واکسیناسیون موش‌های C57BL/6 با سوش ترانس‌ژنیک لشمنیا ماژور

دکترعباس دوستی*_ دکترنوشین داودی**

*استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

**استادیار گروه بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران

تاریخ دریافت مقاله:۸٦/۲/۹

تاریخ پذیرش: ۸٦/٤/۱۰

چکیده

مقدمه: سالک عفونت ناشی از تک یاخته‌ای از جنس لشمنیاست. این بیماری در بسیاری از کشورهای مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر جهان شیوع دارد. به‌رغم تلاش‌های بسیار محققان در سراسر دنیا، هنوز واکسن موثری علیه این بیماری بدست نیامده است و درمان‌های معمول نیز صد در صد مؤثر نیستند. ابتلای به سالک پس از بهبود معمولاً سبب بروز مصونیت دائم در برابر این بیماری می شود. بنابراین واکسیناسیون، بهترین راه کنترل لشمانیوز است.

هدف: ارزیابی ایمنی‌زایی سوش مهندسی شده ای از لشمنیا ماژور در موش‌های C57BL/6.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از انگل لشمنیای ترانسژنی استفاده شد که به علت داشتن ژن‌های سیستم خودکشی سلولی شامل HSV tk و Se cd به داروهای گانسیکلوویر و ۵-فلوروسیتوزین حساس است. این داروها هیچگونه اثرکشندگی بر لشمنیا ماژور وحشی ندارند در این آزمایش ابتدا موش‌های *C57BL/6* با انگل ترانسژنیک آلوده شدند، سپس با داروهای مذکور درمان شدند. آنگاه ایمنی ایجاد شده علیه لشمنیا بررسی شد.

نتایج: ارزیابی سایتوکاین‌ها به روش ELISA نشان‌دهنده افزایش IFN- γ و کاهش IL-*4* در موش‌های درمان شده بود. نتایج آزمون چالش (challenge) بعدی با انگل سوش وحشی نیز وجود میزان بالای ایمنی علیه لشمنیا را در این حیوانات تایید کرد.

نتیجه‌گیری: سیستم ترکیبی ژن-دارو در تحقیقات آینده می‌تواند به عنوان روشی کارآمد در یافتن واکسنی مؤثر علیه لشمنیا مورد توجه بیشتری قرار گیرد.

کلید واژه‌ها: لشمنیا/ لشمنیاز/ موش‌های ترانسژنیک/ واکسن‌ها

مقدمه

لشمانیوز یک بیماری انگلی است که توسط تک یاخته‌ای از جنس لشمنیا ایجاد می‌شود. گونه‌های مختلف این انگل قادرند طیف وسیعی از بیماری‌ها، از عفونت پوستی- موضعی تا عفونت احشایی منتشر در انسان و حیوان بوجود آوردند. یکی از این بیماری‌ها، سالک است. سالک بیماری مزمن است با عارضه پوستی، بدون درد و تب است که فقط جای زخم به جا می‌گذارد. در اکثر موارد، ضایعه اصلی محدود به پوست و موضعی است. لشمنیا نوعی انگل درون سلولی اجباری می‌باشد و با نیش پشه خاکی آلوده به میزبان مهره‌دار منتقل می‌شود(۱). در حدود ۱۰۰ گونه حیوان، مخزن آن هستند. لشمنیا هنوز یکی از مهم‌ترین عوامل عفونی مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان محسوب می‌شود. تخمین زده می‌شود که در دنیا ۳۵۰ میلیون نفر در معرض ابتلای به این بیماری قرار داشته باشند و در حدود ۱۲ میلیون نفر نیز به آن مبتلا هستند. سالانه ۱ تا ۱/۵ میلیون بیمار جدید در ۸۸ کشور جهان به آن اضافه می‌شود که بیشتر آنها دچار لشمانیوز جلدی هستند(۲).

