Archive of SID

نشریه علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی البرز، دوره ۵، شماره ۱، زمستان ۱۳۹۴، صفحات ۳۹-۳۴

ارزیابی ایمنی زایی پپتید $EgP\text{-}29_{aa134\text{-}142}$ مشتق از «اکینوکوکوس گرانولوزوس» در موش‌های نژاد BALB/c

شیوا جعفری[1*]، مجید اسمعیلی زاد[2]، علیرضا رفیعی[3]، رقیه مصری[4]، مژگان احمدزاده[4]، سمیه محمدی[4]

[1] کارشناس ارشد ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ایران
[2] استادیار ژنتیک،موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی حصارک کرج، البرز، ایران
[3] استاد ایمونولوژی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ایران
[4] کارشناس ارشد ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی کرج، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۹۴/۵/۱۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۰/۵

چکیده

زمینه و هدف: هیداتیدوزیس یا بیماری کیست هیداتید از جمله مهمترین بیماری‌های انگلی مشترک بین انسان ودام است که در اثر آلودگی با لارو انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس ایجاد می‌شود. پروتئین p29 با وزن مولکولی ۲۹ کیلودالتون از آنتی‌ژن های اختصاصی پروتواسکولکس این انگل بوده که به علت داشتن واکنش متقاطع با آنتی‌ژن اصلی تشخیصی این انگل به نام Ag5 کاندید استفاده درتشخیص بیماری و تهیه واکسن می‌باشد. در این مطالعه نواحی اپیتوپی این پپتید پس از شناسایی و سنتز به منظور بررسی اثر تحریکی و سنجش پاسخ ایمنی در مدل موشی به کار گرفته شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ابتدا نواحی اپیتوپی آنتی‌ژن p29 انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس توسط نرم‌افزار بیوانفورماتیکی IEDB شناسایی شده و درغالب توالی ۸ آمینواسیدی سنتز گردید و به منظور ایمنی‌زایی به موش‌های نژاد BALB /C سه مرتبه با فاصله دو هفته از هم بطور زیر جلدی تزریق شد. دو هفته بعد از آخرین تزریق سلول‌های طحال موشها در حضور آنتی ژن پپتیدی به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شد و میزان سایتوکاین‌های IFN-γ، IL-4 و IL-10 با استفاده از روش الایزا در مایع رویی کشت سلول‌های طحال موش‌های ایمن شده در مقایسه با گروه کنترل، مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: آنالیز نتایج حاصل از موش‌های ایمن شده با پپتید سنتتیک طراحی شده p29 نشان داد که این پپتید موجب افزایش IFN-γ در موش‌های ایمن شده نسبت به گروه‌های کنترل و ادجوانت گردید.این درحالی است که هیچ گونه تغییر معناداری در دو سایتوکاین IL-4 و IL-10 در این موش ها مشاهده نشد .

نتیجه‌گیری: این مطالعه به ارزیابی اثر پپتید سنتتیک $EgP\text{-}29_{aa134\text{-}142}$ بر روی پاسخ ایمنی پرداخته است و نتایج ما نشان می‌دهد این پپتید می‌تواند موجب افزایش IFN-γ و در نتیجه القای ایمنی ذاتی و همچنین پاسخ CTL و TH1 شود .

کلمات کلیدی: هیداتیدوزیس، پپتید سنتتیک $EgP\text{-}29_{aa134\text{-}142}$ ، ارزیابی سایتوکاین

* **نویسنده مسئول**:
کارشناس ارشد ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۰۹۱۱-۹۷۳۵۸۹۷
E-mail: shivajaafari@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری کیست هیداتیک یا هیداتیدوزیس از جمله بیماری‌های انگلی مشترک بین انسان و دام می‌باشد که بیشتر در نواحی با آب و هوای مرطوب جهان گسترش دارد.[۱] این بیماری در اثر آلودگی با لارو انگلی از خانواده کرم‌های نواری به نام اکینوکوکوس گرانولوزوس ایجاد می‌شود.[۲] میزبان اصلی این انگل سگ و سگ‌سانان بوده و انسان در این بیماری میزبان واسط تصادفی است که بر اثر خوردن اتفاقی بندهای بارور یا تخم‌های دفع شده از میزبان نهایی دچار آلودگی می‌شود.[۳و۴] هیداتیدوز یک بیماری شغلی محسوب می شود و تقریبا ۱٪ موارد جراحی در بیمارستان‌های ایران مربوط به آن می‌باشد.[۵و۶] این بیماری از تمام استان های کشور مشاهده شده و بالاترین میزان آلودگی آن در انسان ۱/۶در هر صد هزار نفر گزارش شده است.[۷] در حال حاضر رایج ترین راه درمان بیماری خارج ساختن کیست‌ها با عمل جراحی است که با خطرات فراوانی همراه است. استفاده از دارو نیز به عنوان یکی از راه های تخفیف علایم بالینی و بازدارنده رشد کیست مطرح می‌باشد.[۸و۹]

