

ارزیابی ایمنی زایی پپتید EgP-29^{aa134-142} مشتق از «اگینوکوکوس گرانولوزوس» در موش‌های نژاد BALB/c

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 و دام است که در اثر آلودگی با لارو انگل اگینوکوکوس گرانولوزوس ایجاد می‌شود. پروتئین p29 با وزن مولکولی ۲۹ کیلودالتون از آنتی‌ژن‌های اختصاصی پروتواسکولکس این انگل بوده که به علت داشتن واکنش متقاطع با آنتی‌ژن اصلی تشخیصی این انگل به نام Ag5 کاندید استفاده در تشخیص بیماری و تهیه واکسن می‌باشد. در این مطالعه نواحی اپیتوبی 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 اپیتوبی آنتی‌ژن p29 انگل اگینوکوکوس گرانولوزوس توسط نرم‌افزار بیوانفورماتیکی IEDB شناسایی شده و در غالب 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 آنتی‌ژن پپتیدی به مدت ۷۲ ساعت کشت داده شد و میزان سایتوکاین‌های IFN- γ ، IL-4 و IL-10 با استفاده از روش الیزا 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 در حالی است که هیچ گونه تغییر معناداری در دو سایتوکاین IL-4 و IL-10 در این موش‌ها مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه به ارزیابی اثر پپتید سنتتیک EgP-29^{aa134-142} 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 THI شود.

کلمات کلیدی: هیداتیدوزیس، پپتید سنتتیک EgP-29^{aa134-142}، ارزیابی سایتوکاین

شیوا جعفری^{۱*}، مجید اسمعیلی زاد^۲،
علیرضا رفیعی^۳، رقیه مصری^۴، مژگان
احمدزاده^۴، سمیه محمدی^۴

^۱ کارشناس ارشد ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ایران

^۲ استادیار ژنتیک، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی حصارک کرج، البرز، ایران

^۳ استاد ایمونولوژی، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ایران

^۴ کارشناس ارشد ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی کرج، ایران

* نویسنده مسئول:

کارشناس ارشد ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

۰۹۱۱-۹۷۳۵۸۹۷

E-mail: shivajaafari@gmail.com

مقدمه

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 $EgP-29_{aa134-142}$ ، پپتید سنتتیک برپایه آنتی‌ژن P29 مشتق از اکینوкокوس گرانولوزوس، در موش‌های نژاد BALB/c، انجام شد.

مواد و روش‌ها

ابتدا اپیتوپ‌های اختصاصی سلول‌های T آنتی‌ژن P29 اکینوкокوس گرانولوزوس با بیشترین قدرت اتصال به مولکول‌های MHC توسط نرم‌افزار بیوانفورماتیکی IEDB درحد فاصل آمینوسیدهای ۱۳۴-۱۴۲ آنتی‌ژن P29 شناسایی شده و در غالب پپتید $EgP29$ شامل توالی ۸ آمینوسیدی 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 قرار گرفتند که شامل گروهی که به آن‌ها پپتید P29 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 $EgP-29_{aa134-142}$ سه بار در فواصل دو هفته‌ای با دوز $10 \mu\text{g}/\text{mice}$ 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 از صافی 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 فالكون حاوی نمونه اضافه شد. سپس شمارش سلولی با لام نئوبار انجام گرفت و تعداد 10^6 سلول در هر چاهک برای کشت به پلیت‌های

