

# *Leishmania infantum* DNA Aşısı Adayı LACK Geninin Klonlanması

## Cloning of the DNA Vaccine Candidate LACK Gene of *Leishmania infantum*

Serkan Karaca, Şirin Sahra Ceylan, Süleyman Yazar, Salih Kuk

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye

### ÖZ

**Amaç:** Hücre içi zorunlu parazitlerden *Leishmania* cinsi protozoonların neden olduğu leishmaniasis, Dünya Sağlık Örgütü'nün önemli tropikal hastalıklar listesinde yer almaktadır. Leishmaniasis tedavisinde rutin olarak kullanılan bileşiklerin yüksek maliyetleri, toksisite ve yan etkilerinin fazla olması nedeniyle alternatif tedavi ve aşı araştırmaları devam etmektedir. Henüz efektif bir aşı geliştirilememiştir. Bu çalışmada, *Leishmania infantum*'a karşı en umut verici adaylar arasında yer alan homolog aktive edilmiş C kinaz reseptör (LACK) geninin klonlanması amaçlanmıştır.

**Yöntemler:** Çalışmada, *L. infantum* promastigot kültüründen genomik DNA izolasyonu, spesifik primerlerle LACK geninin eldesi, LACK geninin pJET1.2 plazmidine klonlama reaksiyonu ile yerleştirilmesi ve rekombinant plazmidin kompetan hücrelere transformasyonu yapılmıştır. Rekombinant plazmidin varlığı PCR tarama ile araştırılmıştır. Pozitif kolonilerden miniprep yapıldıktan sonra klonlama; PCR, restriksiyon enzim deneyleri ve DNA dizi analizi yöntemleri ile doğrulanmıştır.

**Bulgular:** LACK geneine spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR sonrasında 939 baz çiftlik PCR ürünü görüntülenmiştir. E.coli kompetan hücrelerine transforme edilen rekombinant plazmid PCR-tarama ile gösterilmiştir. Rekombinant plazmidin klonlanan geni içerdiği PCR ile gösterilmiştir. DNA dizi analizi yapılarak, klonlanan genin DNA dizisi elde edilmiştir.

**Sonuç:** Leishmaniasise karşı en umut verici DNA aşı adaylarından olan ve *L. infantum* promastigotlarından izole edilen LACK geni klonlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Leishmaniasis, *Leishmania infantum*, LACK geni, DNA aşısı, klonlama

**Geliş Tarihi:** 22.06.2016

**Kabul Tarihi:** 23.06.2016

### ABSTRACT

**Objective:** Leishmaniasis is caused by an obligate intracellular protozoa belonging to *Leishmania* genus and listed among major tropical diseases by WHO. Because of the high costs, toxicity, and adverse effects of routinely used compounds in the treatment, alternative treatment and vaccine studies are underway. An effective vaccine has not been developed to date. In this study, we aimed to clone one of the most promising DNA vaccine candidates: the homolog-activated C kinase (LACK) gene of *Leishmania infantum*.

**Methods:** *L. infantum* genomic DNA was isolated from promastigote culture. The LACK gene was placed into plasmid pJET1.2. Then, recombinant plasmids were transformed into competent cells. The presence of recombinant plasmids was determined by PCR screening. Cloning was confirmed by PCR, restriction enzyme assays, and finally, DNA sequence analysis, after making miniprep from positive colonies.

**Results:** After performing PCR with LACK-gene specific primers, 939-bp PCR products were observed. Recombinant plasmids, which were transformed into competent *Escherichia coli* cells, were verified by PCR screening. It was verified by PCR that the recombinant plasmid contained the LACK gene. DNA sequence analysis was performed to obtain the DNA sequence.

**Conclusion:** One of the most promising DNA vaccine candidates against leishmaniasis, the LACK gene, was cloned in this study.