واکسیناسیون به عنوان یکی از راه های پیشگیری از ابتلا به بیماری و ایجاد ایمنوپروفیلاکسی موثر در میزبان‌های نهایی و واسط یک راهکار مهم برای توقف چرخه زندگی انگل است.[۱۰و۱۱] پیش-بینی موثرترین نواحی اپیتوپی آنتی‌ژن‌های پاتوژن در غالب واکسن-های پپتیدی اپیتوپی با استفاده از آلگوریتم‌های کامپیوتری تسهیلات نوینی را درطراحی نسل جدیدی از واکسن‌ها ارائه کرده است. در دهه‌های اخیر کاربرد استفاده از آنتی‌ژن های مراحل مختلف این انگل خصوصا انکوسفر و پروتواسکولکس در واکسیناسیون میزبان واسط مورد تائید قرار گرفته است.[۱۲] از جمله آنتی‌ژن های نوترکیب که از کلون کردن اونکوسفر(فرم غیر فعال انگل در تخم دفع شده از میزبان نهایی)و پروتواسکولکس (مرحله لاروی انگل) *E. granulosus* بدست آمده اند،[۱۳] عبارتند از: Eg95, Ag B, Ag A EgA31, EgTrp, rEgP14-3-3, و Eg29.

آنتی‌ژن P29 یک آنتی ژن ۲۳۸ اسید آمینه ای با وزن مولکولی ۲۹ کیلو دالتون است که در پروتواسکولکس‌های مایع کیست هیداتید حضور دارد و از اجزای اختصاصی متاستود می‌باشد که به دلیل واکنش متقاطع با آنتی ژن تشخیصی اصلی اکینوکوکوس گرانولوزوس بنام Ag5 کاندید استفاده در تهیه واکسن شده است.[۱۴] استفاده از آنتی‌ژن خالص شده P29 به عنوان واکسن، ایمنی قابل توجهی را در موش‌های ایمن شده (۹۶/۶٪) نشان داده است.[۱۵]

این مطالعه با هدف بررسی الگوی پاسخ ایمنی نسبت به اپی توپ $EgP\text{-}29_{aa134\text{-}142}$ ، پپتید سنتتیک برپایه آنتی‌ژنP29 مشتق از اکینوکوکوس گرانولوزوس، در موشهای نژاد BALB/c ، انجام شد.

مواد و روش‌ها

ابتدا اپیتوپهای اختصاصی سلول‌های T آنتی‌ژن P29 اکینوکوکوس گرانولوزوس با بیشترین قدرت اتصال به مولکول‌های MHC توسط نرم‌افزار بیوانفورماتیکی IEDB درحد فاصل آمینواسیدهای ۱۳۴-۱۴۲ آنتی‌ژن P29 شناسایی شده و در غالب پپتید EgP29 شامل توالی ۸ آمینواسیدی EDLKNFNT توسط شرکت JPT آلمان سنتز شد.

موش‌های BALB/C جنس نر ۷ هفته‌ای از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم سازی رازی تهیه شده و در شرایط استاندارد با دسترسی به آب و غذای کافی و دوره نوری ۱۲ ساعته نگهداری شدند.