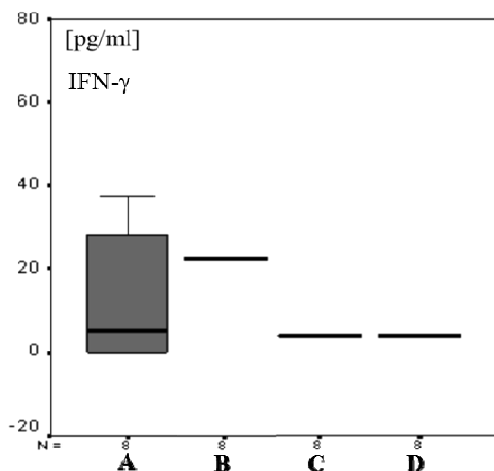
بیماری کیست هیداتیک یا هیداتیدوزیس از جمله بیماری‌های انگلی مشترک بین انسان و دام می‌باشد که بیشتر در نواحی با آب و هوای مرطوب جهان گسترش دارد.^۱ این بیماری در اثر آلودگی با لارو انگلی از خانواده کرم‌های نواری به نام اکینوкокوس گرانولوزوس ایجاد می‌شود.^۲ میزبان اصلی این انگل سگ و سگ‌سانان بوده و انسان در این بیماری میزبان واسط تصادفی است که بر اثر خوردن اتفاقی بندهای بارور یا تخم‌های دفع شده از میزبان نهایی دچار آلودگی می‌شود.^{۳،۴} هیداتیدوز یک بیماری شغلی محسوب می‌شود و تقریباً ۱٪ موارد جراحی در بیمارستان‌های ایران مربوط به آن می‌باشد.^{۵،۶} این بیماری از تمام استان‌های 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 راه‌های تخفیف علائم بالینی و بازدارنده رشد کیست مطرح می‌باشد.^{۸،۹} واکسیناسیون به عنوان یکی از راه‌های پیشگیری از ابتلا به بیماری و ایجاد ایمنوپروفیلاکسی موثر در میزبان‌های نهایی و واسط یک راهکار مهم برای توقف چرخه زندگی انگل است.^{۱۰،۱۱} پیش-بینی موثرترین نواحی اپیتوپی آنتی‌ژن‌های پاتوژن در غالب واکسن-های پپتیدی اپیتوپی با استفاده از الگوریتم‌های کامپیوتری تسهیلات نوینی را در طراحی نسل جدیدی از واکسن‌ها ارائه کرده است. در دهه‌های اخیر کاربرد استفاده از آنتی‌ژن‌های مراحل مختلف این انگل خصوصاً انکوسفر و پروتواسکولکس در واکسیناسیون میزبان واسط مورد تأیید قرار گرفته است.^{۱۲} از جمله آنتی‌ژن‌های 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: Ag A, Ag B, Ag95, EgA31, EgTrp, rEgP14-3-3, Eg29.

آنتی‌ژن P29 یک آنتی‌ژن ۲۳۸ اسید آمینه‌ای 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 آنتی‌ژن تشخیصی اصلی اکینوкокوس

نتایج

مطالعه حاضر به منظور بررسی پاسخ ایمنی نسبت به پپتید سنتتیک P29aa134-142 مشتق از اکتینوکوکوس 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 گروه های مختلف موش های تحت آزمایش در نمودار ۱ 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 گروه های کنترل که پپتید را دریافت نکردند نشان دادند. ($p\text{-value} < 0.05$) همانطور که در نمودار ۲ دیده می شود 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. ($p\text{-value} > 0.05$)



نمودار ۱: 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

گروه C: موش های دریافت کننده ادجوانت خالص

گروه D: موش های گروه کنترل دریافت کننده بافر PBS

۲۰ چاهکی انتقال یافت و در انکوباتور ۳۷ درجه حاوی ۵٪ CO₂ 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 قرار گرفتند و پس از ۷۲ ساعت مایع رویی حاصل از کشت سلولی جمع آوری شد.

اندازه گیری IFN- γ بر اساس روش الیزای مبتنی بر آنتی بادی ساندویچ می باشد. پلیت های ۹۶ چاهکی الیزا شرکت Quantikine که با آنتی بادی منوکلونال ضد IFN- γ موشی پوشانده و آماده مصرف تهیه شدند. مطابق بروشور کیت ۵۰ میکرولیتر Assay Diluent RD1-21 به تمامی چاهک ها کنترل ها، کالیبراتور و نمونه ها اضافه شد سپس ۵۰ میکرولیتر از نمونه های کشت سلولی و غلظت های استاندارد به چاهک ها منتقل شده و ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. سپس شستشوی پلیت ها انجام شده و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه به هر یک از چاهک ها اضافه و مجدداً 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 چاهک های مورد نظر توسط دستگاه BIORAD680 reader در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری شد.