**Keywords:** Leishmaniasis, *Leishmania infantum*, LACK gene, DNA vaccine, cloning

**Received:** 22.06.2016

**Accepted:** 23.06.2016

### GİRİŞ

Leishmaniasis, *Leishmania* cinsi zorunlu hücre içi protozoonların neden olduğu, özellikle Afrika, Latin Amerika, Güney ve Orta Asya, Akdeniz Havzası ve Ortadoğu'da görülen, Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) yoksulluğa bağlı, ihmal edilmiş başlıca bulaşıcı hastalıklar listesinde yer alan, vektör kaynaklı

bir hastalıktır (1, 2). Leishmaniasis, dünya genelinde 98 ülkede, yaklaşık 350 milyon insanı tehdit etmektedir (3). Yıllık yeni olgu sayısının 1.3 milyon, leishmaniasise bağlı yıllık ölüm sayısının ise 20-50 bin aralığında olduğu tahmin edilmektedir (4). *Leishmania* cinsine ait 30 türden yaklaşık 21 tür insanda leishmaniasise neden olmaktadır (5, 6). Bu türler morfolojik olarak ayırt edilememekte ancak izoenzim analizleri, mole-

**Yazışma Adresi / Address for Correspondence:** Dr. Salih Kuk E.mail: salihkuk@hotmail.com

DOI: 10.5152/tpd.2016.3743

©Telif hakkı 2016 Türkiye Parazitoloji Derneği - Makale metnine [www.tparazitolog.org](http://www.tparazitolog.org) web sayfasından ulaşılabilir.

©Copyright 2016 Turkish Society for Parasitology - Available online at [www.tparazitolog.org](http://www.tparazitolog.org)

küler metotlar veya monoklonal antikorlar kullanılarak ayrımları gerçekleştirilebilmektedir. Eski Dünya *Leishmania* türlerinin vektörlüğünü *Phlebotomus* cinsi dişi kum sinekleri, Yeni Dünya *Leishmania* türlerinin vektörlüğünü ise *Lutzomyia* cinsi dişi kum sinekleri yapmaktadır. Parazit için birçok memeli ve insan rezervuar olarak görev almaktadır.

Leishmaniasisin; visseral leishmaniasis (VL), kutanöz leishmaniasis (KL) ve mukokutanöz leishmaniasis (MKL) olmak üzere 3 esas tipi vardır. Bunlara sonradan diffüz kutanöz leishmaniasis (DKL) ve post-kala-azar dermal leishmaniasis (PKDL) eklenmiştir. Hastalığın tipi *Leishmania* türüne ve o türün izoenzim yapısına bağlıdır (7, 8). Yaygın *Leishmania* türlerinden biri olan *Leishmania infantum* (*L. infantum*) Akdeniz havzasında, Ortadoğu ve Asya ülkelerine kadar uzanan bölgede VL'e neden olmaktadır (9). Leishmaniasisin kontrolü amacıyla yapılan aşı çalışmaları halen devam etmektedir fakat henüz etkin bir aşı geliştirilememiştir.

*L. infantum*'a ait LACK geni (aktive edilmiş C kinaz reseptörü) üçüncü nesil aşilar olarak kabul edilen DNA aşı adaylarından biridir ve umut verici adaylar arasındadır (10, 11).

Çalışma ile ülkemizde *L. infantum* LACK geni klonlanmıştır. Çalışmada elde edilen ürün sonraki çalışmalarda gerek DNA, gerekse protein aşı adayı olarak kullanılabilir.

## YÖNTEMLER

Çalışmada öncelikle NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) besiyerinde *L. infantum* (MHOM/TR/2009/EP174) promastigot kültürü yapılarak besiyeri gün aşırı kontrol edilmiştir.

İkinci basamak olarak QIAamp Tissue Kit (QIAGEN, ABD) prosedürü modifiye edilerek kültürden genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyon kiti prosedürü uygulandıktan sonra elde edilen son süzüntü içerisindeki total genomik DNA örneği PCR için -20°C'de saklanmıştır. Daha sonra LACK geni primerleri ile PCR yapılmıştır. PCR reaksiyonu için LiLACK F; (5'- ATGAACTACGAGGGTACCT -3') ve LiLACK R; (5'- TTAACGCGTCCGGAGATG -3') primerleri kullanılmıştır. 95°C de 5 dk.'lık ön ısıtma ile başlayan sırasıyla 95°C de 1 dk. denatürasyon, 56°C de 1 dk. bağlanma, 72°C de 1 dk. uzamadan oluşan 35 döngü sonrası 72°C'de 15 dk.'lık son uzama ile biten PCR programı kullanılmıştır. PCR ürünü, etidyum bromidle boyanmış %1.5'luk agaroz jelde yürütülmüş ve Gel Logic 212 Pro Jel görüntüleme cihazıyla görüntülenmiştir (Carestream, ABD).