سالک یکی از بیماری‌های انگلی بومی ایران است. چون کشور ما آب و هوای مناسبی برای رشد و تکثیر ناقلان و مخازن این بیماری دارد و از طرفی ابتلای به لشمانیوز محدود به سن و جنس خاصی هم نیست، این بیماری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌شود. روش‌های مبارزه با ناقلین و مخازن، کارایی چندانی نداشته و روش‌های پیشگیری موثری نیز وجود ندارد. همچنین درمان‌های معمول نیز، صد در صد مؤثر نیستند. همه این عوامل سبب شده‌اند تا لشمانیوز یکی از مشکلات

نویسنده مسئول: عباس دوستی؛ شهرکرد- دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی

doostiiranii@yahoo.com

عمده مناطق اندمیک در جهان باشد و از اهمیت بهداشتی خاصی برخوردار شود. به‌رغم تلاش‌های گسترده محققان در سراسر دنیا، تاکنون واکسن موثری علیه لشمنیا بدست نیامده‌است(۳). با توجه به این‌که معمولاً بیماری سالک پس از بهبود خودبه‌خودی، موجب مصونیت دائم می‌شود، قرن‌های متمادی ساکنان خاورمیانه بازوی لخت نوزادان خود را در معرض گزش پشه خاکی آلوده به لشمنیا قرار می‌دادند یا به آنها ماده گرفته شده از زخم‌های سالکی فعال انسان را تلقیح می‌کردند. بدین‌ترتیب، در نوزادان زخم‌های موضعی ایجاد می‌شد و در اغلب مواقع پس از بهبود، در برابر آلودگی مجدد ایمنی بدست آمد(۴). در مناطق بسیار آلوده مثل فلسطین و روسیه، پروماستیگوت زنده به عنوان واکسن بکار رفت و ظاهراً موفقیت‌آمیز هم بود، اما این واکسن بسرعت ارزش خود را از دست داد زیرا در برخی بیماران آثار نامطلوب و غیر قابل تحملی بر جای گذاشت(۴). واکسن‌های متعدد دیگری نظیر لشمنیای کشته شده، عصاره سلولی پروماستیگوت‌ها، گلیکوپروتئین‌های سطحی، اشعه دیده، انگل‌های با حرارت کشته شده یا سونیکه شده و ... در حیوانات آزمایشگاهی و بندرت در انسان بکار گرفته شده‌اند(۵). درتحقیقات اخیر، واکسن‌های ژنی (DNA Vaccines) در راستای دستیابی به واکسنی موثر علیه لشمنیا مد نظر قرار گرفته اند. مثلاً در سال‌های اخیر، یک واکسن ژنی بر اساس ژن *gp63* انگل لشمنیا در مدل حیوانی ارزیابی شده است(۶). اما تاکنون تمام این تلاش‌ها بی‌نتیجه مانده‌است. مطالعات ایمونولوژی نشان داده‌است در واکنش‌های ایمنی مربوط به بیماریهای انگلی و از جمله لشمانیوز سایتوکاین‌های متعددی دخالت دارند. IFN-γ و IL-*4* از جمله این سایتوکاین‌ها هستند. IFN- γ، طی پاسخ Th1 از سلول‌های T-CD4$^+$ ترشح می‌شود و باعث ایمنی محافظت کننده علیه لشمنیا می‌شود. در مراحل اولیه آلودگی، سلول‌های NK، IFN- γ تولید می‌کنند که باعث تمایز زیر گروه‌های سلول CD4$^+$ می‌شود و علیه لشمنیا مقاومت اولیه در بدن ایجاد می‌کنند(۷و۸). در واقع IFN- γ مهمترین سایتوکاین در القای فعالیت کشندگی لشمنیا در ماکروفاژهاست (۹). IL-*4* از سلول‌های Th2 ترشح می شود و در تشدید بیماری نقش دارد. این سایتوکاین می‌تواند مانع تولید H2O2 ، سوپراکسید ،IL-*1* و TNF توسط منوسیت‌های انسان، و تولید IFN- γ در سلول شود. به طور کلی، این سایتوکاین موجب کاهش فعالیت کشندگی ماکروفاژهای انسان علیه لشمنیا می‌شود(۱۰).