تعداد ۲۸ موش، جهت ایمن سازی در ۴ گروه ۷ تایی قرارگرفتند که شامل گروهی که به آنها پپتیدP29 به همراه ادجوانت تزریق شد، گروهی که به آنها ادجوانت کامل فروند تزریق گردید، گروه شاهد که تنها مورد تزریق PBS قرار گرفتند و گروه کنترل که تزریقی نداشتند. تزریق پپتید $EgP\text{-}29_{aa134\text{-}142}$ سه بار در فواصل دوهفته ای با دوز ۱۰ µg/mice و به صورت زیرجلدی در ناحیه کمر موش‌ها صورت گرفت و در زمان تزریق با مقدار مساوی از ادجوانت فروند مخلوط شد. دو هفته بعد از آخرین ایمن‌سازی موش‌ها به روش نخاعی شدن کشته شدند. طحال آنها تحت شرایط استریل خارج و ازصافی عبور داده شد. برای حذف و لیز گلبولهای قرمز از محلول کلرید آمونیوم ۰/۰۱۷ مولار استفاده شد. سلولها ۱۰ دقیقه در دور ۱۵۰۰ rpm سانتریفوژ شدند ، مایع رویی آنها خالی شده و ۱۰cc محیط کشت غنی شده ی RPMI ۱۶۴۰ به فالکون حاوی نمونه اضافه شد . سپس شمارش سلولی با لام نئوبار انجام گرفت وتعداد 10^6 سلول در هر چاهک برای کشت به پلیت‌های

www.SID.ir

Archive of SID

۲۰ چاهکی انتقال یافت و در انکوباتور ۳۷درجه حاوی ۵٪ CO_2 در حضور پپتیدکشت داده شد. سلولهای کشت داده شده با میکروسکوپ معکوس از نظر رشد، تراکم پدید آمده، مورفولوژی سلولی و همچنین کنترل آلودگی باکتریایی و قارچی مورد بازدید قرارگرفتند و پس از ۷۲ ساعت مایع رویی حاصل از کشت سلولی جمع‌آوری شد.

اندازه‌گیری IFN-γ بر اساس روش الایزای مبتنی بر آنتی بادی ساندویچ می‌باشد. پلیت‌های ۹۶ چاهکی الایزا شرکت Quantikine که با آنتی‌بادی منوکلونال ضد IFN-γ موشی پوشانده و آماده مصرف تهیه شدند. مطابق بروشور کیت ۵۰ میکرولیتر Assay Diluent RD1-21 به تمامی چاهک‌ها کنترل‌ها ، کالیبراتور و نمونه‌ها اضافه شد سپس ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌های کشت سلولی و غلظت‌های استاندارد به چاهک‌ها منتقل شده و ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. سپس شستشوی پلیت‌ها انجام شده و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه به هریک از چاهک‌ها اضافه و مجددا به مدت ۲ ساعت انکوبه و شستشو داده شد . در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر محلول سوبسترا کروموژن اضافه شده و پس از نیم ساعت انکوباسیون در تاریکی محلول متوقف کننده اضافه شد و میزان رنگ حاصل در چاهک‌های موردنظر توسط دستگاه BIORAD680 reader در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

سنجش ترشح سایتوکاین IL-10 و IL-4 نیز مشابه اندازه‌گیری IFN-γ انجام شد . قابل ذکر است مقادیر حساسیت کیت اندازه گیری در مورد IFN-γ ,IL-4 و IL-10 به ترتیب pg/ml ۱۰ ،pg/ml ۱۰ و ۵ pg/ml توسط شرکت سازنده تعیین شده است.

آنالیز آماری

داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS v.15 بررسی شدند . جهت مقایسه کمی میانگین داده‌ها بین گروه های مختلف نتایج بین گروه هدف با هرکدام از گروه‌های کنترل با استفاده از آزمون آماری T-paired testp مقایسه گردید و اختلاف P<0.05 به عنوان مثبت در نظر گرفته شد.

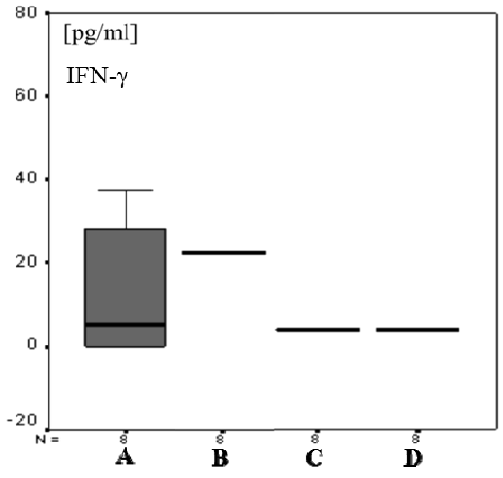
نتایج

مطالعه حاضر به منظور بررسی پاسخ ایمنی نسبت به پپتید سنتتیک P29aa134-142 مشتق ازاکینوکوکوس گرانولوزوس در مدل موشی صورت گرفت. در این مطالعه میزان سایتوکاین های ,IL-4 IFN-γ ، IL-10 در سوپ رویی کشت سلول های طحال موش های ایمن شده با پپتید سنتتیک P29 در گروه های مختلف اندازه گیری شد.

