

پاسخهای ایمنی سگهای آلوده به لیشمانیا اینفانتوم علیه سیستئین پروتئینازهای نو ترکیب نوع I و II

علیرضا نخعی^۱، سیما رأفتی^{۲*}، علی هاتف سلمانیان^۳، محمدتقی خانی^۴، مهدی محبعلی^۵، طاهره طاهری^۶

- ۱- استادیار گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران
- ۲- دانشیار گروه ایمونولوژی، آزمایشگاه ایمونولوژی ملکولی، بخش ایمونولوژی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
- ۳- استادیار مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی، تهران، ایران
- ۴- دانشیار گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۵- استاد گروه انگل شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه تهران، تهران، ایران
- ۶- کارشناس ارشد ژنتیک، بخش ایمونولوژی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

هدف: بررسی پاسخهای ایمنی هومورال و سلولی سگهای آلوده به لیشمانیا اینفانتوم^۱ نسبت به پروتئینهای نو ترکیب سیستئین پروتئینازهای نوع I و II و پیتید سنتزی مربوط به انتهای کربوکسی (CTE)^۲ سیستئین پروتئیناز نوع I. روش کار: ۱۴ قلاده سگ آلوده به لیشمانیا اینفانتوم (۷ قلاده دارای تظاهرات بالینی^۳ و ۷ قلاده دیگر بدون علائم ظاهری^۴) از یک ناحیه آندمیک ایران و سه قلاده سگ طبیعی از نواحی غیر آندمیک انتخاب شدند. پاسخهای ایمنی هومورال و سلولی آنها بر ترتیب به روش الیزا و آزمایش پرولیفراسیون لئوسیتها، نسبت به پروتئینهای نو ترکیب سیستئین پروتئینازهای نوع I (rCPB)^۵، II (rCPA)^۶، پیتید سنتزی مربوط به انتهای کربوکسی (CTE) سیستئین پروتئیناز نوع I و آنتی ژنهای منجمد - ذوب شده (F/T)^۷ لیشمانیا اینفانتوم مورد بررسی قرار گرفت. میزان آنتی بادی کلاس IgG و زیر کلاسهای IgG₁ و IgG₂ و پرولیفراسیون لئوسیتها نسبت به آنتی ژنهای فوق اندازه گیری گردید. **نتایج و بحث:** نتایج نشان می دهد بالاترین پاسخ سلولی در هر دو گروه حیوانات (دارای علائم و بدون علائم ظاهری) مربوط به آنتی ژنهای منجمد - ذوب شده انگل می باشد، پاسخ سلولی متوسطی نسبت به سیستئین پروتئینازهای نو ترکیب (rCPA و rCPB) CTE مشاهده گردید. میزان آنتی بادی (IgG₁ و IgG₂) علیه rCRA در هر دو گروه پایین است اما CTE و rCPB (هر دو به یک میزان) بخوبی سیستم ایمنی هومورال تمام سگها را تحریک می نمایند. در سگهای بدون علائم میزان IgG₂ علیه پروتئینهای مزبور نسبت به میزان IgG₁ بالاست. نتایج تحقیق همچنین نشان می دهد که پاسخهای ایمنی نسبت به CPB و CTE تقریباً در تمام سگها یکسان است بنابراین با توجه به اینکه CTE بخش انتهایی سیستئین پروتئیناز نوع I می باشد، به نظر می رسد بخش اعظم خاصیت ایمنی CPB مربوط به این ناحیه است. **نتیجه گیری:** CPB و CTE هر دو نوع پاسخ ایمنی سلولی و هومورال سگهای آلوده به لیشمانیا اینفانتوم را بخوبی تحریک می کنند اما CPA ایمونژن نسبتاً ضعیفتری است.

کلید واژگان: لیشمانیا اینفانتوم، سیستئین پروتئیناز، بخش انتهایی کربوکسی (CTE)، لیشمانیوز احشایی، ایمنی هومورال و سلولی.

* نشانی مکاتبه: تهران، میدان پاستور، انستیتو پاستور ایران، بخش ایمونولوژی، صندوق پستی ۶۶۹۹-۱۱۳۶۵، فاکس ۱۵-۸۷۴۲۳۱۴ E-mail: sima-rafatsy@institute.pasteur.ac.ir

1. *Leishmania infantum* (*L. infantum*) 2. C-Terminal Extension (CTE) 3. Symptomatic
4. Asymptomatic 5. Recombinant Cysteine Proteinase B (rCPB) 6. Recombinant Cysteine Proteinase A (rCPA) 7. Freezing/Thawing (F/T) 8. Total IgG

۱- مقدمه

لیشمانیوز گروهی از بیماریهای انگلی اند که به وسیله پروتوزوآ جنس لیشمانیا به وجود می آید، سه شکل این بیماری در انسان شامل لیشمانیوز پوستی، پوستی - مخاطی و احشایی (کالآزار) است. لیشمانیوز احشایی خطرناکترین شکل این بیماری است که در ۶۲ کشور جهان از جمله ایران اندمیک است. عامل لیشمانیوز احشایی *L. donovani* و *L. chagasi* می باشد و در نواحی مدیترانه ای و ایران این بیماری به وسیله گونه *L. infantum* به وجود می آید [۱-۲].

لیشمانیا دارای دو شکل مرفولوژیکی اصلی است: آماستیگوت که در ماکروفازهای میزبان پستاندار زندگی می کند و پروماستیگوت که در معده پشه خاکی رشد می کند. انگل توسط پشه خاکی ماده از جنس فلوتوموس^۱ و لوتزومیا^۲ به انسان منتقل می شود [۱]. کالآزار در انسان با تب نامنظم، بزرگی طحال، بزرگی کبد، هیپرگاماگلوبینمی^۳، کم خونی و لاغری مشخص می شود [۳]. اگر تشخیص و درمان این بیماری به موقع انجام نشود، ۹۵-۹۰ درصد مرگ به دنبال خواهد داشت [۴].

مخزن اصلی لیشمانیا اینفانتوم سگهاست، بجز ضایعات جلدی، ریزش مو، بزرگی و پیچیدگی ناخنها که علائم اختصاصی لیشمانیوز احشایی سگها (CVL)^۴ می باشند، علائم دیگر بیماری در سگها شبیه انسان است [۵].

کنترل CVL علاوه بر اهمیتی که در دامپزشکی دارد، از نظر پزشکی و بهداشتی (کنترل بیماری انسانی) نیز بسیار مهم می باشد. برای کنترل و پیشگیری کالآزار مبارزه با ناقلان، مفید به نظر نمی رسد [۶]؛ درمان سگها نیز علاوه بر هزینه زیاد و عود مجدد بیماری، سوش مقاوم انگل نسبت به دارو را ایجاد خواهد کرد [۷]؛ بنابراین با توجه به اینکه پس از بهبودی در انسان و سگ ایمنی حاصل می شود، واکسیناسیون سگها یکی از راههای مهم کنترل بیماری است [۸-۹]. یک واکسن مناسب علیه لیشمانیا به طور عمده باید پاسخ ایمنی از نوع Th۱ را باعث شود.

مطالعات انجام شده روی موش و انسان در ارتباط با ایمنولوژی لیشمانیا نشان می دهد که پس از ورود انگل به بدن بسته به شرایط میزبان، دو پدیده رخ می دهد: در حالت اول در حیواناتی که از نظر ژنتیکی مقاوم به انگلند سلولهای Th۱ القا

می گردند، این سلولها IFN- γ و IL-۲ را تولید می کنند و به دنبال آن انگل از بین می رود؛ در حالت دوم که در حیوانات حساس اتفاق می افتد، پاسخ Th۲ القا می شود، این امر با تولید IL-۴ و IL-۱۰، به تکثیر انگل و پیشرفت بیماری منتهی می گردد [۱۰-۱۱]. مطالعات در سگها نیز نشان می دهد که ظهور بیماری با افزایش آنتی بادی، عدم پاسخ سلولی و تولید IFN- γ و IL-۲ در ارتباط است [۱۲].