لشمنیا ماژور معمولا در برابر داروهای گانسیکلوویر و ۵- فلوروسیتوزین مقاوم است. سوش ترانسژنیک استفاده شده در این تحقیق این مزیت را دارد که نسبت به داروهای مذکور حساس بوده و در مواجهه با این دو دارو از بین می رود. بیماران دچار لشمانیوز، معمولاً پس از بهبود نسبت به این بیماری مقاوم می‌شوند، لذا آلوده ساختن حیوان آزمایشگاهی با سوش ترانسژنیک لشمنیا ماژور- که به داروهای مذکور حساس است و سپس درمان حیوان آلوده با این داروها می‌تواند موجب مصونیت در برابر لشمنیا شود. هدف این تحقیق، بررسی ایمنی محافظت‌کننده علیه لشمانیوز در موش‌های واکسینه با سوش ترانسژنیک لشمنیا ماژور است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تحقیق مورد- شاهدی از دو نوع انگل لشمنیا ماژور استفاده شد. یکی انگل، لشمنیا ماژور، کلون B100 از سوش MHOM/*76*/IR ترانسژنیک دارای دو ژن سیتوزین دآمیناز(cd) و تیمیدین کیناز (tk) و حساس به داروهای گانسکلوویر و ۵- فلوروسیتوزین بود. همچنین این انگل مهندسی شده به دلیل داشتن دو

ژن مقاومت به نورزئوترایسین (NS) و هیگرومایسین (Hyg) در ژنوم خود، قادر است در مجاورت آنتی‌بیوتیک‌های مذکور رشد کند که این نکته در جداسازی سوش ترانسژنیک از سوش وحشی مفید است. انگل دیگر لشمنیا ماژور، Wild type یا وحشی، یعنی همان سوش MHOM/76/IR بدون دستکاری ژنتیکی است که هر دو این انگل‌ها از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران گرفته شده‌اند. موش‌های C57BL/6 مورد نیاز در این تحقیق از بخش پرورش حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند.

گروه‌های مختلف حیوانات به‌صورت زیر طراحی شدند:

گروه۱: موش‌های آلوده به انگل ترانسژنیک با دریافت دارو.

گروه ۲: موش‌های آلوده به انگل ترانسژنیک بدون دریافت دارو.

گروه ۳: موش‌های آلوده به انگل وحشی با دریافت دارو.

گروه ۴: موش‌های آلوده به انگل وحشی بدون دریافت دارو.

برای هر یک از گروه‌های چهارگانه فوق از ۱۲ سر موش C57BL/6 ماده ۸-۶ هفته‌ای استفاده شد که به هر یک بعداز تمیزکردن با الکل، انگل لشمنیا در ناحیه قاعده دم تزریق شد. پیش از تزریق، انگل‌ها در سرم فیزیولوژی شسته شده و در حجم معینی از حلال به صورت سوسپانسیون درآورده شدند و پس از شمارش با لام نئوبار، هر موش با یک میلیون انگل لشمنیا در مرحله متاسیکلیک، آلوده شد. هر دو انگل سویه‌های وحشی و ترانسژنیک در همان موقع از موش‌های آلوده جدا شدند تا آثار پاتوژن خود را در هنگام تزریق حفظ کرده‌باشند. موش C57BL/6 دچار لشمانیوز جلدی می‌شود. بعداز مدتی با پیشرفت بیماری زخم باز و نسبتا بزرگی در محل تزریق انگل پدید می‌آید که پس از بهبود اسکار به جا می گذارد.

گانسیکلوویر و ۵- فلوروسیتوزین هر یک با دوز ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تزریق شد. درمان یک هفته بعد از اولین تزریق انگل آغاز شد و به مدت ۱۴ روز ادامه یافت.