مقادیر تولید شده IFN-γ در گروه‌های مختلف موش های تحت آزمایش در نمودار۱ نشان داده شده است.

بر اساس این نتایج موش های ایمن شده با پپتید P29aa134-142 افزایش معنی داری را در سطح IFN-γ در مقایسه با گروه‌های کنترل که پپتید را دریافت نکردند نشان دادند.(p-value < 0.05)

همانطور که در نمودار ۲ دیده می‌شود تولید سایتوکاین IL-10 بر اثر تزریق تزریق پپتید سنتتیک P29aa134-142 در موش های ایمن شده در مقایسه با گروه های کنترل معنی دار نبود. (p-value> 0.05)



نمودار۱: نمودار پاسخ اینترفرون گاما در موش های ایمن شده بر حسب غلظت(Pg/ml).

گروه A: استانداردهای کیت Quantikine

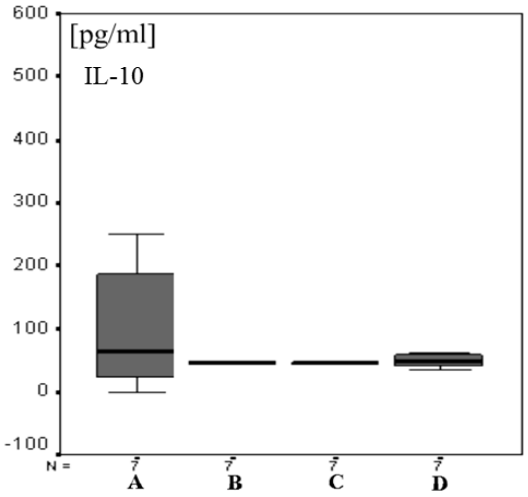
گروه B: موش های دریافت کننده پپتید سنتتیک P29 به همراه ادجوانت

گروهC : موش های دریافت کننده ادجوانت خالص

گروه D: موش های گروه کنترل دریافت کننده بافر PBS

www.SID.ir

Archive of SID



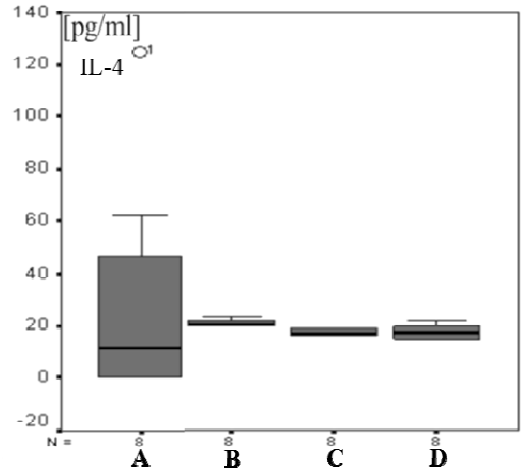
نمودار ۲: نمودار پاسخ سایتوکاین IL-10 در موش های ایمن شده بر حسب غلظت(Pg/ml).

گروه A: استانداردهای کیت Quantikine

گروه B: موش های دریافت کننده پپتید سنتتیک P29 به همراه ادجوانت

گروهC موش های دریافت کننده ادجوانت خالص

گروه D:موش های گروه کنترل دریافت کننده بافر PBS



نمودار ۳: نمودار پاسخ سایتوکاین IL-4 در موش های ایمن شده برحسب غلظت(Pg/ml).

گروه A: استانداردهای کیت Quantikine

گروه B: موش های دریافت کننده پپتید سنتتیک P29 به همراه ادجوانت

گروهC موش های دریافت کننده ادجوانت خالص

گروه D:موش های گروه کنترل دریافت کننده بافر PBS

میزان سایتوکاین IL-4 بر اثر تزریق پپتید سنتتیک P29aa134-142 در موش های ایمن شده در مقایسه با گروه های کنترل افزایش غیرمعنی‌داری را نشان داده است. (نمودار۳) (p-value> 0.05)

همزمان با ایمنی زایی موش‌ها آزمون حساسیت کف پا نیز برای بررسی بروز ازدیاد حساسیت تاخیری (DTH) که یک روش استاندارد بررسی ایمنی سلولی در in vivo است انجام شد و نشان داد که واکنش‌های ظاهری التهاب و تورم یا swelling درکف پای راست موش ها در گروه ایمن شده با پپتید نسبت به کف پای چپ (شاهد) برابر بود و در اندازه گیری سفتی پوست محل تزریق یا Thickness که توسط کولیس دیجیتال ثبت شد تفاوتی مشاهده نشد.