طی ده سال گذشته و در تحقیقات برای تهیه یک واکسن زیر واحدی مناسب چندین آنتی ژن محافظت کننده^۵ مثل Lcr [۱۳]، TSA [۱۴]، gp۶۳ [۱۵]، PSA [۱۶]، hsp۷۰ [۱۷]، LeIF [۱۸]، Lms۱۱ [۲۰]، هیستون H۱ [۲۱] و CPs [۲۲] شناسایی و به طور عمده در مدل موشی بر علیه انگل *L. major* مورد بررسی قرار گرفتند. در این تحقیق ما به منظور بررسی پتانسیل محافظت کنندگی سیستمین پروتئینهای نو ترکیب نوع I و II لیشمانیا اینفانتوم، ایمونوژیستیه این پروتئینها را در تعدادی سگ آلوده از منطقه مشکین شهر مطالعه کردیم. سیستمین پروتئینهای لیشمانیا، آندوپیتیدازهایی شبیه کاتپسینهای پستانداران می باشند که در لیروزوم بزرگی به نام مگازوم قرار دارند [۲۳]؛ این آندوپیتیدازها در شکل آماستیگوت و کمتر در متاسیکلیک پروماستیگوت بیان می شوند [۲۴]. در گونه های مختلف لیشمانیا به طور کلی سه گروه سیستمین پروتئیناز شناسایی شده اند که از این میان سیستمین پروتئینهای نوع I (CPB) و نوع II (CPA) از نظر ساختمانی شبیه کاتپسینهای L پستاندارانند [۲۵-۲۶]. در لیشمانیا مکزیکانا آنزیمهای نوع I به وسیله ۱۹ کپی ژن و در لیشمانیا دونوانی به وسیله ۵ کپی ژن که در یک توالی پشت سرهم قرار گرفته اند^۶، کد می شوند [۲۷-۲۸]. این نوع سیستمین پروتئینها دارای یک بخش گسترده حدود ۱۰۰ اسید آمینه ای در انتهای کربوکسی (CTE) می باشند که در کاتپسینهای پستانداران وجود ندارد [۲۹].

سیستمین پروتئینهای نوع II به وسیله یک ژن منفرد کد می شوند و دارای CTE کوتاه حدود ۱۰ اسید آمینه ای می باشند [۳۰]. علی رغم نامشخص بودن نقش دقیق سیستمین پروتئینها در لیشمانیا، نشان داده شده است که در بقای انگل داخل ماکروفازها نقش دارند؛ این نقش به گونه ای است که در حضور

1. Phlebotomus
2. Lutzomyia
3. Hypergammaglobulinemia
4. Canine Visceral Leishmaniasis (CVL)

5. Protective

6. Multicopy in a tandem array

مهارکننده‌های این آنزیمها رشد انگل متوقف می‌شود [۳۱]. از نظر ایمنولوژیکی بخش CTE سیستین پروتیناز نوع I هم احتمالاً در تغییر پاسخهای ایمنی و فرار از سیستم ایمنی میزبان نقش دارد [۳۲].

با توجه به نقشهای سیستین پروتینازها پتانسیل آنها به عنوان اهداف داروهای جدید و کاندیدای واکسن مورد توجه قرار گرفته است [۳۳]. در مطالعات قبلی به وسیله رأفتی و همکاران نشان داده شد که فرم طبیعی^۱ سیستین پروتینازهای لیشمانیا ماژور به وسیله لنفوسیت‌های انسان و موشهای آلوده شناسایی می‌گردد [۳۴، ۳۵]. همچنین افراد مبتلا یا بهبود یافته از لیشمانیوز پوستی پروتینهای نو ترکیب نوع I و II لیشمانیا ماژور را تشخیص می‌دهند [۳۶]. بر همین اساس در این مطالعه با بررسی پاسخهای ایمنی سلولی و همورال سگهای آلوده نسبت به CPA، rCPB و CTE، مشخص شد rCPB و CTE بخوبی به وسیله سیستم ایمنی این حیوانات شناسایی می‌شوند و در سگهای بدون علائم بالینی (مقاوم) می‌توانند سلولهای T را تحریک و باعث تولید میزان قابل توجهی IgG₂ شوند.

۲-۲-۲- تهیه پروتینهای نو ترکیب سیستین

پروتینازها

تکثیر ژنهای CPA و CPB لیشمانیا اینفانتوم با استفاده از پرایمرهایی که قبلاً برای تکثیر ژنهای CPA و CPB لیشمانیا ماژور طراحی شده بود [۳۶]، انجام شد. این مورد به طور مشروح در جای دیگری گزارش شده است [۳۷]. به طور اجمالی ژنهای CPs در یک مخلوط محتوی dNTP ۰/۲mM، ۰/۵mM MgCl₂، ۰/۱mM TrisHCl pH۸/۲ و ۰/۰۱٪ ژلانتین، Taq DNA polymerase ۲/۵Unit و ۱۰۰pmole از هر پرایمر و ۱۰μg از DNA ژنومیک در حجم کل ۵۰μl تکثیر شدند. شرایط تکثیر برای هر دو ژن یکسان و شامل ۳۰ سیکل (۹۵°C یک دقیقه، ۶۸°C دو دقیقه و ۷۲°C به مدت ۳ دقیقه) می‌باشد. محصول PCR با آنزیمهای BamHI و Hind III (تهیه شده از شرکت Roche آلمان) بریده و پس از خالص کردن آن با استفاده از کیت QIAGEN Agarose Gel Purification (ساخت شرکت Qiagen)، در ناقل pGEMII (تهیه شده از شرکت پرومگا^۴ کلون و به کمک پرایمرهای استاندارد TV و SP^۶ توالی آنها تعیین گردید. سپس ژنهای CPA و CPB به طور جداگانه در جایگاه اثر آنزیمهای BamHI و Hind III ناقل بیانی پروکاریوتی pET^۳ra (خریداری شده از شرکت نوواگن^۵ در پایین دست^۶ پروموتور TV کلون گردیدند.

مهارکننده‌های این آنزیمها رشد انگل متوقف می‌شود [۳۱]. از نظر ایمنولوژیکی بخش CTE سیستین پروتیناز نوع I هم احتمالاً در تغییر پاسخهای ایمنی و فرار از سیستم ایمنی میزبان نقش دارد [۳۲].

با توجه به نقشهای سیستین پروتینازها پتانسیل آنها به عنوان اهداف داروهای جدید و کاندیدای واکسن مورد توجه قرار گرفته است [۳۳]. در مطالعات قبلی به وسیله رأفتی و همکاران نشان داده شد که فرم طبیعی^۱ سیستین پروتینازهای لیشمانیا ماژور به وسیله لنفوسیت‌های انسان و موشهای آلوده شناسایی می‌گردد [۳۴، ۳۵]. همچنین افراد مبتلا یا بهبود یافته از لیشمانیوز پوستی پروتینهای نو ترکیب نوع I و II لیشمانیا ماژور را تشخیص می‌دهند [۳۶]. بر همین اساس در این مطالعه با بررسی پاسخهای ایمنی سلولی و همورال سگهای آلوده نسبت به CPA، rCPB و CTE، مشخص شد rCPB و CTE بخوبی به وسیله سیستم ایمنی این حیوانات شناسایی می‌شوند و در سگهای بدون علائم بالینی (مقاوم) می‌توانند سلولهای T را تحریک و باعث تولید میزان قابل توجهی IgG₂ شوند.