داروهای مذکور به صورت داخل صفاقی (*I.P.*) تزریق شدند. دو هفته بعد از قطع دارو، موش‌های درمان شده که در ناحیه تزریق انگل هیچ نشانه‌ای از زخم بروز نداده بودند، از نظر ایمنی علیه لشمنیا، بررسی شدند. موش‌های بدون زخم به دو گروه مساوی تقسیم بندی شدند: یک میلیون انگل لشمنیا ماژور وحشی بیماریزا، به دسته اول تزریق شد و اندکس محافظت کننده نسبت به عفونت مجدد، با اندازه‌گیری هفتگی قطر زخم ارزیابی شد. قطر زخم تا انتهای هفته ۱۲ با کولیس ورنیه به صورت هفتگی اندازه‌گیری شد. همزمان، همراه با این گروه، گروه شاهد نیز که تاکنون با انگل لشمنیا مواجه نشده بودند، بررسی شدند. بدین صورت که حیوانات گروه شاهد هم با یک میلیون انگل لشمنیا ماژور وحشی آلوده شدند و پیشرفت بیماری در آنها با حیوانات گروه اول مقایسه شد. دسته دوم از سری موش‌هایی که درمان شده‌بودند، برای مشخص‌شدن الگوی سایتوکاین‌ها به روش ELISA بررسی شدند. بدین صورت که موش‌ها در شرایط استریل و زیر هود تشریح شدند و طحال آنها خارج شد. محتویات طحال با تزریق محیط RPMI-1640 (ساخت شرکت SIGMA) سرنگ به داخل آنها، خارج شد. این محلول حاوی سلول‌های لنفوسیتی فراوان است. پس از شمارش سلول‌ها، غلظت سوسپانسیون سلولی در محیط RPMI که حاوی FCS ۱۰ درصد است و با ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از هر یک از آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و

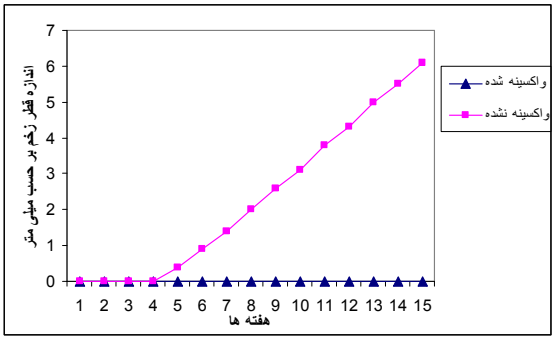
استرپتومایسین، طوری تنظیم شد که در هر میلی‌لیتر آن $2x10^5$ عدد سلول وجود داشته‌باشد. بشقاب ۲٤ خانه‌ای مخصوص کشت سلول برای کشت لنفوسیت‌ها بکار رفت و در هر خانه آن ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی مذکور، ریخته شد. ۳ خانه برای کشت لنفوسیت‌های طحال هر موش در نظر گرفته شد. بدین ترتیب که در یک خانه آنتی‌ژن SLA (Soluble Leishmania Antigen)، در خانه دیگر کونکاوالین *A* (ConA) و در خانه سوم به عنوان شاهد فقط محیط RPMI به جای آنتی ژن، افزوده شد. بشقاب‌های مذکور در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط CO2 ۵درصد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. بعد از رشد سلول‌ها، ۰/۵ میلی لیتر از محلول رویی را برداشتیم و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس به‌عنوان آنتی‌ژن در تست ELISA استفاده کردیم. سایتوکاین‌های IFN *γ* و IL-*4* در سیستم ELISA، با کیت Module set ساخت شرکت(Austria) Bender Medsystem ارزیابی شدند. داده‌ها با نرم افزار SPSS و آزمون مجذور کای تحلیل شدند. برای معنی‌دار بودن $p<0/05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

از بررسی چهار گروه موش C57BL/*6* ، نتایج زیر بدست آمد: از دو گروه درمان شده با گانسیکلوویر و ۵- فلوروسیتوزین ، همه موش‌های آلوده به لشمنیا ماژور سوش وحشی، پس از ۴ هفته، زخم ناشی از رشد انگل را در محل تزریق انگل (قاعده دم) نشان دادند. اما در موش‌های آلوده به انگل ترانسژنیک (انگل حساس به دارو) در مدت مشابه هیچگونه ندول یا زخم ناشی از آلودگی با انگل دیده نشد.