بحث

هیداتیدوز به عنوان یکی از بیماری های مشترک بین انسان و حیوان مطرح است که موجب خسارت‌های بهداشتی و اقتصادی فراوان در جوامع می‌شود. با توجه با اینکه درمان این عفونت با داروهای ضد انگلی در دام چندان رضایت بخش و مقرون به صرفه نیست، مبارزه علیه این انگل از مسائل مورد توجه در دنیا می‌باشد، بطوری‌که ساخت یک واکسن کارا می‌تواند مشکلات اقتصادی و بهداشتی این بیماری را حل کند.[۱۶]

بیماری هیداتیدوز سبب القای ترشح هر دو الگوی سایتوکینی Th1 و Th2 می‌شود.[۱۷] یافته های اخیر در مورد ایمنی شناسی انگل نشان می دهد که بقای انگل در بدن میزبان مرتبط با پاسخ سلول های Th2 با تولید سایتوکین‌های IL-4, IL-5, IL-10 می‌باشد که این پاسخ به انگل اجازه استقرار و ایجاد آلودگی ثانویه بواسطه انتشار پروتواسکولکس پس از پاره شدن کیست بارور را میدهد.در حالی که پاسخ سلولهای Th1 و CTL مرتبط با ایمنی مصونیت بخش بر علیه کیست هیداتید و ایجاد مقاومت در برابر بیماری است.[۱۸و۱۹] در مطالعه ای که Zhiyun Shi و همکاران انجام دادند نشان داده شد که تزریق آنتی ژن خالص شده P-29 باعث افزایش ایمنی زایی بویژه افزایش میزان آنتی بادی در موش های مبتلا به کیست هیداتیک شده است و ایمنی زایی حفاظتی قابل ملاحظه ای (حدود ۹۶٪) در

www.SID.ir

Archive of SID

موش‌های واکسینه ایجاد کرده است؛ همچنین در موش های گروه challenge که با پروتواسکولکس بیمار شده بودند، سایز و تعداد کیست‌های هیداتیک کاهش یافت. [۱۵]

پژوهشگران همچنین راهی برای بیان آنتی ژن P-29 نوترکیب در وکتور pET-28a پیدا کردند. از این پروتئین برای ایمنی زایی موش ها و بررسی پاسخ ایمنی استفاده کردند و با اندازه گیری آنتی بادی های اختصاصی نشان دادند که P-29 نوترکیب از توانایی ایمنی زایی و آنتی ژنیسیته خوبی برخوردار است و بخصوص باعث افزایش IgG در موش ها می‌شود. [۲۰]

مطالعات قبلی در مقایسه با مطالعه پیش رو ، پروتئین کامل نوترکیب P-29 را مورد بررسی قرار دادند و هیچ یک به بررسی ایمنی زایی اپیتوپ خاصی از P-29 نپرداختند. لذا در این تحقیق اپیتوپ سنتتیک ۸ اسید آمینه ای از آنتی‌ژن p-29 انگل به منظور بررسی قدرت ایمنی زایی انتخاب شد.

نتایج این مطالعه نشان داد پپتید سنتتیک P29aa134-142 می‌تواند موجب افزایشIFN-γ در موش های ایمن شده نسبت به گروه‌های کنترل و ادجوانت شده و ایمنی زایی نسبتا خوبی را ایجاد کند. این درحالیست که هیچ گونه تغییر معنی داری در میزان دو سایتوکاین IL-4 وIL-10 در این موش ها مشاهده نشده است.