۲- مواد و روش کار

۲-۱- حیوانات

چهارده قلاده سگ آلوده از نژاد، سن و جنس مختلف از منطقه آندمیک مشکین شهر در شمال غربی ایران انتخاب شد، مدت آلودگی در این سگها نامشخص و آلودگی به وسیله آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم^۲، Dipstick rk^{۳۹}، وسترن بلات و روشهای انگل شناسی تأیید گردید. حیوانات بر اساس علائم بالینی به دو گروه تقسیم شدند: سگهای دارای علائم که شامل لاغری مفرط، بزرگی طحال، ریزش مو و زخمهای پوستی می‌باشد؛ سگهای بدون تظاهرات بالینی که هیچگونه علائمی نداشتند اما از نظر آلودگی مثبت بودند. سه قلاده سگ از نواحی غیر آندمیک به عنوان کنترل استفاده شدند.

۲-۲- آنتی ژنها

۲-۲-۱- تهیه آنتی ژن خام لیشمانیا اینفانتوم (F/T)

پروماستیگوت‌های لیشمانیا اینفانتوم (سوسوس

3. Freezing/Thawing (F/T)
4. Promega
5. Novagen
6. Downstream

1. Native
2. Direct Agglutination Test (DAT)

گردید؛ در ادامه برای بررسی خلوص، پروتئینها در ژل SDS-PAGE الکتروفورز و با کوماسی بلو رنگ آمیزی شدند.

۲-۲-۳- پپتید سنتزی^۶ CTE

این پپتید به طور شیمیایی به روش Solid Phase Fmoc Chemistry و بر مبنای اطلاعات راجر^۷ و همکاران به وسیله شرکت دیکتاجین^۸ در کشور سوئیس ساخته شده است [۳۹]. این پپتید دارای ۱۰۸ اسید آمینه است و از اسید آمینه ۲۰۹-۳۱۸ سیستئین پروتئیناز نوع I را شامل می شود.

۲-۳- الیزا

آنتیبادیهای ضد انگل لیشمانیا و سیستئین پروتئینازها، در سرم سگهای آلوده به روش الیزا اندازه گیری شدند. به پلیتهای ۹۶ خانه ای با جذب بالا^۹ (Nunc, UK) ۱۰۰ μl از غلظت ۱۰ μg/ml هر آنتی ژن (CTE, rCPB, rCPA, F/T) اضافه و به مدت یک شب در یخچال قرار داده شد، و پس از سه مرحله شستشو در بافر شستشو (PBS محتوی ۰/۰۵ توپین^{۱۰}، ۱۰۰ μl بافر بلوکه کننده (PBS محتوی ۱٪ آلبومین سرم گاوی) به چاهکها اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در ۳۷°C قرار گرفت، سپس ۱۰۰ μl سرم ۱:۲۰۰ رقیق شده در بافر بلوکه کننده حاوی ۰/۰۵ توپین ۱:۲۰ به هر چاهک اضافه و به مدت ۲ ساعت در ۳۷°C نگهداری شد، پس از سه مرحله شستشو، آنتیبادی ضد IgG_۱, IgG_۲ (شرکت بتیل)^{۱۱} سگ که با پراکسیداز کونژوگه شده بودند بترتیب با رقتهای ۱:۵۰۰۰، ۱:۵۰۰۰ و ۱:۵۰۰۰۰ به پلیت اضافه و ۲ ساعت در ۳۷°C قرار داده شد (غلظت بهینه کونژوگه ها در مطالعه اولیه تعیین شد). پس از شستشوی پلیتها، سوبسترای OPD^{۱۲} حل شده در بافر سیترات-فسفات ۰/۲M (pH ۴/۵) محتوی ۰/۰۳ پراکسید هیدروژن اضافه گردید و پس از ۲۰-۳۰ دقیقه واکنش با اضافه کردن اسید سولفوریک ۴M متوقف و جذب نوری در طول موج ۴۹۰nm به وسیله ELISA-Reader (ICN) اندازه گیری شد.

پلاسمیدهای حاوی این ژنها به باکتری *E. coli* سوش pLysS (BL۲۱(DE۳)) ترانسفورم شدند. برای بیان و تخلیص پروتئینهای نو ترکیب به ۱۰۰ ml محیط LB محتوی آمپی سیلین (۱۰۰ μg/ml) و کلرامفنیکل (۲/۵ μg/ml) از کشت شبانه کلون *pETrra-CPA* یا *pETrra-CPB* اضافه شد. سپس در انکوباتور ۳۷°C شیکردار قرار گرفت تا آنکه OD_{۶۰۰} محیط کشت به ۰/۸ رسید؛ سرانجام به محیط کشت ایزوپروپیل تیوگالاکتوزید^۱ با غلظت نهایی ۱ mM اضافه و به مدت ۴ ساعت دیگر نگهداری شد. پس از طی این مدت محیط کشت سانتریفوژ گردید (۴°C/۴ دقیقه ۳۳۰۰ g/۱) و رسوب باکتریایی در بافر لیزکننده (۱۰۰ mM NaCl، ۱۰ mM EDTA، ۵۰ mM Tris-HCl، pH ۸) حل و یک شب در ۲۰°C نگهداری شد. ذرات متراکم (IBS)^۲ محتوی پروتئینهای نو ترکیب با چند مرحله سانتریفوژ (۴°C/۴ دقیقه ۸۰۰۰ g/۲۰) در بافر شستشو (۱ mM EDTA، ۲۰ mM NaCl، ۲۰۸ mM Tris-HCl، pH ۸) جمع آوری و پروتئینهای نو ترکیب طی دو مرحله الکتروفورز در ژل SDS-PAGE و استفاده از رنگ آمیزی معکوس^۳ خالص گردید [۳۸]. به طور خلاصه آنکه IBS در بافر نمونه (۲۰ mM تریس ۶/۸ pH، ۱۰٪ سدیم دودسیل سولفات^۴، ۱۰٪ ۲-مرکاپتو اتانول، ۲۰٪ گلیسرول و ۰/۰۰۱٪ بروموفنل آبی) حل و پس از ۵ دقیقه جوشاندن، در ژل SDS-PAGE ۱۲/۵٪ الکتروفورز شد، بلافاصله پس از آن ژل به مدت ۵ دقیقه در کربنات سدیم ۱/۵٪ غوطه ور گردید، سپس به محلول ۰/۲M ایمیدازول حاوی ۰/۱٪ SDS منتقل و به مدت ۱۵ دقیقه به آرامی تکان داده شد. آنگاه محلول ایمیدازول خالی شد و ژل به مدت ۳۰ ثانیه در محلول ۰/۲M سولفات روی قرار گرفت تا نوارهای شفاف پروتئینی در زمینه کدر ژل ظاهر شدند. نوار مربوط به پروتئین نو ترکیب جدا و در محلول کربنات آمونیوم ۰/۲M حاوی ۰/۰۰۱٪ SDS قرار گرفت. سوسپانسیون حاصل یک شب روی همزن قرار گرفت، سپس با نیروی ۳۳۰۰ g در دمای ۴°C به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ و محلول رویی آن جمع شد؛ محلول به دست آمده با استفاده از فیلتراسیون با فشار بالا^۵ به وسیله دستگاه فیلتر کننده آمیکون (MWCO: ۱۰KD) تغلیظ و در مقابل PBS دیالیز