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

آنالیز آماری

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

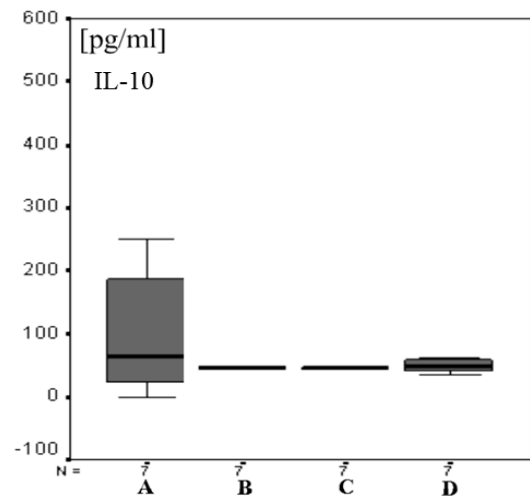
میزان سایتوکاین IL-4 بر اثر تزریق پپتید سنتتیک P29aa134-142 در موش‌های ایمن شده در مقایسه با گروه‌های کنترل افزایش غیرمعنی‌داری را نشان داده است. (نمونه‌دار ۳) ($p\text{-value} > 0.05$)

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 در کف پای راست موش‌ها در گروه ایمن شده با پپتید نسبت به کف پای چپ (شاهد) برابر بود و در اندازه‌گیری سفتی پوست محل تزریق یا Thickness که توسط کولیس دیجیتالی ثبت شد تفاوتی مشاهده نشد.

بحث

هیداتیدوز به عنوان یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان مطرح است که موجب خسارت‌های بهداشتی و اقتصادی فراوان در جوامع می‌شود. با توجه به 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} یافته‌های اخیر در مورد ایمنی شناسی انگل نشان می‌دهد که بقای انگل در بدن میزبان مرتبط با پاسخ سلول‌های 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.^{۱۸، ۱۹} در مطالعه‌ای 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 موش‌های مبتلا به کیست هیداتیک شده است و ایمنی زایی حفاظتی قابل ملاحظه‌ای (حدود ۹۶٪) در



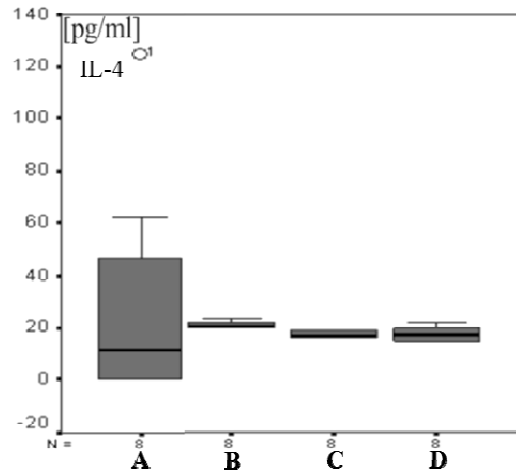
نمونه‌دار ۲: نمودار پاسخ سایتوکاین IL-10 در موش‌های ایمن شده بر حسب غلظت (Pg/ml).

گروه A: استانداردهای کیت Quantikine

گروه B: موش‌های دریافت کننده پپتید سنتتیک P29 به همراه ادجوانت

گروه C: موش‌های دریافت کننده ادجوانت خالص

گروه D: موش‌های گروه کنترل دریافت کننده بافر PBS



نمونه‌دار ۳: نمودار پاسخ سایتوکاین IL-4 در موش‌های ایمن شده بر حسب غلظت (Pg/ml).