اینترفرون گاما (IFN-γ) یک سایتوکاین حیاتی در آغاز و گسترش پاسخ‌های ایمنی ذاتی و اکتسابی است که توسط سلول های مختلفی از جمله سلول های عرضه کننده آنتی ژن، CTL و Th1 ترشح می‌شود و در هدایت به سمت سلول های خاطره و ایجاد حفاظت ایمنی توسط واکسن بسیار موثراست. [۲۱و۲۲]

از آنجایی که توالی‌های پپتیدی ۸-۱۰ اسید آمینه برای اتصال به MHC I و تحریک سلول CTL مناسب می‌باشند، می‌توان نتیجه گرفت که افزایش IFN-γ در این مطالعه در درجه اول نشان دهنده فعال شدن ایمنی ذاتی و تحریک سلول های CTL می‌باشد و در نهایت افزایش این سایتوکاین می‌تواند نقش مهمی در القای شکل‌گیری پاسخ Th1 ایفا کرده و به تولید آنتی بادی علیه آنتی ژن کمک کند. [۲۳]

استفاده از واکسن‌های پپتیدی امکان حذف اجزای آنتی ژنی آلرژی زای پاتوژن و امکان بهره گیری از چندین پپتید از آنتی ژن های مراحل مختلف چرخه زندگی پاتوژن را در یک واکسن فراهم میکند که مزیتی بر استفاده از واکسن های سنتی محسوب می‌شود. [۲۴و۲۵و۲۷]

قابل ذکر است عوامل مختلفی در افزایش ایمنی زایی یک آنتی ژن پپتیدی سنتتیک نقش دارند ازجمله بیگانگی ، اندازه و ساختار شیمیایی، شکل فیزیکی و همچنین مقدار و نحوه تجویز آنتی ژن ، که هریک بر دقت و دشواری انتخاب اپیتوپ سنتتیک تاکید می‌ورزند. [۲۸و۲۹]

ازطرف دیگر مطالعات صورت گرفته نشان میدهد که مدل آنتی ژن دست نخورده و طبیعی مدل مناسبی برای تولیدایمنی با مصونیت مناسب بر علیه انگل نمی‌باشد زیرا در این مدل علاوه بر افزایش در سطح اینترفرون گاما ، سایر سایتوکاین ها مانند IL10 نیز افزایش می یابد که موجب پاسخ توام Th1وTh2 میشود و در نتیجه انتخاب اپیتوپهای اختصاصی به استفاده از کل آنتی ژن برتری دارد. [۳۰و۳۱]

مطالعه انجام شده بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج می‌باشد. بدین وسیله از کلیه همکاران بخش بیوتکنولوژی و همچنین جناب آقای دکتر تبیانیان و آقای حجازی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Boubaker G, Gottstein B, Hemphill A, Spiliotis M. Echinococcus P29 antigen: molecular characterization and implication on post-surgery follow-up of CE patients infected with different species of the Echinococcus granulosus complex. PLoS One. 2014;9(5):e98357 .
2. Siracusano A, Teggi A, Ortona E. Human cystic echinococcosis: old problems and new perspectives. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2009;474368.
3. Zheng Y. Strategies of Echinococcus species responses to immune attacks: implications for therapeutic tool development. Int Immunopharmacol. Elsevier B.V.; 2013;17(3):495–501.
4. Mohammadzadeh T, Shams S. Establishment of a Modified in Vitro Cultivation of Protoscoleces to Adult Echinococcus granulosus; an Important Way for New Investigations on Hydatidosis. Iran J Parasitol. 2012;7(1):59–66 .