6. Synthetic peptide

7. Roggero

8. Dictagene

9. Maxisorb

10. Tween

11. Bethyl Laboratories, INC, Montgomery, USA

12. O-Phenylenediamine (OPD)

1. Isopropylthiogalactoside (IPTG)

2. Inclusion Bodies (IBS)

3. Imidazole-SDS-Zn Reverse Staining

4. Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

5. Ultrafiltration

۲-۴- اندازه گیری پروليفراسيون لنفوسيتها^۱

سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC)^۲ از خون هپارینه سگها، روی فایکول (ساخت شرکت سیگما)^۳ و با استفاده از سانتریفوژ (۲۵°C/۲ دقیقه ۸۰۰g/۳۰) جدا شد، پس از دو بار شستشو در RPMI-۱۶۴۰ تعداد و درصد زنده بودن سلولها با استفاده از رنگ تریپان بلو تعیین گردید. سپس PBMC در پلیت ۹۶ خانه‌ای (Costar) با تعداد 3×10^5 سلول در هر چاهک در حضور ۵۰ μg/ml rCPB، ۵۰ μg/ml rCPA، ۵۰ μg/ml F/T، ۲۰ μg/ml CTE و بدون آنتی‌ژن^۴ و فیتوهمگلوتنین^۵ و بدون آنتی‌ژن در RPMI حاوی ۱۵٪ سرم غیرفعال شده سگ نرمال، ۲mM آل-گلوتامین، ۱۰۰mM HEPES، ۱۰۰ μl/ml جتتامایسین (Sigma, USA) و ۱٪ درصد بتامرکاپتوتانول کشت داده شد و به مدت ۵ روز در انکوباتور ۳۷°C و ۵٪ CO₂ قرار گرفت. سپس ۰/۵ μCi تیمیدین تریتومدار^۶ (Amersham, UK) به هر چاهک اضافه و ۱۶ ساعت دیگر در همان شرایط نگهداری شد، پس از طی زمان مورد نظر سلولها به وسیله دستگاه سل هاروستر^۷ (LKB) روی فیلترهای فایبرگلاس^۸ (WALLAC, Turk, Finland) منتقل و میزان اتصال تیمیدین رادیواکتیو به وسیله دستگاه بتاکانتر^۹ (ساخت شرکت فارماسیا)^{۱۰} اندازه گیری شده و ضریب تحریک^{۱۱} براساس نسبت پروليفراسيون در حضور آنتی‌ژن به میزان پروليفراسيون در

غیاب آنتی‌ژن محاسبه و SI بزرگتر از ۲/۵ به عنوان پاسخ مثبت در نظر گرفته شد.

۲-۵- محاسبات آماری

تفاوت پاسخهای سلولی و هومورال سگهای آلوده با استفاده از t-test محاسبه و در صورت $p < 0/05$ تفاوت معنادار در نظر گرفته شد.

۳- نتایج

۳-۱- سگهای حساس و مقاوم

سگهای آلوده براساس بررسیهای بالینی و انگل شناسی به دو گروه تقسیم شدند: سگهای دارای علائم یا حساس به تعداد هفت قلاده و سگهای علائم یا مقاوم به تعداد ۷ قلاده. بیماری در هر دو گروه با استفاده از DAT و Dipstick تأیید شد. همه سگهای دارای علائم از نظر انگل شناسی مثبت بودند و علائمی از قبیل زخمهای پوستی، لاغری مفرط، ریزش مو و پیچیدگی ناخنها با درصد متفاوتی در آنها مشاهده می شد (نتایج مشاهدات در جدول ۱ ارائه شده است).

جدول ۱ نمایشی از تقسیم بندی سگها براساس شواهد فیزیکی و تستهای DAT و Dipstick

بزرگی و پیچیدگی ناخنها	لاغری مفرط	ریزش مو	ضایعات پوستی	وجود انگل در طحال	Dipstick rK39	آگلوتیناسيون مستقیم DAT	آزمایش+علائم گروه
٪۲۸	٪۱۰۰	٪۸۵	٪۴۲	٪۱۰۰	٪۸۵	* ٪۱۰۰	دارای علائم
هیچکدام	هیچکدام	هیچکدام	هیچکدام	تعیین نشد	٪۸۵	٪۸۵	بدون علائم

* تعداد حیوانات با تست مثبت یا علائم به صورت درصدی از گروه بیان شده‌اند.

وزن مولکولی rCPB و rCPA بترتیب ۲۸ و ۳۵ کیلو دالتون می باشد، وزن ملکولی پپتید سنتزی CTE ۱۳kd است که اسید آمینه‌های ۳۱۷-۲۰۹ CPB را شامل می شود. (شکل ۱ الف و ب).

۳-۲- تهیه آنتی‌ژنهای نو ترکیب

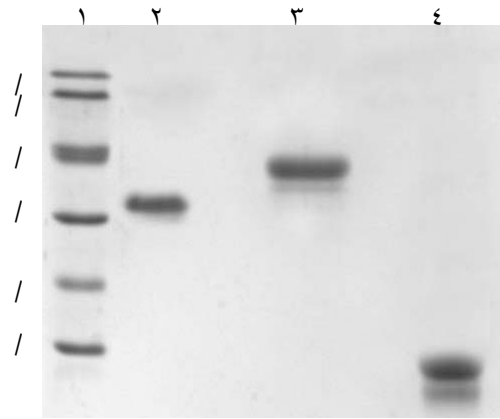
سیستین پروتئین‌های نو ترکیب با استفاده از روشهای ذکر شده در قسمت ۲-۲-۲ خالص گردیدند و خلوص آنها در ژل SDS-PAGE و سپس رنگ آمیزی با کوماسی بلو بررسی شد.

۳-۳- پاسخهای هومورال (IgG کل، IgG_۱ و

IgG_۲)

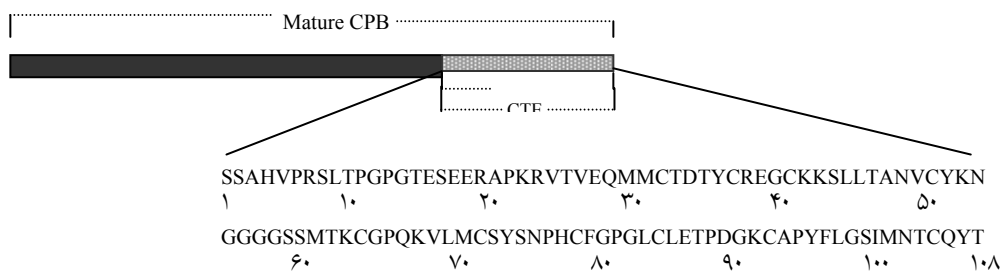
سرم چهارده قلاده سگ آلوده با استفاده از الیزا برای تعیین IgG کل و زیرکلاسهای آن علیه F/T، rCPA، rCPB بررسی شد. همانگونه که در شکل ۲-الف نشان داده شده است در همه

1. Lymphocyte proliferation Assay
2. Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC)
3. Histopaque 1077, Sigma, USA
4. Phytohemagglutinin (PHA)
5. [³H] Thymidine
6. Cell Harvester
7. Glassfibre Filter
8. β Liquid Scintillation Counter
9. Pharmacia
10. Stimulation Index (SI)

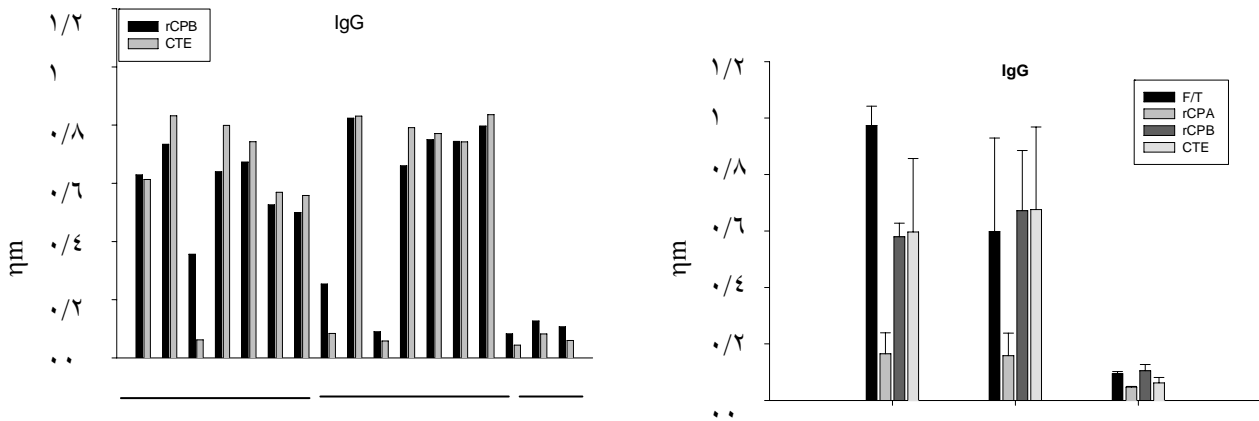


شکل ۱ الف بررسی الکتروفورزی سیستین پروتئینازهای نوترکیب A و B و خالص شده و پپتید سنتزی CTE. پروتئینها در ژل پلی آکریل آمید ۱۵٪ الکتروفورز و سپس با کوماسی بلورنگ آمیزی شدند. ستونها: ۱. مارکر وزن مولکولی (kD). ۲. rCPA. ۳. rCPB. ۴. CTE.

