süresinde uzama	Zheng ve ark. (81)	2013
rROP18 proteini	<i>E. coli</i>	Ginsenoside Re	S.C.	İmmün uyarılma ve korunma süresinde uzama	Qu ve ark. (82)	2013
rSiklofilin proteini	<i>M. bovis</i>	-	P.O./I.V.	İmmün uyarılma ve hayatta kalma süresinde %17 uzama	Yu ve ark. (83)	2013
rDisülfid izomeraz proteini (TgPDI)	<i>E. coli</i>	-	I.N.	İmmün yanıtta uyarılma, korunma süresinde %31 uzama	Wang ve ark. (84)	2013
rAktin proteini (TgACT)	<i>E. coli</i>	-	I.N.	Karaciğer kistlerinde %60,05, beyin kistlerinde %49,75 azalma ve korunma süresinde %50 uzama	Yin ve ark. (85)	2013
rSAG1 proteini	<i>E. coli</i>	PLG mikropartikül/ Vet L-10	I.P.	PLG mikropartikül aşısı ile yüksek immün yanıt uyarımı, korunma süresinde %80 uzama	Chuang ve ark. (86)	2013
rSAG1/2 proteini	<i>E. coli</i>	PLG mikropartikül/ Vet L-10	I.P.	PLG mikropartikül aşısı ile immün yanıtta uyarılma, korunma süresinde %83 uzama	Chuang ve ark. (87)	2013
rSAG1 proteini	Rekombinant adenovirüs	-	S.C.	Modifiye SAG1 Ankara virüsüyle rSAG1 aşısı ile korunma süresinde uzaman ve beyin kistlerinde azalma	Mendes ve ark. (88)	2013
TgRACK-1 (rC kinaz 1'i aktive eden reseptör proteini)	<i>E. coli</i>	-	I.N.	İmmün yanıtta uyarılma ve korunma süresinde %45 uzama	Wang ve ark. (89)	2014
rROP17 proteini	<i>E. coli</i>	-	I.N.	İmmün yanıtta uyarılma ve korunma süresinde %50 uzama	Wang ve ark. (90)	2014
rSAG2 proteini	<i>E. coli</i>	PLG mikropartikül/ Vet L-10	I.P.	PLG mikropartiküllü aşıda immün yanıt uyarımı daha fazladır, korunma süresinde %87 uzama	Chuang ve Yang (91)	2014
rProfilin proteini (rTgPF)	<i>E. coli</i>	Oligomannoz kaplı lipozom (OML)	S.C.	İmmün uyarılma ve korunma süresinde %41,7 uzama	Tanaka ve ark. (92)	2014
rBAG1, rSRS4, rSRS9 proteinleri	<i>E. coli</i>	rMinding proteini/ Freund	I.M.	rMindingin adjuvant olarak kullanımı, immün yanıtta uyarılma, korunma süresinde uzama	Sun ve ark. (93)	2014
AMA1, RON2, RON4	-	-	I.N.	AMA1 + RON2 ile korunma süresinde %70 uzama	Zhang ve ark. (94)	2015

Tablo 2. Devamı

Aşı adayları	Ekspresyon sistemi	Adjuvant	Aşılama yolu	Sonuçlar	Yazar	Yılı
rSAG1,rMAG1,rGRA7(SMG) epitoplari	<i>E. coli</i>	GERBU	S.C.	Beyin kistlerinde azalma, immün yanıtta uyarılma	Wagner ve ark. (95)	2015
rSGA5A	-	-	I.M.	İmmün uyarılma, beyin kistinde %35 azalma	Lu ve ark. (96)	2015
PLG ile kapsüllenmiş TgROP18, TgROP38	<i>E. coli</i>	PLG	S.C.	İmmün yanıtta uyarılma, beyin kistinde %81,3 azalma	Xu ve ark. (97)	2015
chLiHsp83-SAG1	<i>N. tabacum</i>	-	P.O.	rSAG1'e özgü antikorlarda artışa bağlı olarak beyin kistlerinde %57 azalma	Albarracín ve ark. (98)	2015
rTgPI-1	<i>E. coli</i>	Alum, CpG-ODN	I.D./I.N.	Humoral immün yanıtta uyarılma, beyin kistinde %62 azalma	Sánchez ve ark. (99)	2015
rROP1, pVAX-ROP1	<i>E. coli</i>	Freund	I.M./S.C.	Humoral immün yanıt uyarımı, akut toksoplazmoza karşı rROP1 aşısı ile %100 koruma	Sonaimuthu ve ark. (100)	2016
rTgPGAM2	<i>E. coli</i>	-	I.N.	Korunma süresinde %70 uzama, beyin ve karaciğer takizoitlerinde sırasıyla %57 ve %69 azalma, yüksek IgG1, IFN- γ , IL-2, IL-4 seviyeleri	Wang ve ark. (101)	2016
rCDPK6 ve rROP18	<i>E. coli</i>	PLG	S.C.	Güçlü immün yanıt uyarımı, yüksek IFN- γ ve IL-2 ile Th1 yanıtı, korunma süresinde uzama, beyin kistinde azalma	Zhang ve ark. (102)	2016
rTgMDH	<i>E. coli</i>	-	I.N.	Güçlü antikor titresi, IL-2 ve IFN- γ seviyelerinde artış, korunma süresinde %47 uzama, karaciğer ve beyinde parazit yükünde %58 ve %42 azalma	Liu ve ark. (103)	2016
rBAG1 ve rGRA1	<i>E. coli</i>	Alum	I.P.	Güçlü IgG yanıtı, yüksek IgG2a yanıtı, CD8 ⁺ T lenfosit oranında iki kat artış, beyin kistinde %10,5 azalma	Gedik ve ark. (104)	2016
rTgADF	<i>E. coli</i>	-	I.N.	Yüksek IgA ve IgG titresi, IL-2 ve IFN- γ artışı, korunma zamanında %36,6 uzama, parazit yükünde karaciğer ve beyinde sırasıyla %67,66 ve %51,01 azalma	Liu ve ark. (105)	2016
Et-rTgSAG1	<i>E. coli</i>	-	I.P./P.O.	TgSAG1'e özgü Th1-dominant immün yanıt, korunma süresinde uzama	Tang ve ark. (106)	2016
rGRA2 ve rGRA5	<i>E. coli</i>	Freund	S.C.	İmmün yanıtta uyarılma, yüksek IgG üretimi, IFN- γ , IL-2, IL-4 ve IL-10 artışı, akut enfeksiyona karşı kısmi koruma	Ching ve ark. (107)	2016
rSAG1 ve rGRA2	<i>E. coli</i>	PLGA	S.C.	Yüksek IFN- γ /IL-10 oranı ve daha yüksek miktarda IgG antikorlarına bağlı olarak korunmada uzama	Allahyari ve ark. (108)	2016
rSAG1, rSRS52A, rSAG2C, rGRA6 ve rGRA5 epitoplari	<i>E. coli</i>	GLA-SE	S.C.	İmmün yanıtta uyarılma, beyin kistinde %30 azalma	El Bissati ve ark. (109)	2016