در دو گروهی که هیچگونه دارویی دریافت نمی‌کردند و با انگل وحشی یا ترانسژنیک آلوده شده بودند پس از گذشت ٤ هفته، زخم ظاهر شد.

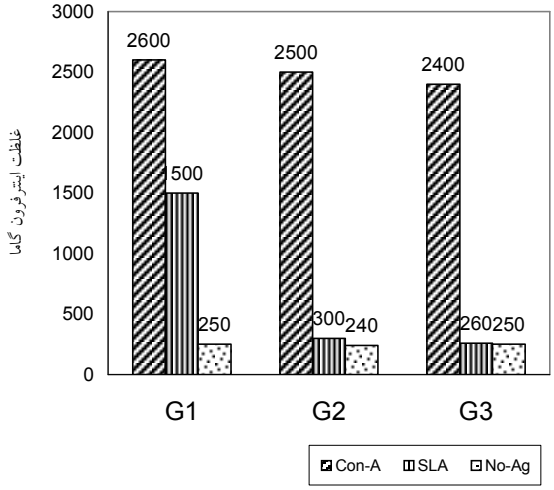
بررسی بروز زخم در دو گروه مورد آزمایش، نتایج جالب توجهی ارائه داد. پس از گذشت ٤ هفته، در گروه شاهد زخم ناشی از لشمنیا مشاهده شد، در صورتی که در گروه واکسینه زخمی بروز نکرد. نتایج این مرحله در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است.



نمودار۱: منحنی میانگین اندازه قطر زخم قاعده دم موشهای *C57BL/6*.

همانطور که ملاحظه می شود، در گروه واکسینه نشده ظهور زخم از هفته چهارم آغاز شده، اما در گروه واکسینه شده، هیچگونه زخم یا ندول ناشی از رشد انگل دیده نشده است.

بررسی ایمونولوژی به روش ELISA، در موش‌های واکسینه با سوش ترانسژنیک، نشان دهنده پدید آمدن تغییر عمده در سایتوکاین‌های مرتبط با ایمنی علیه لشمانیوز است که در بخش مقدمه نیز به نقش این سایتوکاین‌ها اشاره شده است. نتایج نشان داد که در این موش‌ها میزان IFN *γ* نسبت به گروه شاهد، افزایش چشمگیری می‌یابد. از طرف دیگر کاهش IL-*4* نیز قابل تأمل است. نتایج مذکور در نمودار شماره ۲ نشان داده‌شده است.



نمودار ۲: غلظت $IFN-\gamma$ در سوپرناتانت کشت سلولی طحال موشهای $C57BL/6$ بر حسب میانگین و بر اساس $Kruskal-Wallis$.

$G1$: سطح $IFN-\gamma$ در موشهای واکسینه شده.

$G2$: سطح $IFN-\gamma$ در موشهای با زخم باز.

$G3$: سطح $IFN-\gamma$ در موشهای سالم که تا کنون با انگل لشمنیا مواجه نشده اند.