Daha sonra PCR ürününün saflaştırılması için High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, ABD) protokolü uygulanmıştır. Saflaştırılmış PCR ürünü CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak pJET1.2/blunt cloning vector plazmidine yerleştirilmiştir. Elde edilen rekombinant plazmidin OneShot TOP10 Chemically Competent *E. coli* kompetan hücrelerine (Invitrogen, ABD) transformasyonu yapılmıştır. Transformasyon yapılan hücrelerin üzerine oda sıcaklığındaki SOC sıvı besiyeri eklenmiştir. Ardından LB katı besiyere ekilerek 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. LB katı besiyerinde koloni gelişimi gözlemlendikten sonra besiyerdeki koloniler numaralandırılarak yeni bir besiyere ekim yapılmıştır. Besiyeri 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan kolonilerin rekombinant plazmidini içerip içermediğini belirlemek için numaralandırılmış kolonilerden örnekler

alınarak PCR yapılmıştır. PCR ürünü, etidyum bromidle boyanmış %1.5'luk agaroz jelde yürütülerek Gel Logic 212 Pro Jel görüntüleme cihazıyla görüntülenmiştir (Carestream, ABD).

Klonlama; PCR tarama, miniprep ve PCR, restriksiyon enzim deneyleri ve DNA dizi analizi ile doğrulanmıştır. Enzim kesimi için pJET1.2/blunt Klonlama Vektörü'nü 2 yerden kesen *BglIII* (Promega, ABD) enzimi kullanılmıştır. DNA dizi analizi için ise pJET1.2 Forward Sequencing Primer, (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'), pJET1.2 Reverse Sequencing Primer, (5'-AAGAACATCGATTTC-CATGGCAG-3') primerleri ve Bigdye Cycle Sequencing kit v3.1 (Applied Biosystems, ABD) kullanılmıştır. Sonuçlar otomatik DNA dizi analiz cihazı (ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer, ABD)'nda analiz edilmiştir. Elde edilen DNA dizi analizi sonuçları Chromas v.1.45 (ConorMcCarty School of Science Griffith University, Australia) programı ile incelendikten sonra <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> internet adresinde yer alan web tabanlı BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (National Center for Biotechnology Information, ABD) programına girilmiştir. Çalışmadan elde edilen DNA dizisi GenBANK veri tabanındaki mevcut *Leishmania* sp. DNA dizileri ile karşılaştırılmıştır.

Çalışmada anabilim dalımızda devam ettirilen promastigot kültüründen DNA izolasyonu yapıldığı ve sadece DNA aşı adayı elde edildiği için çalışmanın yapısından dolayı etik kurul onayına gerek duyulmamıştır.

## BULGULAR

NNN besiyerinde kültürü yapılan *L. infantum* promastigotları Nikon Eclipse E600 (Nikon, Japonya) video ataçmanlı inverted mikroskop altında görüntülenmiştir (Resim 1).

LACK genine spesifik primerler kullanılarak yapılan PCR sonrasında 939 baz çiftlik PCR ürünü, agaroz jelde marker eşliğinde yürütülerek görüntülenmiştir (Resim 2).

Elde edilen PCR ürünü klonlama vektörüne yerleştirilmiştir. Ligasyon ürünü OneShot TOP10 Chemically Competent *E. coli* kompetan hücrelerine transforme edilmiştir. Bir gece inkübasyon sonrası oluşan koloniler tespit edilmiştir (Resim 3).

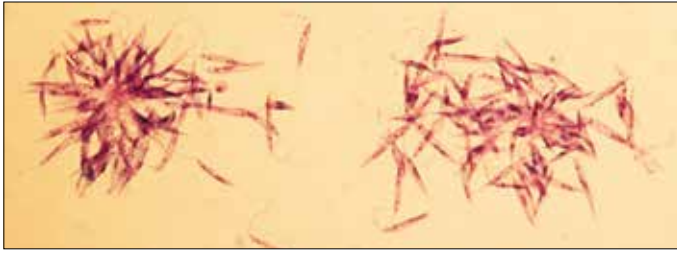
Transformasyon sonrası gözlenen kolonilerin rekombinant plazmidini içerip içermediğini anlamak için PCR tarama yapılmıştır. Katı besiyerinden seçilen 11 koloniden üçünün rekombinant plazmidini içerdiği PCR-tarama ile gösterilmiştir (Resim 4).