Tablo 2. Devamı

Aşı adayları	Ekspresyon sistemi	Adjuvant	Aşılama yolu	Sonuçlar	Yazar	Yılı
rTgENO2 ve rTgTrxLp	<i>E. coli</i>	Freund	S.C.	Yüksek IgG antikorları, IFN- γ , IL-2, CD4 ⁺ ve CD8 ⁺ T-hücreleri, güçlü immün yanıt, korunma zamanında uzama, beyin kistinde %69,77, %58,14 ve %20,93 azalma	Wang ve ark. (110)	2016
IMC-influenza M1 nrVLP aşısı	Sf9 böcek hücreleri	-	I.N.	Güçlü IgG, IgG1 ve IgG2a antikor yanıtları ve dışkıda IgA antikor yanıt artışı, %100 hayatta kalma, beyin kistinde azalma	Lee ve ark. (111)	2016
TgPrx3-GST	<i>E. coli</i>	-	S.C.	İmmün yanıtta uyarılma, hayatta kalma oranında %55,6 artış, parazit yükünde azalma	Fereig ve Nishikawa (112)	2016
rROP18	<i>E. coli</i>	Montanide-PLGA	I.P./I.N.	PLGA-rROP18, rROP18 ve montanide-rROP18'e kıyasla yüksek IgA ve IgG2a yanıtı	Nabi ve ark. (113)	2017
rTgHSP70	-	Alum	S.C.	Yüksek IgG1 üretimi, beyin kistlerinde azalma, parazit yükünde azalma	Czarnewski ve ark. (114)	2017
rROP2	<i>E. coli</i>	Quil-A	I.N.	Kediler ile gerçekleştirilen çalışmada aşılama sonucunda kist sayısında azalma	Zulpo ve ark. (115)	2017
rTgPrx1	<i>E. coli</i>	Freund	I.P./S.C.	Spesifik antikor üretiminde uyarılma, artan IFN- γ üretimi, korunma süresinde uzama, parazit yükünde azalma	Fereig ve ark. (116)	2017
rROP18	Schneider böcek hücreleri	Poly I:C/ Montanide-Kolera toksini	I.N./S.C.	Th1/Th2 bağımsızlık yanıtı, beyin kistinde %50 azalma	Rashid ve ark. (117)	2017
rTgEF-1 α	<i>E. coli</i>	Freund	S.C.	Korunma süresinde uzama, yüksek anti- <i>T. gondii</i> antikorları, IFN- γ ve IL-4 üretimi,	Wang ve ark. (118)	2017
TgHSP70	<i>E. coli</i>	GSLs	S.C.	İmmün yanıtta uyarılma, GSLs dozunun artışı ile antikor oranında yükselme, hayatta kalma süresinde artış	Zhuo ve ark. (119)	2017
rSAG1, rSAG2, GRA1	<i>E. coli</i>	MDP	I.M.	Periferik kan hücrelerinde hem IFN- γ üretimi hem de serumda bulunan GRA1'e özgü IgG2 seviyesinde artma	Oledzka ve ark. (120)	2017
rMIC16	<i>S. cerevisiae</i>	-	P.O./I.P.	İmmün yanıtta güçlü uyarılma, aşılama sonucu %10-%20 oranında korunma süresinde uzama	Wang ve ark. (121)	2018
SAG1	Schneider böcek hücreleri	Poly I:C	I.N./S.C.	SAG1 kronik enfeksiyona karşı koruma, parazit yükünde azalma, güçlü Th1 yanıt	Lakhrif ve ark. (122)	2018
rSAG1, rGRA2, rGRA7 epitoplari	<i>E. coli</i>	Freund	S.C.	Th1/Th2 indüklenmesi, yüksek IFN- γ salınımı	Hajissa ve ark. (123)	2018

Tablo 2. Devamı

Aşı adayları	Ekspresyon sistemi	Adjuvant	Aşılama yolu	Sonuçlar	Yazar	Yılı
SAG1, AMA1, ROP2, GRA4 epitopları	<i>E. coli</i>	PLGA (poly lactic-co-glycolic acid), Alum	I.P.	PLGA içeren ve içermeyen multiepitop bazlı aşı Th1 yanıtında artış, korunma süresinde uzama, yüksek spesifik antikor titreri, IFN-γ ve IL-2, alum içeren aşı ile Th2 uyarımı	Roosbehani ve ark. (124)	2018
ROP18 ve MIC8 epitopları ile VLP aşısı	Sf9 böcek hücreleri	-	I.M.	Parazit yükünde azalma ve bellek hücresi oluşumu	Lee ve ark. (125)	2018
ROP4 ve ROP18- influenza M1 VLP aşısı	Rekombinant bakulovirüs	-	I.M.	ROP18-VLP yüksek seviyede immün yanıt ve kist sayısında azalma	Kang ve ark. (126)	2018
TgPI-1, rROP2 ve rGRA4 kokteyli	<i>E. coli</i>	Alum, CpG-ODN	I.D./I.N.	Parazit yükünde %50 azalma, kronik toksoplazmозise karşı yüksek koruma	Picchio ve ark. (127)	2018
rSAG1	<i>E. coli</i>	PLGA	I.P./I.N.	PLGA-rSAG1 yüksek humoral yanıt	Naeem ve ark. (128)	2018
rGRA14	<i>E. coli</i>	Alum ve CaPNs	I.M.	rGRA14-CaPNs ile immün yanıtta uyarılma, korunma süresinde uzama, rGRA14 + alum ile immün yanıtta uyarılma	Pagheh ve ark. (129)	2019
rTgCDPK3	<i>E. coli</i>	Freund	I.M.	Güçlü immün yanıt uyarımı, korunma zamanında uzama	Wu ve ark. (130)	2019
rTgCDPK1	<i>E. coli</i>	-	I.P.	Güçlü immün yanıt uyarımı, korunma zamanında uzama	Huang ve ark. (131)	2019
rTgMIF	<i>E. coli</i>	Freund	I.M.	İmmün yanıtta uyarılma, beyin kistlerinde %62,26 azalma	Liu ve ark. (132)	2019
IMC, ROP18, MIC8 influenza M1 VLP aşısı	Rekombinant bakulovirüs	-	I.M.	Hayatta kalmada %20 artış	Lee ve ark. (133)	2019
ROP4 ve ROP13	Rekombinant bakulovirüs	-	I.N.	İmmün yanıtta uyarılma, beyin doku kistlerinde azalma	Kang ve ark. (134)	2019
ROP13	Rekombinant bakulovirüs	-	I.N. ve I.M.	IN aşılama sonucu yüksek IgG ve IgA antikorları, beyin doku kistlerinde azalma	Kang ve ark. (135)	2019
ROP4 ve ROP13 VLP aşısı	Rekombinant bakulovirüs	-	I.M.	İmmün yanıtta uyarılma, %100 hayatta kalma	Kang ve ark. (136)	2020
SAG1	Sf9 böcek hücreleri	-	I.M.	İmmün yanıtta uyarılma, hayatta kalma oranında %75 uzama	Choi ve Park (137)	2020
AMA1	Rekombinant bakulovirüs	-	I.N.	Yüksek IgG ve IgA antikorları, beyin doku kistlerinde %40 azalma	Kim ve ark. (138)	2020
rTgERK7	<i>E. coli</i>	Freund	S.C. ve I.M.	İmmün yanıtta uyarılma, korunma zamanında uzama	Li ve ark. (139)	2020
Altıvalanlı rekombinant protein aşısı	<i>E. coli</i>	Montanide ISA 50 V	I.P.	IgG ve Ig2a seviyelerinde artış, korunma zamanında uzama	Atalay Şahar ve ark. (140)	2020
IMC, rROP18 ve rMIC8	Rekombinant bakulovirüs	CpG-ODN	I.V.	İmmün yanıtta uyarılma, korunma zamanında uzama	Kang ve ark. (141)	2021
MIC3, ROP8, SAG1 epitopları	<i>E. coli</i>	Freund ve CaPNs	S.C.	İmmün yanıtta uyarılma, Freund ve CaPNs ile birlikte uygulama sonucunda korunma zamanında uzama	Dodangheh ve ark. (142)	2021