بحث و نتیجه گیری

انگل لشمنیا متعلق به راسته کینتوپلاستیدا و عامل طیف وسیعی از بیماری‌هاست که از عفونت پوستی- موضعی تا عفونت احشایی منتشر را شامل می‌شود. نوع احشایی آن بدون درمان غالباً کشنده است. لشمانیوز در ۸۸ کشور جهان و از جمله مناطق وسیعی از ایران به صورت اندمیک وجود دارد. کنترل این بیماری از طریق مبارزه با ناقلان و مخازن تاکنون چندان مؤثر نبوده‌است. درمان بیماری نیاز به تزریق مکرر ترکیبات آنتیموان دارد که بعضاً عوارض جانبی دارد و همیشه موفقیت‌آمیز نیست(۹). به نظر می‌رسد بهترین روش مبارزه و کنترل این بیماری یافتن واکسن مؤثر علیه این بیماری باشد. تأثیر تزریق موتان‌های غیر بیماریزای حساس به حرارت، انگل‌های کشته شده با حرارت یا عصاره محلول بدست آمده از پروماستیگوت‌ها در ایمن‌سازی موش علیه لشمانیوز پوستی تا حدی موفقیت‌آمیز بوده‌است. اخیراً واکسن‌های جدیدی نیز شامل پروتئین‌های نوترکیب لشمنیایی، وکتورهای نوترکیب بیان‌کننده آنتی‌ژن‌های لشمنیا و انگل تخفیف حدت یافته ناشی از تعویض ژن‌ها تولید شده‌اند(۱۱و۱۲). به‌رغم تلاش زیاد، تاکنون واکسن مؤثری برای لشمنیا بدست نیامده‌است(۱۳). در هر دو مدل تجربی حیوانی و افراد بیمار، برای کنترل عفونت لشمنیایی لازم است ایمنی سلولی مؤثر و قادر به فعال کردن ماکروفاژ به حالت میکروبسید(میکروب‌کش) بوجود آید(۷و۸). طراحی مدل حیوانی مناسب برای تشخیص متغیرهای مهم در ایجاد ایمنی حفاظتی به دنبال واکسیناسیون با انگل لشمنیای نوترکیب(حساس به داروهای مجاز) لازم است. در این بررسی پتانسیل سیستم ترکیبی ژن-دارو (تیمیدین کیناز- گانسیکلوویر و سیتوزین دآمیناز- فلوروسیتوزین) به عنوان بخشی از استراتژی واکسیناسیون در لشمانیوز مد نظر قرار گرفته‌است. چون ابتلای به لشمانیوز سبب مصونیت دائم در برابر این بیماری می شود، قرن‌ها در برخی مناطق اندمیک لیشمانیزاسیون به عنوان روش پیشگیری از عفونت طبیعی، مرسوم بوده‌است.

در این تحقیق، در موش‌های C57BL/6 با سوش لشمنیا ماژور ترانسژنیک که دو سیستم خودکشی سلولی *Sc-cd* و HSV *tk* دارد و به داروهای گانسیکلوویر و ۵-فلوروسیتوزین حساس است، عفونت ایجاد شد و سپس با داروهای مذکور، رشد انگل را متوقف کردیم. موش‌های درمان شده پس از مواجهه مجدد با لشمنیا، مقاومت نسبتاً بالایی علیه این انگل از خود بروز دادند. به طوری که در آنها زخمی دیده نشد که نشان‌دهنده ایجاد ایمنی حفاظتی به میزان بسیار بالا در موش‌هایی است که از نظر ژنتیکی حساس به لشمنیا ماژور هستند. بررسی‌های ایمونولوژی نظیر ELISA نیز مؤید نتایج آزمون و حاکی از پدید آمدن میزان ایمنی مطلوب علیه

این عامل عفونی و نیز این نظر است که، در تحقیقـات آینده سیستم ترکیبی ژن-دارو می‌تواند به عنوان روشی کارآمد در یافتن واکسنی مؤثر علیه لشمنیا مورد توجـه بیشتری قرار گیرد.

منابع

1.Garcia LS. Diagnostic Medical Parasitology. 4th Edition. Washington; ASM Press, 2001: 202-215.

2. W.H.O. International Classification of Impairments, Activities and Participation (ICIDH-2). A manual of Dimensions of Disablement and Functioning. Beta-1 Draft for Field Trials. Geneva; World Health Organization, Workshop and Meeting. 12 March 1997. Geneva.