Rekombinant plazmid varlığı tespit edilen üç koloniden miniprep yapılarak rekombinant plazmidler saflaştırılmıştır. Rekombinant plazmidin klonlanan geni içerdiği PCR ile gösterilmiştir. Saflaştırılan rekombinant plazmidler, *BglIII* restriksiyon enzimleri ile kesilerek klonlanan genin varlığı doğrulanmıştır (Resim 5).

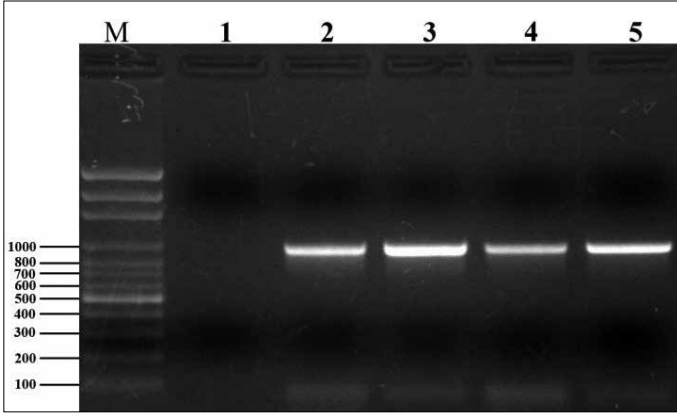
Klonlamanın doğruluğunu kanıtlamak için son olarak rekombinant plazmidin DNA dizi analizi yapılarak, klonlanan genin DNA dizisi elde edilmiştir (Tablo 1).

## TARTIŞMA

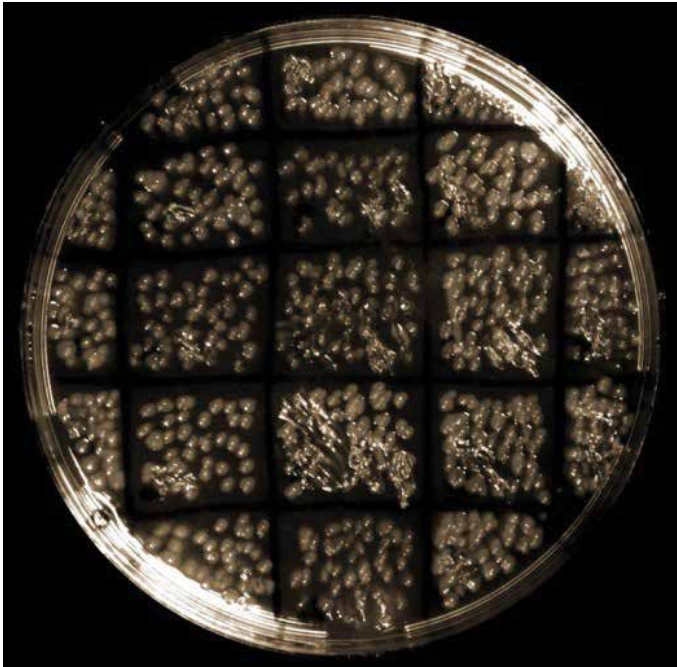
*Leishmania* türlerinin birbirine çok yakın olması, epidemiyolojisinin kompleks olması, zoonotik ve antropotik döngülere sahip olması gibi nedenler leishmaniasisle mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Leishmaniasis, HIV hastalarında relaps oluşturabilmekte ve



**Resim 1.** NNN besiyerinde üreyen küme halindeki *L. infantum* promastigotları (X40)

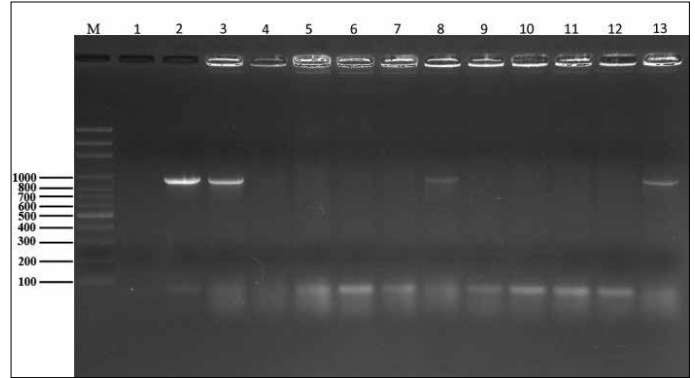


**Resim 2.** PCR ürününün agaroz jel elektroforezde görünümü  
M: 100 bç'lik marker (SolisBioDyne, Estonya); 1: negatif kontrol; 2, 3, 4, 5: 939 bç'lik *L. infantum* LACK PCR ürünü