Tablo 2. Devamı

Aşı adayları	Ekspresyon sistemi	Adjuvant	Aşılama yolu	Sonuçlar	Yazar	Yılı
rTgPF ve GRA7	<i>E. coli</i>	Freund	I.D.	İmmün yanıtta uyarılma, beyin kistlerinde %46 azalma	Arcon ve ark. (143)	2021
rTgRPP2	<i>E. coli</i>	Freund	I.M.	İmmün yanıtta uyarılma, korunma zamanında uzama	Yu ve ark. (144)	2021

I.M.: İntramusüler, kas içine, I.P.: İntraperitoneal, periton içine, I.D.: Deri içine, I.V.: Damar içine, I.N.: İntranazal, burun içine, P.O.: Peroral, ağız içine, S.C.: Subkütan, deri altına, *E. coli*: *Escherichia coli*, *S. cerevisiae*: *Saccharomyces cerevisiae*, *N. tabacum*: *Nicotiana tabacum*, *M. bovis*: *Mycobacterium bovis*

Parazitin neden olabileceği klinik etkilerin azaltılması, gebelerde oluşabilecek düşüklerin önlenmesi ve başta immün sistemi zayıf olan bireylerde olmak üzere ölümlerin engellenebilmesi amacıyla güvenli, etkili ve kolay elde edilebilir bir aşıya ihtiyaç duyulmaktadır. Tüm dünyada parazite yönelik aşı geliştirme çalışmaları hızla devam etmektedir. Günümüze dek yapılan aşı geliştirme çalışmalarından elde edilen verilerde farelerde güçlü immün yanıt uyarımları, hayatta kalma sürelerinde uzamalar ve parazit yükünde ciddi azalmalar sağlandığı bildirilmiştir. Bu çalışmalarda yenilikçi stratejiler kullanılmaktadır. Özellikle parazite yönelik doğru antijenik proteinlerin ve ekspresyon sistemlerinin seçimi rekombinant protein aşılarının geliştirilebilmesinde büyük önem taşımaktadır. Ancak tüm bunlara rağmen, insanların kullanımına uygun bir rekombinant protein aşısı henüz bulunmamaktadır. Bu durumun temel sebepleri, parazitin karmaşık yaşam döngüsü, konakçı immün sisteminden kaçmaya yönelik geliştirdiği stratejiler ve yapısında bulunan protein çeşitliliğidir. Bunlara ek olarak, parazite ait suş çeşitliliğinin fazla olması, seçilen antijenik bölgenin her suşta etkin yanıtlar oluşturamama riskini ortaya çıkarmaktadır.

Son yıllarda *T. gondii*'ye yönelik yapılan rekombinant protein aşı çalışmalarında, parazitin yaşam döngüsünde yer alan üç formda da bulunan yüksek antijenik gen bölgelerinin seçimine önem verilmesi, bu bölgelerin uygun ekspresyon sistemleri kullanılarak ekspresyon edilmesi ve elde edilen proteinlerin seçilen hayvan modellerine uygulanması ile olumlu sonuçlar elde edilmektedir. Rekombinant protein aşılarının canlı ya da inaktif patojen taşıyamaları bu aşıları güvenilir hale getirmektedir. Üretimlerinde çeşitli ve düşük maliyetli ekspresyon sistemlerinin kullanılabilirliği sayesinde üretim kolaylığı sağlamaktadır. Aşılama sonucunda hem hücresel hem de humoral immün yanıtta uyarım sağlamaları gibi pek çok olanak ise rekombinant protein aşılarının değerini artıran özelliklerdir. Ayrıca, son zamanlarda suşlar üzerine yapılan genotiplendirme çalışmalarının sonuçları aşı adayları antijen seçiminde suş çeşitliliğinin önemini açıkça gösterilmektedir. Tüm bunlara biyoteknolojik ilerlemelerin de eklenmesi rekombinant protein aşılarının üretiminde kombine stratejilerin kullanım gereksinimini artırmaktadır. Yaşanan bu ilerlemeler, toksoplazmozisin yayılmasının önlenmesi ve oluşturduğu zararların azaltılmasında bir çözüm yolu olarak rekombinant protein aşılarının umut vaat ettiğini açıkça göstermektedir.

*Etik

Hakem Değerlendirmesi: Editörler kurulu dışında olan kişiler tarafından değerlendirilmiştir.

*Yazarlık Katkıları

Veri Toplama veya İşleme: T.K., C.G., M.K., A.G., H.C., C.Ü., M.D., A.Y.G., A.D.D., Analiz veya Yorumlama: T.K., C.G., S.E.A., H.C., C.Ü., M.D., A.Y.G., A.D.D., Literatür Arama: T.K., C.G., M.K., A.G., S.E.A., A.D.D., Yazan: T.K., C.G., H.C., M.D., A.D.D.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansal Destek: Yazarlar tarafından finansal destek almadıkları bildirilmiştir.