سگها بالاترین میزان IgG کل مربوط به F/T می باشد (در سگهای بدون علائم 0.97 ± 0.68 و در سگهای دارای علائم CPB و CPA سیستین پروتئینازهای نوترکیب CPA و CPB به طور متفاوتی به وسیله سیستم ایمنی هر دو گروه حیوانات شناسایی می شوند به طوری که پاسخ هومورال بر علیه rCPB بسیار بیشتر از rCPA است. پاسخ IgG علیه CTE شبیه به rCPB می باشد (شکل ۲-ب). میزان آنتی بادی علیه این آنتی ژنها در سگهای طبیعی بسیار پایین است و برای rCPA، rCPB و CTE بترتیب 0.62 ± 0.191 ، 0.105 ± 0.022 ، 0.437 ± 0.015 می باشد.



شکل ۱ ب نمایش شماتیک CPB بالغ و ردیف اسیدهای آمینه CTE. CPB بالغ در لیشمانیا حدود ۳۲۶ اسید آمینه دارد که حدود ۱۰۸ تای آن مربوط به انتهای کربوکسیل یا CTE است. ردیف اسیدهای آمینه ناحیه CTE با علائم یک حرفی ذکر شده است. اعداد زیر حروف نشان دهنده شماره اسیدهای آمینه هستند.



ب مقایسه IgG همه سگها به rCPB و CTE.

الف پاسخ IgG سگهای طبیعی (۳ قلاده) و سگهای آلوده (۷ قلاده دارای علائم و ۷ قلاده بدون علائم) به F/T، rCPA، rCPB، CTE. اطلاعات در هر گروه به صورت میانگین جذب نوری در $490 \text{ nm} \pm$ انحراف معیار بیان شده اند.

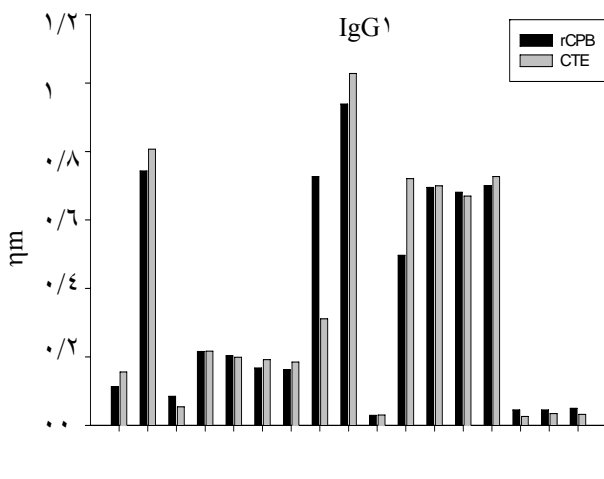
شکل ۲ پاسخ IgG سگها به F/T، rCPA، rCPB و CTE لیشمانیا اینفانتوم.

rCPA پایین است (سگهای دارای علائم 0.114 ± 0.123 بدون علائم 0.137 ± 0.118)، میزان IgG علیه rCPB و CTE در شکل ۳-ب مقایسه شده است. این میزان علیه rCPB و CTE بویژه در ۶ سگ (شماره ۲، ۹، ۱۱، ۱۲، ۱۳ و ۱۴) بالاست.

میزان IgG علیه چهار آنتی ژن در شکل ۳-الف نشان داده شده است. میزان IgG علیه F/T ناهمگونتر از بقیه آنتی ژنهاست و فقط شش سگ جذب بالاتر از ۰/۵ دارند (سگهای دارای علائم 0.55 ± 0.33 و بدون علائم 0.67 ± 0.37). میزان IgG نیز علیه

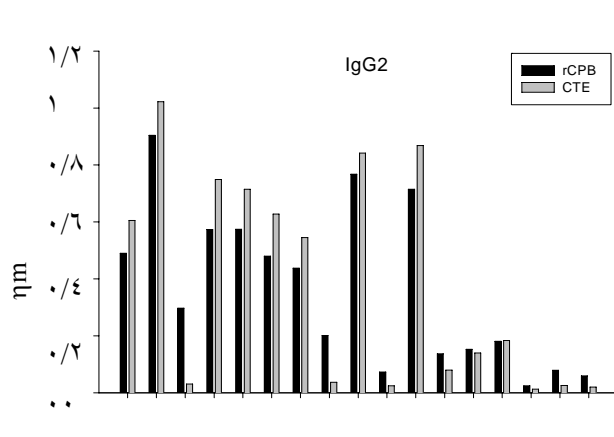
در تمام سگها بجز سگ شماره ۸ و ۱۱ میزان IgG_1 علیه CTE و (0.51 ± 0.13) و CTE (در سگهای دارای علایم 0.35 ± 0.38 و بدون علایم 0.3 ± 0.61) به مقدار زیادی بالاست. بجز سه نمونه (سگهای شماره ۳، ۸ و ۱۰) در بقیه سگها میزان IgG_2 علیه CTE بیشتر از rCPB است.

در سگهای دارای علایم میزان IgG_1 علیه rCPB و CTE بیشتر از IgG_2 است ($P < 0.05$). برعکس در حیوانات بدون تظاهرات بالینی IgG_2 علیه rCPB، F/T و CTE بیشتر از IgG_1 است ($P < 0.05$).



ب مقایسه IgG_1 همه سگها به rCPB و CTE.

شکل ۳ پاسخ IgG_1 سگها به F/T، rCPA، rCPB و CTE لیشمانیا اینفانتوم.

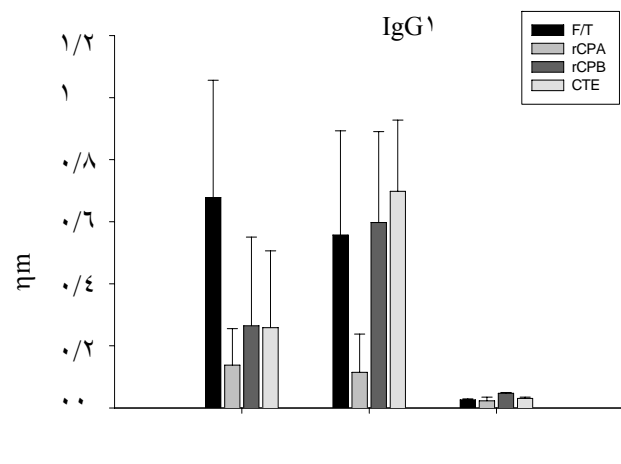


ب مقایسه IgG_2 همه سگها به rCPB و CTE.