**Resim 3.** Transformasyon sonrası üretilen koloniler

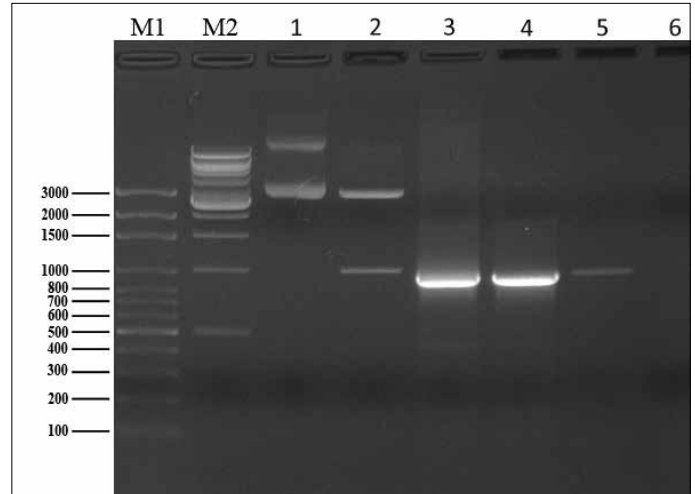
hastalığın tam tedavisi güçleşmektedir. Tüm bu nedenlerden dolayı leishmaniasise karşı tedavi ve aşı çalışmalarında büyük araştırmalar yapılmaktadır. KL tedavisinde kullanılan kemoterapi yetersiz kalabilmektedir. VL ve KL tedavisinde kullanılan pentavalan antimon bileşiklerinin ve diğer tedavi ajanlarının toksisite ve yan etkilerinin çokluğu, lipozomal amfoterisin B (L-AMB) benzeri



**Resim 4.** Kolonilerin rekombinant plazmid varlığının PCR - tarama ile doğrulanması

M-100 bç'lik marker

1: negatif kontrol; 2: pozitif kontrol; 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11 ve 12: PCR - tarama sonucu negatif örnekler; 3, 8 ve 13: PCR - Tarama ürünü 942 bç'lik *L. infantum* PCR ürünü pozitif örnekler



**Resim 5.** Rekombinant plazmidlerin miniprep, restriksiyon enzimleri ile kesim ve PCR sonuçları

M1: 100 bç'lik marker (SolisBioDyneFIREPol, Estonya); M2: 500 bç'lik marker (SolisBioDyneFIREPol, Estonya); 1: kesilmemiş rekombinant plazmid; 2: BgIII restriksiyon enzimi ile kesim sonucu; 3, 4: Template olarak rekombinant plazmidin kullanıldığı PCR sonucunda oluşan 939 bç'lik ürün; 5: pozitif kontrol; 6: negatif kontrol

tedavi edici ajanların yüksek maliyeti, bu ajanlara karşı direnç gelişimi gibi faktörler alternatif tedavi yöntemlerinin ve aşı geliştirilmesinin gerekliliğini arttırmaktadır. Leishmaniasise karşı etkin bir aşı henüz geliştirilememiştir.

İkinci nesil aşı adaylarında kullanılan antijenlerden biri olan LACK, 36 kDa'luk bir proteindir. LACK antijeni *Leishmania* türlerinin hem promastigot hem de bir amastigot formlarında bulunmakta ve parazitin birçok metabolik faaliyetinde görev almaktadır.

Enfekte inbred BALB/C farelerin enfeksiyonu sırasında I-A major histocompatibilite kompleksi sınıf-II (MHC II) molekülleri eksprese edilmekte, immunodominant LACK antijenin ekspresyonu IL-4 salgılanmasını tetiklemekte, hastalığı tanımlayan T hücreleri de V $\beta$ 4/V $\alpha$ 8 T-hücresi reseptörünü eksprese etmektedir. LACK-reaktif T hücrelerinin tükenmesi erken IL-4 yanıtını azaltmakta-