KAYNAKLAR

- Yektaein N, Malekpour A, Atapour A, Davoodi T, Hatam G. Genetic immunization against toxoplasmosis: A review article. *Microb Pathog* 2021; 155: 104888.
- Gürüz AY, Delibaş SB. Toksoplazmozis ve İmmunolojisi. Tıbbi ve Veteriner İmmunoparazitoloji, Özcel MA, İnci A, Turgay N, Köroğlu E. Editors. *Türkiye Parazit Derg* 2007;p.167-94.
- Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 267-99.
- Wang JL, Zhang NZ, Li TT, He JJ, Elsheikha HM, Zhu XQ. Advances in the development of anti-*Toxoplasma gondii* vaccines: challenges, opportunities, and perspectives. *Trends Parasitol* 2019; 35: 239-53.
- Lyons RE, McLeod R, Roberts CW. *Toxoplasma gondii* tachyzoite-bradyzoite interconversion. *Trends Parasitol* 2002; 18: 198-201.
- Saadatnia G, Golkar M. A review on human toxoplasmosis. *Scand J Infect Dis* 2012; 44: 805-14.
- Inceboz M, Inceboz, T. Toxoplasmosis and Neuropsychological Effects. *Türkiye Parazit Derg* 2021; 45: 49-55.
- Weiss LM, Dubey JP. Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int J Parasitol* 2009; 39: 895-901.
- Innes EA, Hamilton C, Garcia JL, Chryssafidis A, Smith D. A one health approach to vaccines against *Toxoplasma gondii*. *Food Waterborne Parasitol* 2019; 15: e00053.
- Liljeqvist S, Ståhl S. Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *J Biotechnol* 1999; 73: 1-33.
- Nascimento IP, Leite LCC. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Braz J Med Biol Res* 2012; 45: 1102-11.
- Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii*--the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol* 2008; 55: 467-75.
- Dubey JP. *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis*, and other tissue cyst forming Coccidia of humans and animals. *Parasitic Protozoa* 1993; 6: 5-57.
- Kolören Z, Dubey JP. A review of toxoplasmosis in humans and animals in Turkey. *Parasitology* 2020; 147: 12-28.
- Döşkaya M, Caner A, Ajzenberg D, Değirmenci A, Dardé ML, Can H, et al. Isolation of *Toxoplasma gondii* strains similar to Africa 1 genotype in Turkey. *Parasitol Int* 2013; 62: 471-4.
- Yucesan B, Guldemir D, Babur C, Kilic S, Cakmak A. Whole-genome sequencing of a *Toxoplasma gondii* strain from a Turkish isolate using next-generation sequencing technology. *Acta Trop* 2021; 218: 105907.
- Attias M, Teixeira DE, Benchimol M, Vommaro RC, Crepaldi PH, De Souza W. The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasit Vectors* 2020; 13: 588.