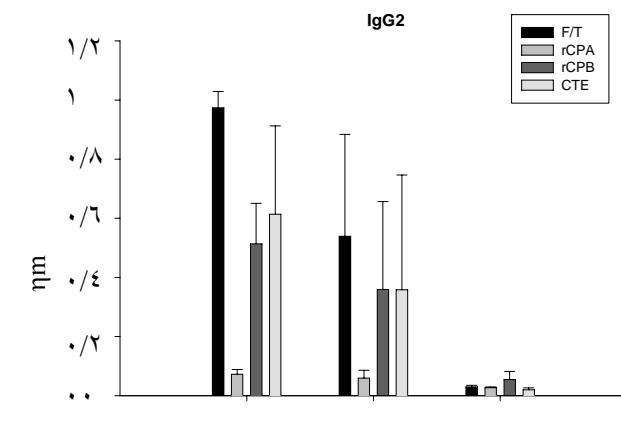
شکل ۴ پاسخ IgG_2 سگها به F/T، rCPA، rCPB و CTE لیشمانیا اینفانتوم.

در تمام سگها بجز سگ شماره ۸ و ۱۱ میزان IgG_1 علیه CTE و rCPB مشابه است.

شکل ۴- الف میزان IgG_2 علیه هر کدام از آنتی ژنها را نشان می دهد، الگوی IgG_2 علیه F/T همانند IgG_1 کل علیه این آنتی ژن است (برای سگهای دارای علایم 0.54 ± 0.34 و بدون علایم 0.97 ± 0.05)، میزان IgG_2 علیه rCPA همانند IgG_1 و IgG_1 کل پایین است. برخلاف rCPA، میزان IgG_2 علیه rCPB (در سگهای دارای علایم 0.36 ± 0.29 و بدون علایم



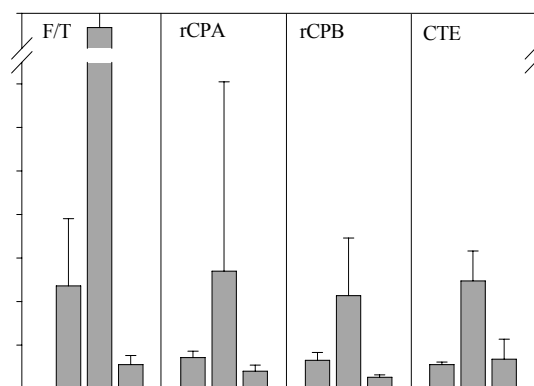
الف پاسخ IgG_1 سگهای طبیعی (۳ قلاده) و سگهای آلوده (۷ قلاده دارای علایم و ۷ قلاده بدون علایم) به F/T، rCPA، rCPB و CTE. اطلاعات در هر گروه به صورت میانگین جذب نوری در $490 \pm$ انحراف معیار بیان شده اند.



الف پاسخ IgG_2 سگهای طبیعی (۳ قلاده) و سگهای آلوده (۷ قلاده دارای علایم و ۷ قلاده بدون علایم) به F/T، rCPA، rCPB و CTE. اطلاعات در هر گروه به صورت میانگین جذب نوری در $490 \pm$ انحراف معیار بیان شده اند.

۳-۴- پرولیفراسیون لنفوسیتها

PBMC هر دو گروه سگها در اثر فیتوهمگلوتنین به طور مشابهی تکثیر یافتند که نشان دهنده پاسخ غیر اختصاصی لنفوسیتها می باشد. بررسی پاسخ سلولی علیه rCPA، rCPB، F/T و CTE نشان داد در سگهای دارای علائم پاسخ سلولی علیه هر چهار آنتی ژن بسیار پایین است اما سگهای بدون علائم پرولیفراسیون خوبی را در برابر آنتی ژنها نشان دادند. SI این سگها نسبت به F/T از ۹/۳۳-۸۷/۷ متغیر بود (۳۴/۲۶ ± ۴۵/۸۸) که به طور معناداری از SI سگهای دارای علائم (۳/۰۹ ± ۴/۷) و سگهای نرمال (۰/۴۲ ± ۱/۱) بالاتر است ($P < 0.05$)؛ همچنین سگهای بدون علائم پاسخهای سلولی بالاتری را علیه آنتی ژنهای خالص rCPB و CTE نسبت به سگهای دارای علائم نشان دادند ($P < 0.05$)؛ جالب توجه اینکه پاسخ سلولی علیه CTE همانند پاسخهای هومورال، شبیه پاسخ سلولی علیه rCPB است. پاسخ سلولی علیه rCPA در دو گروه سگها معنادار نبود ($P > 0.05$).



شکل ۵ پاسخ پرولیفراسیون لنفوسیتهای سگها بعد از ۵ روز انکوباسیون در حضور F/T، rCPA، rCPB و CTE. اطلاعات در هر گروه به صورت میانگین ضربت تحریک ± انحراف معیار بیان شده اند.

۴- بحث

بررسی پاسخهای سلولی و هومورال سگهای آلوده به لیشمانیا اینفانتوم نسبت به سیستمین پروتئینهای نوترکیب تفاوتی را در سگهای بدون تظاهرات بالینی و سگهایی با علائم بیماری نشان می دهد. میزان IgG کل و زیر کلاسهای IgG₁ و IgG₂ علیه F/T در هر دو گروه سگها بیشتر از آنتی بادی ضد آنتی ژنهای نوترکیب سیستمین پروتئیناز است. پاسخ ایمنی هومورال علیه rCPA در همه حیوانات کمتر از آنتی بادی ضد

rCPB است. علاوه بر این، نتایج ما نشان می دهد که میزان IgG₂ ویژه آنتی ژنهای نوترکیب (CTE، rCPB، rCPA) و آنتی ژن خام لیشمانیا اینفانتوم، در سگهای بدون تظاهرات بالینی بیشتر از میزان این آنتی بادی در سگهای دارای علائم می باشد. در حیوانات دارای تظاهرات بالینی میزان IgG₁ ویژه rCPB و CTE بیشتر از IgG₂ است.

پاسخهای هومورال سگهای آلوده نسبت به آنتی ژنهای خام لیشمانیا به وسیله تعدادی از محققان بررسی شده است [۴۰-۴۲]. پاسخ IgG علیه تعدادی از پروتئینهای نوترکیب لیشمانیا اینفانتوم (HSP۷۰، HSP۸۳، P۲a، P۲b، P۰، H۲A، H۳، KMP۱۱) به وسیله نیتو^۱ و همکاران مطالعه شده است، براساس نتایج آنها در سگهای آلوده شده به طور تجربی، پاسخ هومورال علیه HSP۷۰ در مراحل اولیه بیماری ظاهر می شود و میزان IgG بالا بر ضد پروتئینهای هیستونی H۲A و H۳ نشانه پیشرفت بیماری است [۴۳]. زیرکلاسهای IgG اختصاصی لیشمانیا اینفانتوم اولین بار به وسیله دیپلازس^۲ در سگهای دارای علائم بالینی و درمان شده با گلوکانتیم مورد مطالعه قرار گرفت.