**Tablo 1.** DNA dizi analizi ile elde edilen *L. infantum* LACK genine ait DNA dizisi

1	atgaactacg	agggtcacct	gaagggccac	cgcggtatggg	tcacctcct	ggcctgcccg
60	cagcaggcgg	ggctgtacat	caaggtggtg	tcgacgtcg	gcatggtcac	ggcctatctg
120	tggaaagcca	accccgaccg	ccacagcgtg	gacagcgact	acgggtctgcc	gagccaccgc
180	ctcgagggcc	acaccggctt	cgtgtcgtgt	gtgtcgtgg	cccacgccac	cgactacgcg
240	ctgaccgcgt	cctgggaccg	ctccatccgc	atgtgggacc	tgcgcaatgg	ccagtgccag
300	cgcaagtcc	tgaagcacac	caaggacgtg	ctcgccgtcg	ccttctgcc	ggacgaccgc
360	ctgatcgtgt	ccgcggggccg	cgacaacgtg	atccgcgtgt	ggaacgtggc	ggcgagtg
420	atgcacgagt	tcctgcgcga	cggccacgag	gactgggtga	gcagcatctg	tttctcggc
480	tcgctggagc	atccgatcgt	gggtgccggc	agctgggaca	acaccatcaa	ggatggaac
540	gtgaacgggg	gcaagtgtga	gcgcacgctc	aagggccaca	gcaactacgt	gtccacgggtg
600	acgggtgctgc	cagacgggtc	gctgtgcgcg	tccggcggca	aggacggcgc	ggcgctgctg
660	tgggacctga	gcaccggcga	gcagctgttc	aagatcaacg	tggagtgcgc	catcaaccag
720	atgcctct	cgccaaccg	cttctggatg	tgctgcgcga	cggagaggtc	tctgtccgtg
780	tacgacctgg	agagcaaggc	tgtgattgcg	gagctgacgc	cggacggcgc	gaagcctcc
840	gagtcatct	ccattgcctg	gtccgccgac	ggcaactc	tgtactccg	tcacaaggac
900	aacctgatcc	gcgtgtggtc	catctccgac	gccgagtaa		

dır. Bu durum koruyucu bir Th-1 fenotipi geliştirilmesine imkân sağlamaktadır (12, 13). Farelerde *L. major* enfeksiyonu üzerinde yapılan çalışmalarda gözlenen immunopatojenik fonksiyonu ve önemi, LACK antijenine karşı büyük ilgi duyulmasını ve LACK'ın leishmaniasis için potansiyel aşı adayları arasında öne çıkmasını sağlamıştır (14, 15).

LACK proteininin kullanıldığı aday aşılarda ilgili çalışmalarda elde edilen sonuçlar henüz istenilen düzeyde ve geniş kapsamlı değildir. Güncel çalışmalarda araştırmacılar LACK proteini yerine LACK DNA'sının kullanıldığı üçüncü nesil aşı adaylarına odaklanmıştır (11, 15). Yapılan çalışmalarda LACK geninin immünojenitesinin yüksek olduğu ama deneysel visseral leishmaniasis modelinde uzun süreli koruyuculuğunun olmadığı tespit edilmiştir (16). LACK DNA ve proteininin *Vaccinia* virüsü vektörlüğünde birlikte kullanıldığı çalışmada ise aşının koruma gösterdiği tespit edilmiştir (17). Son yıllarda yapılan çalışmalarda gelişen yeni teknikler de kullanılarak LACK genine bazı aminoasitlerin eklenmesi ya da çıkarılması ile immünojenitenin artırılması amaçlanmıştır (14).

Leishmaniasis gibi doğal bağışıklık hücrelerini hedef alan enfeksiyonlarda doğal immunoreseptörleri hedef alan adjuvanların kullanılması önemli ve etkin bir stratejidir. Doğal bağışıklığın indüklenmesinin, kazanılmış bağışıklığın oluşabilmesi için bir gereklilik olduğunun ortaya konulmasından sonra aşı çalışmalarında adjuvan kullanımı önem kazanmıştır.

Leishmaniasis enfeksiyonlarında adjuvan olarak TLR4 agonisti monofosforil lipid-A, TLR7/8 agonisti imiquimod, TLR9 agonisti CpG, adenoviral vektörler, interlökin-12 (IL-12), alüminyum tuzları (alum) ve bazı diğer immunostimulasyon kompleksleri kullanılmıştır (18-20).