18. Beder D, Taşbent FE. Genel Özellikleri ve Laboratuvar Tanısı ile *Toxoplasma gondii* Enfeksiyonları. Türkiye Parazit Derg 2020; 44: 94-101.
19. Aguirre AA, Longcore T, Barbieri M, Dabritz H, Hill D, Klein PN, et al. The one health approach to toxoplasmosis: epidemiology, control, and prevention strategies. Ecohealth 2019; 16: 378-90.
20. Jones JL, Kruszon-Moran D, Sanders-Lewis K, Wilson M. *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 1999-2004, decline from the prior decade. Am J Trop Med Hyg 2007; 77: 405-10.
21. Hodge JM, Coghill AE, Kim Y, Bender N, Smith-Warner SA, Gapstur S, et al. *Toxoplasma gondii* infection and the risk of adult glioma in two prospective studies. Int J Cancer 2021.
22. Al-Malki ES. Toxoplasmosis: stages of the protozoan life cycle and risk assessment in humans and animals for an enhanced awareness and an improved socio-economic status. Saudi J Biol Sci 2021; 28: 962-9.
23. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol 2000; 30: 1217-58.
24. Djurković-Djaković O, Dupouy-Camet J, Van der Giessen J, Dubey JP. Toxoplasmosis: overview from a one health perspective. Food Waterborne Parasitol 2019; 15: e00054.
25. Havelaar AH, Kirk MD, Torgerson PR, Gibb HJ, Hald T, Lake RJ, et al. World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010. PLoS Med 2015; 12: e1001923.
26. Pleyer U, Gross U, Schlüter D, Wilking H, Seeber F. Toxoplasmosis in Germany. Dtsch Arztebl Int 2019; 116: 435-44.
27. Ocak S, Zeteroglu S, Ozer C, Dolapcioglu K, Gungoren A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii*, rubella and cytomegalovirus among pregnant women in southern Turkey. Scand J Infect Dis. 2007; 39: 231-4.
28. Kayman T, Kayman M. Kayseri'deki Gebelerde Toksoplazmoz Seroprevalans. Perinatoloji Derg 2015; 18: 92-6.
29. Toklu GD. Antibodies frequency against Toxoplasmosis, Rubella Virus and Cytomegalovirus in pregnant women. J Clin Anal Med 2013; 4: 38-40.
30. Karakavuk M, Can H, Gül A, Döşkaya AD, Alak SE, Ün C, et al. GRA8 DNA vaccine formulations protect against chronic toxoplasmosis. Microb Pathog 2021; 158: 105016.
31. Ajioka JW, Fitzpatrick JM, Reitter CP. *Toxoplasma gondii* genomics: shedding light on pathogenesis and chemotherapy. Expert Rev Mol Med 2001; 2001: 1-19.
32. Zhang Y, Lai BS, Juhas M, Zhang Y. *Toxoplasma gondii* secretory proteins and their role in invasion and pathogenesis. Microbiol Res 2019; 227: 126293.
33. Weiss LM, Kim K. *Toxoplasma gondii*, The Model Apicomplexan: Perspectives and Methods, Elsevier 2011; pp. 800.
34. Talevich E, Kannan N. Structural and evolutionary adaptation of rhopty kinases and pseudokinases, a family of coccidian virulence factors. BMC Evol Biol 2013; 13: 117.
35. Rezaei F, Sarvi S, Sharif M, Hejazi SH, Sattar Pagheh A, Aghayan SA, et al. A systematic review of *Toxoplasma gondii* antigens to find the best vaccine candidates for immunization. Microb Pathog 2019; 126: 172-84.
36. Sibley LD. Invasion and intracellular survival by protozoan parasites. Immunol Rev 2011; 240: 72-91.
37. Mohamed RM, Aosai F, Chen M, Mun HS, Norose K, Belal US, et al. Induction of protective immunity by DNA vaccination with *Toxoplasma gondii* HSP70, HSP30 and SAG1 genes. Vaccine 2003; 21: 2852-61.
38. Kikumura A, Fang H, Mun HS, Uemura N, Makino M, Sayama Y, et al. Protective immunity against lethal anaphylactic reaction in *Toxoplasma gondii*-infected mice by DNA vaccination with *T. gondii*-derived heat shock protein 70 gene. Parasitol Int 2010; 59: 105-11.
39. Döşkaya M, Liang L, Jain A, Can H, İz SG, Felgner PL, et al. Discovery of new *Toxoplasma gondii* antigenic proteins using a high throughput protein microarray approach screening sera of murine model infected orally with oocysts and tissue cysts. Parasit Vectors 2018; 11: 393.
40. Filisetti D, Candolfi E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. Ann Ist Super Sanita 2004; 40: 71-80.
41. Henriquez FL, Woods S, Cong H, McLeod R, Roberts CW. Immunogenetics of *Toxoplasma gondii* informs vaccine design. Trends Parasitol 2010; 26: 550-5.
42. Pier GB, Lyczak JB, Wetzler LM. Immunology, infection, and immunity. American Society for Microbiology, Washington D.C. 2004.p.697.
43. Xiao J, Yolken RH. Strain hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases. Acta Physiol (Oxf) 2015; 213: 828-45.
44. Munoz M, Liesenfeld O, Heimesaat MM. Immunology of *Toxoplasma gondii*. Immunol Rev 2011; 240: 269-85.
45. Hunter CA, Sibley LD. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. Nat Rev Microbiol 2012; 10: 766-78.
46. Karakavuk M, Aldemir D, Mercier A, Atalay Şahar E, Can H, Murat JB, et al. Prevalence of toxoplasmosis and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* strains isolated in wild birds of prey and their relation with previously isolated strains from Turkey. PLoS One 2018; 13: e0196159.
47. Hansson M, Nygren P, Ståhl S. Design and production of recombinant subunit vaccines. Biotechnol Appl Biochem 2000; 32: 95-107.
48. Andersson C. Production and delivery of recombinant subunit vaccines, Department of Biotechnology Royal Institute of Technology (KTH), Sweden, 2000; p. 92.
49. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. Biotechnol Adv 2009; 27: 297-306.
50. Andersen DC, Krummen L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. Curr Opin Biotechnol 2002; 13: 117-23.
51. Hudu SA, Shinkafi SH, Shuaibu U. An overview of recombinant vaccine technology, adjuvants and vaccine delivery methods. Int J Pharm Pharm Sci 2016; 8: 19-24.
52. Shi S, Zhu H, Xia X, Liang Z, Ma X, Sun B. Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. Vaccine 2019; 37: 3167-78.
53. Reed SG, Orr MT, Fox CB. Key roles of adjuvants in modern vaccines. Nat Med 2013; 19: 1597-608.
54. Pollet J, Chen WH, Strych U. Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics. Adv Drug Deliv Rev 2021; 170: 71-82.
55. Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends. Immunol Cell Biol 2004; 82: 488-96.
56. Petersen E, Nielsen HV, 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: 1283-9.
57. Letscher Bru V, Villard O, Risse B, Zauke M, Klein JP, Kien TT. Protective effect of vaccination with a combination of recombinant surface antigen 1 and interleukin 12 against toxoplasmosis in mice. Infect Immun 1998; 66: 4503-6.
58. Supply P, Sutton P, Coughlan SN, Bilo K, Saman E, Trees AJ, et al. Immunogenicity of recombinant BCG producing the GRA1 antigen from *Toxoplasma gondii*. Vaccine 1999; 17: 705-14.
59. Haumont M, Delhaye L, Garcia L, Margarita J, Pasqualina M, Véronique D, et al. Protective immunity against congenital toxoplasmosis with recombinant SAG1 protein in a guinea pig model. Infect Immun 2000; 68: 4948-53.
60. Mishima M, Xuan X, Shioda A, Omata Y, Fujisaki K, Nagasawa H, et al. Modified protection against *Toxoplasma gondii* lethal infection and brain cyst formation by vaccination with SAG2 and SRS1. J Vet Med Sci 2001; 63: 433-8.
61. Letscher-Bru V, Pfaff AW, Abou-Bacar A, Filisetti D, Antoni E, Villard O, et al. 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: 6615-9.
62. Martin V, Supanitsky A, Echeverria P, Litwin S, Tanos T, Roodt, A, et al. Recombinant GRA4 or ROP2 protein combined with alum or the GRA4 gene provides partial protection in chronic murine models of toxoplasmosis. Clin Diagn Lab Immunol 2004; 11: 704-10.