3._Davoudi N, Tate CA, Warburton C, Murray A, Mahboudi F, McMaster WR. Development of A Recombinant Leishmania Major Strain Sensitive to Ganciclovir and 5-Fluorocytosine for Use as A Live Vaccine Challenge in Clinical Trials.Vac 2005; 23:1170-7.

4.Wyler JD. Modern Parasite Biology. Cellular, Immunological, and Molecular Aspects.3rd Edition. New York, W.H. Freeman and Company 1995: 224-288.

5.McMaster WR, Button LL, Wallis A, Frommel J. Molecular Genetics of Repetitive Antigens and the Major Surface Glycoprotein of leishmania. Parasites: Molecular Biology, Drug and Vaccine Design 1990: 183-90.

6.Mahboudi F, Ghadiri A, Javaherian K, Amani M, McMaster WR. Refolding of rGP63 of L.Major Expessed in E.coli without Pro Region. ICOPA IX 1998; 11: 869-73.

7. Kemp M, Hviid L, Kharazmi A. Interferon-Gamma Production by Human T Cells and Natural Killer Cells in Vitro in Response to Antigens from the two Interacellular Pathogens Mycobacterium Tuberculosis and Leishmania Major. Scan J Immunol 1997; 46 : 495-9.

8. Nabors SG, Nolan T, Croop W, Li J, Farrell JP. The influence of the Site of Parasite Inoculation on the Development of Th1 and Th2 Type Immune Response in (BALB/C X C57B1/6) F1 Mice Infected with Leishmania Major. Parasite Immunol 1995; 17:569-579.

9.Bogdan C, Gessner A, Salbach W, Rollinghoff M. Invasion, Control and Persistence of Leishmania Parasites. Curr Opin Immunol 1996; 8:517-25.

10. Scott PE, Pearce E, Natovitz P, Sher A. Vaccination Against Cutaneous Leishmaniais in a Murine Model. II. Immunologic Properties of Protective and Nonprotective Subfractions of Soluble Promastigote Extract. J Immunol 1987; 139:3118-25.

11. Cox FEG. Designer Vaccines for Parasitic Diseases. Inter J Parasitol 1997; 27:1147-57.

12. Clayton CE. Genetic Manipulation of Kinetoplastida. Parasitol Tod 1999; 15:372-378.

13. Kenner JU, Ibbi AG, Kauh YC. Leishmaniasis. Med J 2001; 2(8):1-18.

Vaccination of C57BL/6 Mice with Transgenic Leishmania Major

Doosti A.(Ph.D)., Davoodi N.(Ph.D)

Abstract

Introduction: Leishmania is a kind of infection which arises of a mono cell. This disease prevalenced in topical countries of world. In despite of several studies which are done in overall the world, researchers didn't find an effective vaccination for it and common treatments didn't effective completely. Infect to leishmania create permanent immunity. Thus vaccination is the only cost-effective means to control leishmania.

Objective: Assaying the obtained immunogenecity by vaccination of C57BL/6 mice with transgenic leishmania major.

Materials and Methods: In present study transgenic strain of L. major which express two suicide genes; thymidine kinase gene of Herpes Simplex Virus type 1(HSV-tk) and cytosine deaminase gene of Saccharomyces cervisiea (Sc-cd) in its genome have been used for vaccination of mice. C57BL/6 mice were infected by transgenic L. major and treated with ganciclovir and 5-fluorocytosine together.

Result: The ELISA cytokine assay in this group showed high increase of IFN- γ and low IL-4, next challenge in vaccination was blocked disease progression, which was due to high level of immunity.

Conclusion: The inducible expression of suicide gene and drug can used as valuable method to find the safe and effective vaccine against Leishmaniasis.

Key words: Leishmania/ Leishmaniasis/ Mice, Transgenic/ Vaccines