گروه A: استانداردهای کیت Quantikine

گروه B: موش‌های دریافت کننده پپتید سنتتیک P29 به همراه ادجوانت

گروه C: موش‌های دریافت کننده ادجوانت خالص

گروه D: موش‌های گروه کنترل دریافت کننده بافر PBS

گرفت که افزایش IFN- γ در این مطالعه در درجه اول نشان دهنده فعال شدن ایمنی ذاتی و تحریک سلول های CTL می باشد و در نهایت افزایش این سایتوکاین می تواند نقش مهمی در القای شکل گیری پاسخ Th1 ایفا کرده و به تولید آنتی بادی علیه آنتی ژن کمک کند.^{۲۳}

استفاده از واکسن های 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 می شود.^{۲۴، ۲۵، ۲۷}

قابل ذکر است عوامل مختلفی در افزایش ایمنی زایی یک آنتی ژن پپتیدی سنتتیک نقش دارند از جمله بیگانگی، اندازه و ساختار شیمیایی، شکل فیزیکی و همچنین مقدار و نحوه تجویز آنتی ژن، که هر یک بر دقت و دشواری انتخاب اپیتوپ سنتتیک تاکید می ورزند.^{۲۸، ۲۹}

از طرف دیگر مطالعات صورت گرفته نشان میدهد که مدل آنتی ژن دست نخورده و طبیعی مدل مناسبی برای تولید ایمنی با مصونیت مناسب بر علیه انگل نمی باشد زیرا در این مدل علاوه بر افزایش در سطح اینترفرون گاما، سایر سایتوکاین ها مانند IL10 نیز افزایش می یابد که موجب پاسخ توام Th1 و Th2 میشود و در نتیجه انتخاب اپیتوپهای اختصاصی به استفاده از کل آنتی ژن برتری دارد.^{۳۰، ۳۱}

مطالعه انجام شده بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج می باشد. بدین وسیله از کلیه همکاران بخش بیوتکنولوژی و همچنین جناب آقای دکتر تیبانیان و آقای حجازی تشکر و قدردانی می شود.

موش های واکسینه ایجاد کرده است؛ همچنین در موش های گروه challenge که با پروتواسکولکس بیمار شده بودند، سائیز و تعداد کیست های هیداتیک کاهش یافت.^{۱۵}

پژوهشگران همچنین راهی برای بیان آنتی ژن P-29 نو ترکیب 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 نو ترکیب از توانایی ایمنی زایی و آنتی ژنیسیته خوبی برخوردار است و بخصوص باعث افزایش IgG در موش ها می شود.^{۲۰}

مطالعات قبلی در مقایسه با مطالعه پیش رو، پروتئین کامل نو ترکیب 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 آنتی ژن p-29 انگل به منظور بررسی قدرت ایمنی زایی انتخاب شد.

نتایج این مطالعه نشان داد پپتید سنتتیک P29aa134-142 می تواند موجب افزایش IFN- γ در موش های ایمن شده نسبت به گروه های کنترل و ادجوانت شده و ایمنی زایی نسبتا خوبی را ایجاد کند. این در حالیکه هیچ گونه تغییر معنی داری در میزان دو سایتوکاین IL-4 و IL-10 در این موش ها مشاهده نشده است.

اینترفرون گاما (IFN- γ) یک سایتوکاین حیاتی در آغاز و گسترش پاسخ های ایمنی ذاتی و اکتسابی است که توسط سلول های مختلفی از جمله سلول های عرضه کننده آنتی ژن، CTL و Th1 ترشح می شود و در هدایت به سمت سلول های خاطره و ایجاد حفاظت ایمنی توسط واکسن بسیار موثر است.^{۲۱، ۲۲}

از آنجایی که توالی های پپتیدی ۸-۱۰ اسید آمینه برای اتصال MHC I و تحریک سلول CTL مناسب می باشند، می توان نتیجه

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 .

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- gamma : 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 al. Mapping 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.