63. Echeverria P, Miguel N, Costas M, Angel S. Potent antigen-specific immunity to *Toxoplasma gondii* in adjuvant-free vaccination system using Rop2-Leishmania infantum Hsp83 fusion protein. *Vaccine* 2006; 24: 4102-10.
64. Golkar M, Shokrgozar MA, Rafati S, Musset K, Assmar M, Sadaie, R, et al. 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: 4301-11.
65. Zhou H, Gu Q, Zhao Q, Zhang J, Cong H, Li Y, et al. *Toxoplasma gondii*: expression and characterization of a recombinant protein containing SAG1 and GRA2 in *Pichia pastoris*. *Parasitol Res* 2007; 100: 829-35.
66. Döşkaya M, Kalantari-Dehaghi M, Walsh CM, Hiszczyńska-Sawicka E, Davies DH, et al. GRA1 protein vaccine confers better immune response compared to codon-optimized GRA1 DNA vaccine. *Vaccine* 2007; 25: 1824-37.
67. Wang HL, Liu Q, Liu K, Zhong W, Gao S, Jiang L, An N. Immune response induced by recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing ROP2 gene of *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Int* 2007; 56: 263-8.
68. Cuppari AF, Sanchez V, Ledesma B, Frank FM, Goldman A, Angel SO, et al. *Toxoplasma gondii* protease inhibitor-1 (TgPI-1) is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis. *Vaccine* 2008; 26: 5040-5.
69. Igarashi M, Kano F, Tamekuni K, Machado RZ, Navarro IT, Vidotto O, et al. *Toxoplasma gondii*: evaluation of an intranasal vaccine using recombinant proteins against brain cyst formation in BALB/c mice. *Exp Parasitol* 2008; 118: 386-92.
70. Gatkowska J, Gasior A, Kur J, Długowska H. *Toxoplasma gondii*: chimeric Dr fimbriae as a recombinant vaccine against toxoplasmosis. *Exp Parasitol* 2008; 118: 266-70.
71. Dziadek B, Gatkowska J, Brzostek A, Dziadek J, Dzitko K, Długowska H. *Toxoplasma gondii*: the immunogenic and protective efficacy of recombinant ROP2 and ROP4 rhoptry proteins in murine experimental toxoplasmosis. *Exp Parasitol* 2009; 123: 81-9.
72. Fang R, Feng H, Nie H, Wang L, Tu P, Song Q, et al. Construction and immunogenicity of pseudotype baculovirus expressing *Toxoplasma gondii* SAG1 protein in BALB/c mice model. *Vaccine* 2010; 28: 1803-7.
73. Machado A, Caetano B, Barbosa R, Salgado AP, Rabelo R, Garcia, C, et al. Prime and boost immunization with influenza and adenovirus encoding the *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 (SAG2) induces strong protective immunity. *Vaccine* 2010; 28: 3247-56.
74. Rashid I, Hedli D, Moire N, Pierre J, Debierre-Grockiego, F, Dimier-Poisson I, et al. Immunological responses induced by a DNA vaccine expressing RON4 and by immunogenic recombinant protein RON4 failed to protect mice against chronic toxoplasmosis. *Vaccine* 2011; 29: 8838-46.
75. Sánchez VR, Pitkowski MN, Fernández Cuppari AV, Rodríguez FM, Fenoy IM, Frank FM, et al. Combination of CpG-oligodeoxynucleotides with recombinant ROP2 or GRA4 proteins induces protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection. *Exp Parasitol* 2011; 128: 448-53.
76. Dziadek B, Gatkowska J, Brzostek A, Dziadek J, Dzitko K, Grzybowski M, et al. 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: 821-30.
77. Wang Y, Wang M, Wang G, Pang A, Fu B, Yin H, et al. 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: 8619-23.
78. Dziadek B, Gatkowska J, Grzybowski M, Dziadek J, Dzitko K, Długowska 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: 133-8.
79. Del L, Yácono M, Farran I, Becher ML, Sander V, Sánchez VR, Martin V, et al. A chloroplast-derived *Toxoplasma gondii* GRA4 antigen used as an oral vaccine protects against toxoplasmosis in mice. *Plant Biotechnol J* 2012; 10: 1136-44.
80. Min J, Qu D, Li C, Song X, Zhao Q, Li XA, et al. Enhancement of protective immune responses induced by *Toxoplasma gondii* dense granule antigen 7 (GRA7) against toxoplasmosis in mice using a prime-boost vaccination strategy. *Vaccine* 2012; 30: 5631-6.
81. Zheng B, Lu S, Tong Q, Kong Q, Lou D. The virulence-related rhoptry protein 5 (ROP5) of *Toxoplasma gondii* is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis in mice. *Vaccine* 2013; 31: 4578-84.
82. Qu D, Han J, Du A. Enhancement of protective immune response to recombinant *Toxoplasma gondii* ROP18 antigen by ginsenoside Re. *Exp Parasitol* 2013; 135: 234-9.
83. Yu Q, Huang X, Gong P, Zhang Q, Li J, Zhang G, et al. Protective immunity induced by a recombinant BCG vaccine encoding the cyclophilin gene of *Toxoplasma gondii*. *Vaccine* 2013; 31: 6065-71.
84. Wang HL, Li YQ, Yin LT, Meng XL, Guo M, Zhang JH, et al. *Toxoplasma gondii* Protein Disulfide Isomerase (TgPDI) is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis. *PLoS One* 2013; 8: e70884.
85. Yin LT, Hao HX, Wang HL, Zhang JH, Meng XL, Yin GR. Intranasal immunisation with recombinant *Toxoplasma gondii* actin partly protects mice against Toxoplasmosis. *PLoS One* 2013; 8: e82765.
86. Chuang SC, Ko JC, Chen CP, Du JT, Yang CD. 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* 2013; 6: 34.
87. Chuang SC, Ko JC, Chen CP, Du JT, Yang CD. Encapsulation of chimeric protein rSAG1/2 into poly(lactide-co-glycolide) microparticles induces long-term protective immunity against *Toxoplasma gondii* in mice. *Exp Parasitol* 2013; 134: 430-7.
88. Mendes ÉA, Fonseca FG, Casério BM, Colina JP, Gazzinelli RT, Caetano BC. Recombinant vaccines against *T. gondii*: comparison between homologous and heterologous vaccination protocols using two viral vectors expressing SAG1. *PLoS One* 2013; 8: e63201.
89. Wang HL, Pang M, Yin LT, Zhang JH, Meng XL, Yu BF, et al. Intranasal immunisation of the recombinant *Toxoplasma gondii* receptor for activated C kinase 1 partly protects mice against *T. gondii* infection. *Acta Trop* 2014; 137: 58-66.
90. Wang HL, Zhang TE, Yin LT, Pang M, Guan L, Liu H, et al. Partial protective effect of intranasal immunization with recombinant *Toxoplasma gondii* Rhoptry Protein 17 against toxoplasmosis in mice. *PLoS One* 2014; 9: e108377.
91. Chuang SC, Yang CD. Sustained release of recombinant surface antigen 2 (rSAG2) from poly(lactide-co-glycolide) microparticles extends protective cell-mediated immunity against *Toxoplasma gondii* in mice. *Parasitology* 2014; 1-10.
92. Tanaka S, Kuroda Y, Ihara F, Nishimura M, Hiasa J, Kojima N, et al. Vaccination with profilin encapsulated in oligomannose-coated liposomes induces significant protective immunity against *Toxoplasma gondii*. *Vaccine* 2014; 32: 1781-5.
93. Sun X, Mei M, Zhang X, Han F, Jia B, Wei X, et al. The extracellular matrix protein mindin as a novel adjuvant elicits stronger immune responses for rBAG1, rSRS4 and rSRS9 antigens of *Toxoplasma gondii* in BALB/c mice. *BMC Infect Dis* 2014; 14: 429.
94. Zhang TE, Yin LT, Li RH, Wang HL, Meng XL, Yin GR. Protective immunity induced by peptides of AMA1, RON2 and RON4 containing T- and B-cell epitopes via an intranasal route against toxoplasmosis in mice. *Parasit Vectors* 2015; 8: 15.
95. Wagner A, Schabussova I, Ruttkowski B, Peschke R, Kur J, Kundi M, et al. Prime-boost vaccination with *Toxoplasma* lysate antigen, but not with a mixture of recombinant protein antigens, leads to reduction of brain cyst formation in BALB/c mice. *PLoS One* 2015; 10: e0126334.
96. Lu G, Wang L, Zhou A, Han Y, Guo J, Song P, et al. Epitope analysis, expression and protection of SAG5A vaccine against *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop* 2015; 146: 66-72.
97. Xu Y, Zhang NZ, Wang M, Dong H, Feng SY, Guo HC, et al. A long-lasting protective immunity against chronic toxoplasmosis in mice induced by recombinant rhoptry proteins encapsulated in poly (lactide-co-glycolide) microparticles. *Parasitol Res* 2015; 114: 4195-203.
98. Albarracín RM, Becher ML, Farran I, Sander VA, Corigliano MG, Yácono ML, et al. The fusion of *Toxoplasma gondii* SAG1 vaccine candidate to