در این مطالعه نشان داده شد که در تمام حیوانات در شروع بررسی میزان هر دو IgG₁ و IgG₂ بالاست اما پس از درمان میزان IgG₁ کاهش یافته و IgG₂ ثابت باقی می ماند [۴۴]. در تحقیق دیگری به وسیله گیچرو^۳ و همکاران گزارشی شده است که فقط وجود آنتی بادی ضد لیشمانیا نشان دهنده پیشرفت بیماری و به وجود آمدن تظاهرات بالینی نیست زیرا در تمام حیوانات آلوده پاسخ ایمنی هومورال شدیدی علیه آنتی ژنهای لیشمانیا وجود دارد [۴۵]. نتایج ما تأییدکننده گزارشهای این محققان است. علاوه بر این، نتایج گزارش شده به وسیله دیپلازس از سگهای آلوده شده با لیشمانیا اینفانتوم نشان داده است که IgG₂ با نبود تظاهرات بالینی و IgG₁ با پیشرفت بیماری و ظهور علائم بالینی در ارتباط است [۴۴]. در نتایج ما نیز میزان IgG₂ علیه تمام آنتی ژنها در سگهای بدون تظاهرات بالینی بیشتر از IgG₁ است و برعکس در حیوانات دارای علائم میزان IgG₁ بالاتر است. مطالعات زیادی وجود دارد که زیر کلاسهای IgG را با پاسخ Th۱/Th۲ در ارتباط می دانند. در موش پاسخ Th۱ با IgG₂ و پاسخ Th۲ با IgG₁ مرتبط است [۴۶-۴۸]، با وجود این، مکانیسم ایمنولوژیکی که باعث مقاومت یا حساسیت در لیشمانیوز احشایی می گردد، مشخص نشده است؛ برخلاف مدل موشی *L. major* که پاسخ Th۱ در مقاومت و Th۲ در حساسیت

1. Nieto
2. Deplazes
3. Gicheru

داده شده است که CPA و CPB لیشمانیا ماژور پاسخهای Th₁ را در بیماران مبتلا به لیشمانیوز ناشی از *L. guyanensis* القا می‌کنند [۵۰].

نتایج تحقیق ما برای اولین بار نشان می‌دهد که CPB می‌تواند به وسیله سیستم ایمنی هومورال و سلولی سگهای آلوده بخوبی شناسایی شود و تولید زیر کلاس IgG₂ و پرولیفراسیون لنفوسیتها را در سگهای مقاوم باعث گردد. افزون بر آن، در مطالعه حاضر نشان داده شد که پاسخ هومورال و سلولی CTE و CPB تقریباً یکسان است. با توجه به اینکه CTE بخش انتهایی سیستمین پروتئیناز نوع I می‌باشد، به نظر می‌رسد که بخش اعظم ایمونژنیسته CPB مربوط به این ناحیه باشد. اگرچه نیاز است اطلاعات بیشتری بخصوص در مورد مدل انسانی به دست آید، اما این امکان وجود دارد که در آینده CTE به جای rCPB به عنوان ایمونوژن استفاده گردد؛ به ویژه اینکه CTE را می‌توان به صورت فوق‌العاده خالص سنتز کرد.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از خانمها یاسمن تسلیمی و فاطمه دوستداری برای همکاری در اجرای آزمایشها و همکاران محترم ایستگاه تحقیقات بهداشتی مشکین شهر خصوصاً آقای ذبیح‌الله زارعی به علت همکاری در تهیه نمونه از سگهای آلوده اعلان دارند. مطالعه فوق با استفاده از گرانت سازمان بهداشت جهانی (شماره A1۰۱۱۵) و انستیتو پاستور ایران (شماره ۱۸۵) به دکتر رأفتی انجام شده است.

نسبت به بیماری نقش دارد، نقش این رده‌های سلولی در لیشمانیوز احشایی انسان و سگ مشخص نیست، به نظر می‌رسد ترکیبی از Th₁ و Th₂ در این بیماری دخالت داشته باشد. بررسی پاسخهای سلولی حیوانات آلوده نشان‌دهنده مهار پاسخ سلولی سگهای دارای تظاهرات بالینی نسبت به تمام آنتی‌ژنهای نوترکیب می‌باشد. نبود ایمنی سلولی که بیانگر مهار ایمنی می‌باشد به وسیله بسیاری از محققان دیگر نیز در سگهای دارای علائم نشان داده شده است [۸، ۱۲، ۴۲، ۴۹].

در مطالعه حاضر، نیز سگهای بدون تظاهرات بالینی که نسبتاً به بیماری مقاومند پرولیفراسیون قابل ملاحظه‌ای در مقابل rCPB و CTE داشتند؛ این پرولیفراسیون به طور معناداری بیشتر از پرولیفراسیون سگهای دارای علائم بود اما پاسخهای ایمنی بر علیه rCPA در تمام حیوانات پایین است. علت تفاوت پاسخ ایمنی بر علیه این دو سیستمین پروتئیناز احتمالاً این است که: ۱- در ژنوم لیشمانیا ژنهای CPB چندین بار تکرار شده‌اند در حالی که ژن CPA تک کپی می‌باشد، این خصوصیت ممکن است باعث بیان و عرضه بیشتر CPB به سیستم ایمنی میزبان گردد؛ ۲- CPB برخلاف CPA دارای ناحیه CTE می‌باشد که باعث ایمونژنیسته بیشتر آن می‌شود؛ ۳- قطعه CTE در کاتپسینهای پستانداران کد نمی‌شود که خود سبب آنتی‌ژنیسته بیشتر CPB لیشمانیا برای سیستم ایمنی میزبان پستاندار می‌گردد.

در مطالعات قبلی به وسیله رأفتی و همکاران گزارش شده است که سیستمین پروتئینازهای طبیعی تخلیص شده از آماستیگوتهای لیشمانیا ماژور باعث تکثیر سلولهای تک هسته‌ای بیماران بهبود یافته از لیشمانیوز پوستی شده و تولید IFN- γ به وسیله این سلولها را باعث می‌گردند [۳۵]. بتازگی هم نشان

۶- منابع

- [1] Herwldt BL. Leishmaniasis. Lancet 1999; 354: 1191-9.
- [2] Desjeux P. Leishmaniasis: public health aspects and control. Clin. Dermatol. 1996; 14: 417-23.
- [3] Abranches P, Santos-Gomes G, Rachamin N, Campino L, Schnur L, Jaffe CL. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. Parasite Immunol. 1991; 13: 537-50.
- [4] Nadim A. Present status of kala-azar in Iran. Am J. Trop. Med. Hyg. 1978; 27: 25-8.
- [5] Bettini S, Gradoni L. Canine leishmaniasis in the Mediterranean area and its implications for human leishmaniasis. Insect. Sci. Appl. 1986; 7: 241-5.
- [6] Duan S, Frommel D, Monjour L, Ogunkolade BW, Cruz A, Quilici M. Vaccination trials against canine visceral leishmaniasis. Parasite Immunol. 1989; 11: 397-402.
- [7] Tesh RB. Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to changes strategies? Am. J. Trop. Med. Hyg. 1995; 52: 287-92.