www.SID.ir

Archive of SID

5. OteroAbad B, Torgerson PR. A systematic review of the epidemiology of echinococcosis in domestic and wild animals. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(6):e2249.
6. Dalimi A, Sattari A, Motamedi G. A study on intestinal helminthes of dogs, foxes and jackals in the western part of Iran. Vet Parasitol. 2006;142(1-2):129–33.
7. Ahmadi N, Dalimi A. Characterization of Echinococcus granulosus isolates from human, sheep and camel in Iran. Infect Genet Evol. 2006;6(2):85–90.
8. Siracusano A, Teggi A, Ortona E. Human cystic echinococcosis: old problems and new perspectives. Interdisciplinary perspectives on infectious diseases. 2009;474368.
9. Edition T, American P, Bureau S. Zoonoses and commuicable diseases common to man and animals. world Heal Organ. 2003; 580:191–5 .
10. Lightowlers MW, Colebrook AL, Gauci CG, Gauci SM, Kyngdon CT, Monkhouse JL, et al. Vaccination against cestode parasites : anti-helminth vaccines that work and why. Vet Parasitol. 2003;115:83–123 .
11. Heath, David D G a, Lightowlers, Shi, Zhang,, MW. Vaccination of bovines against Echinococcus granulosus. Vaccine . 2012;30(20):3076–81.
12. R.K. & Maeurer, M.J. T-Cell Epitope Mapping. In: Methods Mol. Biol,2009;.524, 4:427-38.
13. Esmaelizad M, Ahmadian G, Aghaiypour K. Induction of protective T-helper 1 immune responses against Echinococcus granulosus in mice by a multi-T-cell epitope antigen based on five proteins. 2013;408–13.
14. AZIZ A, Zhang W, Li J, Loukas A, McManus DP, Mulvenna J. Proteomic characterisation of Echinococcus granulosus hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans. J Proteomics. Elsevier B.V; 2011 ;24;74(9):1560–72.
15. SHI Zhi-yun;LI Zhao-yu. Expression and purification of gene encoding the diagnostic antigen P-29 of Echinococcus granulosus and the preliminary analysis on its immunogenicity. Chinese J of Zoonoses. 2009: 11.
16. Mandal S, Mandal MD. Human cystic echinococcosis: epidemiologic, zoonotic, clinical, diagnostic and therapeutic aspects. Asian Pacific journal of tropical medicine. 2012;5:253-60.
17. Vuitton DA. The ambiguous role of immunity in echinococcosis: protection of the host or of the parasite? Acta Tropica. 2003;85:119-32.
18. Zhang W, Wen H, Li J, Lin R, McManus DP. Immunology and immunodiagnosis of cystic echinococcosis: an update. Clin Dev Immunol. 2012;101895.
19. Maizels RM, Hewitson JP, Smith K a. Susceptibility and immunity to helminth parasites. Curr Opin Immunol. Elsevier Ltd. 2012 ;24(4):459–66.
20. Shi Z, Wang Y, Li Z, Li Z, Bo Y, Ma R, et al. Cloning , expression , and protective immunity in mice of a gene encoding the diagnostic antigen P-29 of Echinococcus granulosus. Acta Biochimica et Biophysica Sinica. 2009;41:79-85.
21. Schroder K, Hertzog PJ et al. Interferon- gama : an overview of signals, mechanisms and functions. 2004:75.
22. Baz A, Ettlin GM, Dematteis S. Complexity and function of cytokine responses in experimental infection by Echinococcus granulosus. Immunobiology 2006;211:3-9.
23. AK Abbas & Lichtman, A.H.. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System. Elsevier/Sunders, Philadelphia, USA 2011, p.93-130.
24. Barrett, A.D.T. & Stanberry, L.R. Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases, 2009. Elsevier Inc.
25. Ben-Yedidia, T. and Arnon, R., Design of Peptide and Polypeptide Vaccines. Curr. Opin. Biotechnol,1997, Vol. 8, No.4, pp. 442-448.
26. Bijker, M.S., Melief, C.J., Offringa, R., and van der Burg, S.H., Design and Development of Synthetic Peptide Vaccines: Past, Present and Future. Expert Rev. Vaccines, 2007; 6(4) : 591-603.
27. Sieker, F., May, A., & Zacharias, M.Predicting Affinity and Specificity of Antigenic Peptide Binding to Major Histocompatibility Class I Molecules. Curr. Protein. Pept. Sci, 2009; 10(3):286-296.
28. Tian, F., Yang, L., Lv, F., Yang, Q Zhou, P. In silico Quantitative Prediction of Peptides Binding Affinity to Human MHC Molecule: an Intuitive Quantitative Structure-Activity Relationship Approach.2009, Amino Acids; 36(3):535-354.
29. Tam, J.P. Synthetic Peptide Vaccine Design: Synthesis and Properties of a High-Density Multiple Antigenic Peptide System. Proc. Natl. Acad. USA, 1988; 85(15): 5409-5413.
30. Takahashi, H., Takeshita, T., Morein, B et al. Induction of CD8+ Cytotoxic Cells by Immunization with Purified HIV-1 Envelope Protein in ISCOMs. Nature, 1990, Vol. 344, No. 6269, pp. 873-875.
31. Olenina, L.V., Nikolaeva, L.I., Sobolev, B.N.,et alMapping and Characterization of B Cell Linear Epitopes in the Conservative Regions of Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins. . J. Viral Hepat 2002; 9(3):174-182.

www.SID.ir