- Leishmania infantum heat shock protein 83-kDa improves expression levels in tobacco chloroplasts. *Biotechnol J* 2015; 10: 748-59.
99. Sánchez VR, Fenoy IM, Picchio MS, Soto AS, Arcon N, Goldman A, et al. Homologous prime-boost strategy with TgPI-1 improves the immune response and protects highly susceptible mice against chronic *Toxoplasma gondii* infection. *Acta Trop* 2015; 150: 159-65.
 100. Sonaimuthu P, Ching XT, Fong MY, Kalyanasundaram R, Lau YL. Induction of protective immunity against toxoplasmosis in BALB/c mice vaccinated with *Toxoplasma gondii* Rhopty-1. *Front Microbiol* 2016; 7: 808.
 101. Wang HL, Wen LM, Pei YJ, Wang F, Yin LT, Bai JZ, et al. Recombinant *Toxoplasma gondii* phosphoglycerate mutase 2 confers protective immunity against toxoplasmosis in BALB/c mice. *Parasite* 2016; 23: 12.
 102. Zhang NZ, Xu Y, Wang M, Chen J, Huang SY, Gao Q, et al. Vaccination with *Toxoplasma gondii* calcium-dependent protein kinase 6 and rhopty protein 18 encapsulated in poly (lactide-co-glycolide) microspheres induces long-term protective immunity in mice. *BMC Infect Dis* 2016; 16: 168.
 103. Liu Z, Yuan F, Yang Y, Yin L, Liu Y, Wang Y, et al. Partial protective immunity against toxoplasmosis in mice elicited by recombinant *Toxoplasma gondii* malate dehydrogenase. *Vaccine* 2016; 34: 989-94.
 104. Gedik Y, İz SG, Can H, Döşkaya AD, Gürhan SİD, Gürüz Y, et al. Immunogenic multistage recombinant protein vaccine confers partial protection against experimental toxoplasmosis mimicking natural infection in murine model. *Trials in Vaccinology* 2016; 5: 15-23.
 105. Liu Z, Yin L, Li Y, Yuan F, Zhang X, Ma J, et al. Intranasal immunization with recombinant *Toxoplasma gondii* actin depolymerizing factor confers protective efficacy against toxoplasmosis in mice. *BMC Immunol* 2016; 17: 37.
 106. Tang X, Yin G, Qin M, Tao G, Suo J, Liu X, et al. Transgenic *Eimeria tenella* as a vaccine vehicle: expressing TgSAG1 elicits protective immunity against *Toxoplasma gondii* infections in chickens and mice. *Sci Rep* 2016; 6: 29379.
 107. Ching XT, Fong MY, Lau YL. Evaluation of immunoprotection conferred by the subunit vaccines of GRA2 and GRA5 against acute toxoplasmosis in BALB/c mice. *Front Microbiol* 2016; 7: 609.
 108. Allahyari M, Mohabati R, Amiri S, Rastaghi ARE, Babaie J, Mahdavi M, et al. Synergistic effect of rSAG1 and rGRA2 antigens formulated in PLGA microspheres in eliciting immune protection against *Toxoplasma gondii*. *Exp Parasitol* 2016; 170: 236-46.
 109. El Bissati K, Chentoufi AA, Krishack PA, Zhou Y, Woods S, Dubey JP, et al. Adjuvanted multi-epitope vaccines protect HLA-A* 11: 01 transgenic mice against *Toxoplasma gondii*. *JCI Insight* 2016; 1: e85955.
 110. Wang M, Yang XY, Zhang NZ, Zhang DL, Zhu XQ. Evaluation of protective immune responses induced by recombinant TrxLp and ENO2 proteins against *Toxoplasma gondii* infection in BALB/c mice. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 3571962.
 111. Lee DH, Lee SH, Kim AR, Quan FS. Virus-like nanoparticle vaccine confers protection against *Toxoplasma gondii*. *PLoS One* 2016; 11: e0161231.
 112. Fereig RM, Nishikawa Y. Peroxiredoxin 3 promotes IL-12 production from macrophages and partially protects mice against infection with *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Int* 2016; 65: 741-8.
 113. Nabi H, Rashid I, Ahmad N, Durrani A, Akbar H, Islam S, et al. Induction of specific humoral immune response in mice immunized with ROP18 nanospheres from *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res* 2017; 116: 359-70.
 114. Czarnewski P, Araújo EC, Oliveira MC, Mineo TW, Silva NM. Recombinant TgHSP70 immunization protects against *Toxoplasma gondii* brain cyst formation by enhancing inducible nitric oxide expression. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; 7: 142.
 115. Zulpo DL, Igarashi M, Sammi AS, Santos JRD, Sasse JP, Cunha IALD, et al. rROP2 from *Toxoplasma gondii* as a potential vaccine against oocyst shedding in domestic cats. *Rev Bras Parasitol Vet* 2017; 26: 67-73.
 116. Fereig RM, Kuroda Y, Terkawi MA, Mahmoud ME, Nishikawa Y. Immunization with *Toxoplasma gondii* peroxiredoxin 1 induces protective immunity against toxoplasmosis in mice. *PLoS One* 2017; 12: e0176324.
 117. Rashid I, Moiré N, Héraut B, Dimier-Poisson I, Ménélec MN. Enhancement of the protective efficacy of a ROP18 vaccine against chronic toxoplasmosis by nasal route. *Med Microbiol Immunol* 2017; 206: 53-62.
 118. Wang S, Zhang Z, Wang Y, Gadahi JA, Xu L, Yan R, et al. *Toxoplasma gondii* elongation factor 1-alpha (TgEF-1 α) is a novel vaccine candidate antigen against toxoplasmosis. *Front Microbiol* 2017; 8: 168.
 119. Zhuo X, Sun H, Wang S, Guo X, Ding H, Yang Y, et al. Ginseng Stem-and-Leaf Saponin (GSLs)-enhanced protective immune responses induced by *Toxoplasma gondii* Heat Shocked Protein 70 (HSP70) against toxoplasmosis in mice. *J Parasitol* 2017; 103: 111-7.
 120. Oledzka G, Bo L, Hiszczynska-Sawicka E, Gelder FB, Kur J, McFarlane RG. *Toxoplasma gondii*: Immunological response of sheep to injections of recombinant SAG1, SAG2, GRA1 proteins coupled to the non-toxic microparticle muramyl dipeptide. *Small Rum Res* 2017; 150: 111-7.
 121. Wang L J, Xiao T, Xu C, Li J, Liu GZ, Yin K, et al. Protective immune response against *Toxoplasma gondii* elicited by a novel yeast-based vaccine with microneme protein 16. *Vaccine* 2018; 36: 3943-8.
 122. Lakhri Z, Moreau A, Héraut B, Di-Tommaso A, Juste M, Moiré N, et al. Targeted delivery of *Toxoplasma gondii* antigens to dendritic cells promote immunogenicity and protective efficiency against toxoplasmosis. *Front Immunol* 2018; 9: 317.
 123. Hajissa K, Zakaria R, Suppian R, Mohamed Z. Immunogenicity of Multiepitope Vaccine Candidate against *Toxoplasma gondii* Infection in BALB/c Mice. *Iran J Parasitol* 2018; 13: 215-24.
 124. Roozbehani M, Falak R, Mohammadi M, Hemphill A, Razmjou E, Reza Meamar A, et al. Characterization of a multi-epitope peptide with selective MHC-binding capabilities encapsulated in PLGA nanoparticles as a novel vaccine candidate against *Toxoplasma gondii* infection. *Vaccine* 2018; 36: 6124-32.
 125. Lee SH, Kang HJ, Lee DH, Kang SM, Quan FS. Virus-like particle vaccines expressing *Toxoplasma gondii* rhopty protein 18 and microneme protein 8 provide enhanced protection. *Vaccine* 2018; 36: 5692-700.
 126. Kang HJ, Lee SH, Chu KB, Lee DH, Quan FS. Virus-like particles expressing *Toxoplasma gondii* rhopty protein 18 induces better protection than rhopty protein 4 against *T. gondii* infection. *Korean J Parasitol* 2018; 56: 429-35.
 127. Picchio MS, Sánchez VR, Arcon N, Soto AS, Sabilia MP, Aldirico MDLA, et al. Vaccine potential of antigen cocktails composed of recombinant *Toxoplasma gondii* TgPI-1, ROP2 and GRA4 proteins against chronic toxoplasmosis in C3H mice. *Exp Parasitol* 2018; 185: 62-70.
 128. Naeem H, Sana M, Islam S, Khan M, Riaz F, Zafar Z, et al. Induction of Th1 type-oriented humoral response through intranasal immunization of mice with SAG1-*Toxoplasma gondii* polymeric nanospheres. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018; 46(Suppl 2): 1025-34.
 129. Pagheh AS, Sarvi S, Gholami S, Asgarian-Omran H, Valadan R, Hassannia H, et al. Protective efficacy induced by DNA prime and recombinant protein boost vaccination with *Toxoplasma gondii* GRA14 in mice. *Microb Pathog* 2019; 134: 103601.
 130. Wu M, An R, Chen Y, Chen T, Wen H, Yan Q, et al. Vaccination with recombinant *Toxoplasma gondii* CDPK3 induces protective immunity against experimental toxoplasmosis. *Acta Trop* 2019; 199: 105148.
 131. Huang SY, Chen K, Wang JL, Yang B, Zhu XQ. Evaluation of protective immunity induced by recombinant calcium-dependent protein kinase 1 (TgCDPK1) protein against acute toxoplasmosis in mice. *Microb Pathog* 2019; 133: 103560.
 132. Liu K, Wen H, Cai H, Wu M, An R, Chu D, et al. Protective effect against toxoplasmosis in BALB/c mice vaccinated with *Toxoplasma gondii* macrophage migration inhibitory factor. *Front Microbiol* 2019; 10: 813.
 133. Lee SH, Kang HJ, Lee DH, Quan FS. Protective immunity induced by incorporating multiple antigenic proteins of *Toxoplasma gondii* into influenza virus-like particles. *Front Immunol* 2019; 9: 3073.
 134. Kang HJ, Lee SH, Kim MJ, Chu KB, Lee DH, Chopra M, et al. Influenza virus-like particles presenting both *Toxoplasma gondii* ROP4 and ROP13