- [8] Cabral M, O'Grady JE, Alexander J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunol.* 1992; 14: 531-9.
- [9] Cabral M, O'Grady JE, Gomes S, Sousa JC, Thompson H, Alexander J. The immunology of canine leishmaniasis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Vet. Parasitol.* 1998; 76: 173-80.
- [10] Liew FY, O'Donnell CA. Immunology of leishmaniasis. *Adv Parasitol* 1992; 32: 161-259.
- [11] Locksley RM, Louis JA. Immunology of leishmaniasis. *Curr. Opin. Immunol.* 1992; 4: 413-8.
- [12] Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenhaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenbergh J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.* 1994; 62: 229-35.
- [13] Wilson ME, Young BM, Andersen KP, Weinstock JV, Metwali KM, Donelson JE. A recombinant *Leishmania chagasi* antigen that stimulates cellular immune responses in infected mice. *Infect. Immun.* 1995; 63: 2062-69.
- [14] Web JR, Campos-Neto A, Owendale PJ, Martin TI, Stromberg EJ, Badaro R, et al. Human and murine immune responses to a novel *L. major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infect. Immun.* 1998; 66: 3279-89.
- [15] Connell ND, Medina-Acosta E, McMaster WR, Blomm BR, Russell D. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant Bacilli Calmette Guerin expressing the *Leishmania* surface protein gp63. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993; 90: 11437-47.
- [16] Sjolander A, Baldwin TM, Curtis JM, Handman E. Induction of a Th1 immune response and simultaneous lack of activation of a Th2 response are required for generation of immunity to leishmaniasis. *J. Immunol.* 1998; 160: 3949-57.
- [17] Skeiky YAW, Benson DR, Guderian JA, Whittle JA, Bacelar O, Carvalho EM, et al. Immune responses of leishmaniasis patients to heat shock proteins of *Leishmania* species and humans. *Infect. Immun.* 1995; 63: 4105-14.
- [18] Skeiky YAW, Kennedy M, Kaufman D, Borges MM, Guderian JA, Scholler JK, et al. LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. *J. Immunol.* 1998; 161: 6171-9.
- [19] Campos-Neto A, Soong L, Cordova JL, Sant'Angelo D, Skeiky YAW, Ruddle NH, et al. Cloning and expression of a *Leishmania donovani* gene instructed by a peptid isolated from major histocompatibility complex class II molecules of infected macrophages. *J. Exp Med.* 1995; 182: 1423-33.
- [20] Web JR, Kaufman D, Campos-Neto A, Reed SG. Molecular cloning of a novel protein antigen of *Leishmania major* that elicits a potent immune response in experimental murine leishmaniasis. *J. Immunol.* 1996; 157: 5034-41.
- [21] Solioz N, Blum-Tirouvanziam U, Jacqute R, Rafati S, Corradin G, Mauel J, et al. The protective capacities of histone H1 against experimental murine cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* 1999; 18: 850-9.
- [22] Rafati S, Kariminia A, Seyd Eslami S, Narimani M, Taheri T, Lebbatard M. Recombinant cysteine protease-based vaccine against *Leishmania major* in BALB/c mice: the role partial protection relies on interferon gamma CD8⁺ T lymphocyte activation. *Vaccine* 2002; 20: 2439-47.
- [23] Pupkis M, Tetely L, Coombs G. *Leishmania mexicana*: amastigote hydrolases in unusual lysosome. *Exp. Parasitol.* 1986; 62: 29-39.
- [24] Coombs GH. Proteinases of *Leishmania mexicana* and other flagellate protozoa. *Parasitology* 1982; 84: 149-55.

- [25] Mottram JC, Robertson CD, Coombs GH, Barry JD. A developmentally regulated cysteine proteinase gene of *Leishmania mexicana*. Mol. Microbiol. 1992; 6: 1925-32.
- [26] Rafati S, Fasel N, Masina S. *Leishmania* cysteine proteinases: from gene to subunit vaccine Curr. Genom. 2003; 4: 109-21.
- [27] Souza A, Waugh S, Coombs GH, Mottram JC. Characterization of a multi-copy gene for a major stage-specific cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. FEBS Lett. 1992; 311: 124-7.
- [28] Mundodi V, Somanna A, Farrell PJ, Gedamu L. Genomic organization and expression of differentially regulated cysteine protease genes of *Leishmania donovani* complex. Gene 2002; 282: 257-65.
- [29] Mottram JC, North MJ, Barry JD, Coombs GH. A cysteine proteinase cDNA from *Trypanosoma brucei* predicts an enzyme with an unusual C-terminal extension. FEBS Lett. 1989; 258: 211-5.
- [30] Traub-Cseko YM, Duboise M, Boukai LK, McMahon-pratt D. Identification of two distinct cysteine proteinase genes of *Leishmania pifanoi* axenic amastigotes using the polymerase chain reaction. Mol. Biochem. Parasitol. 1993; 57: 101-16.
- [31] Coombs GH, Baxter J. Inhibition of *Leishmania* amastigote growth by antipain and leupeptin. Ann. Trop. Med. Parasitol. 1984; 78: 215-24.
- [32] Mottram JC, Brooks DR, Coombs GH. Role of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. Curr. Opin. Microbiol. 1998; 1: 455-60.
- [33] Coombs GH, Mottram JC. Parasite proteinases and amino acid metabolism: possibility for chemotherapeutic exploitation. Parasitology 1997; 114: 61-80.
- [34] Rafati S, Couty-Jouve S, Alimohammadian MH, Louis JA, Biochemical analysis and immunogenicity of *Leishmania major* amastigote fractions in cutaneous leishmaniasis. Clin. Exp. Immunol. 1997; 110: 203-11.
- [35] Rafati S, Abraham-Baba A, Bakhshayesh M, VaFa M. Vaccination of BALB/c mice with *Leishmania major* amastigote-specific cysteine proteinase. Clin. Exp. Immunol. 2000; 120: 134-8.
- [36] Rafati S, Salmanian A, Hashemi K, Schaff C, Belli S, Fasel N. Identification of *Leishmania major* cysteine proteinases as targets of the immune response in human. Mol. Biochem. Parasitol. 2001; 113: 35-43.
- [37] Rafati S, Nakahae A, Salmanian A, Jimenez M, Ghashghaii A, Mohebbali M, et al. Cysteine proteinase type I and II of *Leishmania infantum* are recognized by sera during canine and human visceral leishmaniasis. Exp. Parasitol. 2003; 103: 143-51.
- [38] Ortiz ML, Calero M, Patron CF, Castellanos L, Mendez E, Imidazole-SDS-Zn reverse staining of proteins in gels containing or not SDS and microsequencing of individual unmodified electroblotted proteins. FEBS Lett. 1992; 296: 300-4.
- [39] Roggero MA, Servis C, Corradin G. A simple and rapid procedure for the purification of synthetic polypeptides by a combination of affinity chromatography and methionine chemistry. FEBS Lett. 1997; 408: 285-8.
- [40] Carrera L, Fermin ML, Tesouro M, Gracia P, Rollan E, Gonzalez JL. Antibody response in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*: infection course antigen markers. Exp. Parasitol. 1996; 82: 139-46.
- [41] Acedo-Sanchez C, Morillas-Marquez F, Sanchiz-Marin MC, Martin-Sanchez J. Changes in antibody titres against *Leishmania infantum* in naturally infected dogs in southern Spain. Vet. Parasitol. 1996; 75: 1-8.
- [42] Rhalem A, Sahibi H, Guessous-Idrissi N, Lasri S, Natami A, Riyad M, et al. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally

- and experimentally infected with *Leishmania infantum*. Vet. Parasitol. 1999; 81: 173-84.
- [43] Nieto CG, Garcia-Alonso M, Requena JM, Mirom C, Soto M, Alonso C, et al. Analysis of humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. Vet. Immunol. Immunopathol. 1999; 67: 117-30.
- [44] Deplazes P, Smith NC, Arnold P, Lutz H, Eckert J. Specific IgG1 and IgG2 antibody response of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. Parasite Immunol. 1995; 17: 451-8.
- [45] Gicheru MM, Olobo JO, Kariuki TM, Adhiambo C. Visceral leishmaniasis in vervet monkeys: immunological responses during asymptomatic infection. Scand. J. Immunol. 1995; 41: 202-20.
- [46] Reed S, Scott P. Tcell cytokine response in leishmaniasis. Curr. Opin. Immunol. 1993; 5: 542-31.
- [47] Kawano Y, Noma T, Yata J. Regulation of human IgG subclass production by cytokines
- IFN- γ and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in induction of IgG2. J. Immunol. 1994; 153: 4948-58.
- [48] Miralles GD, Stoeckle MY, McDermott DF, Finkelman FD, Murray HW. Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. Infect. Immun. 1994; 62: 1058-63.
- [49] Launa RD, Vuotto ML, Ielpo MTL, Ambrosio R, Piantedosi D, Moscaticello V, et al. Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. Vet. Immunol. Immunopathol. 1999; 70: 95-103.
- [50] Pascalis H, Lavergne A, Bourrea E, Prevost-Linguet G, Kariminia A, Pradinaud R, Rafati S, et al. Th1 cell development induced by cysteine proteinases A and B in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. Infect. Immun. 2003; 71: 2924-6.