- enhance protection against *T. gondii* Infection. *Pharmaceutics* 2019; 11: 342.
135. Kang HJ, Chu KB, Lee SH, Kim MJ, Park H, Jin H, et al. Virus-like Particle Vaccine Containing *Toxoplasma gondii* Rhostry Protein 13 Induces Protection against *T. gondii* ME49 Infection in Mice. *Korean J Parasitol* 2019; 57: 543-7.
136. Kang HJ, Chu KB, Lee SH, Kim MJ, Park H, Jin H, et al. *Toxoplasma gondii* virus-like particle vaccination alleviates inflammatory response in the brain upon *T. gondii* infection. *Parasite Immunol* 2020; 42: e12716.
137. Choi WH, Park JS. Immunogenicity and Protective Effect of a Virus-Like Particle Containing the SAG1 Antigen of *Toxoplasma gondii* as a Potential Vaccine Candidate for Toxoplasmosis. *Biomedicines* 2020; 8: 91.
138. Kim MJ, Lee SH, Kang HJ, Chu KB, Park H, Jin H, et al. Virus-like particle vaccine displaying *Toxoplasma gondii* apical membrane antigen 1 induces protection against *T. gondii* ME49 infection in mice. *Microb Pathog* 2020; 142: 104090.
139. Li ZY, Guo HT, Calderón-Mantilla G, He JJ, Wang JL, Bonev BB, et al. Immunostimulatory efficacy and protective potential of putative TgERK7 protein in mice experimentally infected by *Toxoplasma gondii*. *Int J Med Microbiol* 2020; 310: 151432.
140. Atalay Şahar E, Can H, İz S, Döşkaya A, Kalantari-Dehaghi M, Deveci R, et al. Development of a hexavalent recombinant protein vaccine adjuvanted with Montanide ISA 50V and determination of its protective efficacy against acute toxoplasmosis. *BMC Infect Dis* 2020; 20: 493.
141. Kang HJ, Chu KB, Kim MJ, Lee S H, Park H, Jin H, et al. Protective immunity induced by CpG ODN-adjuvanted virus-like particles containing *Toxoplasma gondii* proteins. *Parasite Immunol* 2021; 43: e12799.
142. Dodangeh S, Fasihi-Ramandi M, Daryani A, Valadan R, Asgarian-Omran H, Hosseini-nejad Z, et al. Protective efficacy by a novel multi-epitope vaccine, including MIC3, ROP8, and SAG1, against acute *Toxoplasma gondii* infection in BALB/c mice. *Microb Pathog* 2021; 153: 104764.
143. Arcon N, Picchio MS, Fenoy IM, Moretta RE, Soto AS, Sibilina MDP, et al. Synergistic effect of GRA7 and profilin proteins in vaccination against chronic *Toxoplasma gondii* infection. *Vaccine* 2021; 39: 933-42.
144. Yu Z, Lu Y, Liu Z, Aleem MT, Liu J, Luo J, et al. Recombinant *Toxoplasma gondii* ribosomal protein P2 modulates the functions of murine macrophages *in vitro* and provides immunity against acute toxoplasmosis *in vivo*. *Vaccines (Basel)* 2021; 9: 357.