*Leishmania* parazitlerinin, leishmanial antijenlerin ve aşı adjuvanlarının daha iyi anlaşılması konusunda yapılan çalışmalar ve elde edilen olumlu sonuçlar, leishmaniasisin kontrolü için etkili aşılarda geliştirme umidini arttırmaktadır.

## SONUÇ

Bu çalışmada; leishmaniasise karşı en umut verici DNA aşı adaylarından olan ve *L. infantum* promastigotlarından izole edilen LACK geni klonlanmıştır. Aşı çalışmalarında uygun immünojen hedef ile birlikte uygun adjuvanın seçimi ve uygulanması önem taşımaktadır. Bu çalışmadan sonra planlanacak projelerde LACK antijeni ve LACK DNA'sının uygun adjuvanlarla birlikte aşı çalışmalarında kullanılması planlanmaktadır.

**Etik Komite Onayı:** Bu çalışma için gerekli değildir.

**Hasta Onamı:** Bu çalışma için hasta onamına gerek yoktur.

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Fikir - S.K.; Tasarım - S.K., S.K.; Denetleme - S.K., S.Y.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - S.K., S.C.; Analiz ve/veya Yorum - S.K., S.Y.; Literatür Taraması - S.K.; Yazıyı Yazan - S.K.; Eleştirel İnceleme - S.K., S.Y.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

**Finansal Destek:** Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenmiştir. Proje Numarası: TYL-2012-4264.

**Ethics Committee Approval:** Not required in this study.

**Informed Consent:** Not required in this study.

**Peer-review:** Externally peer-reviewed.

**Author Contributions:** Concept - S.K.; Design - S.K., S.K.; Supervision - S.K., S.Y.; Funding - S.K., S.C.; Materials - S.K., S.C.; Data Collection and/or Processing - S.K., S.C.; Analysis and/or Interpretation - S.K., S.Y.; Literature Review - S.K.; Writing - S.K.; Critical Review - S.K., S.Y.

**Conflict of Interest:** No conflict of interest was declared by the authors.

**Financial Disclosure:** This work was supported by Research Fund of the Erciyes University. Project Number: TYL-2012-4264.

## KAYNAKLAR

1. Ryan KJ, Ray CG, Sherris JC. Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases. 4th ed. New York ; London: McGraw-Hill; 2003; p. 695.
2. European Union., World Health Organization, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Global report for research on infectious diseases of poverty. Geneva, Switzerland: TDR/World Health Organization WHO Document Production Services; 2012. p. 168.
3. (DNDi) DfNDi. About Leishmaniasis [22.06.2016]. Available from: <http://www.dndi.org/diseases-projects/leishmaniasis/>.
4. World Health Organization. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases : Third WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organization; 2015. p. 191.
5. World Health Organisation. Control of the leishmaniases. World Health Organisation Technical Report. 2010.
6. (CDC) CFDCaP. Parasites - Leishmaniasis [22.06.2016]. Available from: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>.
7. Gradoni L, Gramiccia M, Leger N, Pesson B, Madulo-Leblond G, Killick-Kendrick R, et al. Isoenzyme characterization of *Leishmania* from man, dog and sandflies in the Maltese islands. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991; 85: 217-9. [\[CrossRef\]](#)
8. Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania* - Use of Isoenzymes - Suggestions for a New Classification. *Ann Parasit Hum Comp* 1990; 65: 111-25. [\[CrossRef\]](#)
9. Kose S, Toz SO, Korkmaz M, Ozbel Y. Visceral leishmaniasis: A rarely diagnosed adult case in Turkey. *Türkiye Parazitoloji Dergisi* 2005; 29: 1-2.
10. Palatnik-de-Sousa CB, Barbosa Ade F, Oliveira SM, Nico D, Bernardo RR, Santos WR, et al. FML vaccine against canine visceral leishmaniasis: from second-generation to synthetic vaccine. *Expert Rev Vaccines* 2008; 7: 833-51. [\[CrossRef\]](#)
11. Kumar A, Samant M. DNA vaccine against visceral leishmaniasis: a promising approach for prevention and control. *Parasite Immunol* 2016; 38: 273-81. [\[CrossRef\]](#)
12. Launois P, Maillard I, Pingel S, Swihart KG, Xenarios I, Acha-Orbea H, et al. IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. *Immunity* 1997; 6: 541-9. [\[CrossRef\]](#)
13. Julia V, Rassoulzadegan M, Glaichenhaus N. Resistance to *Leishmania major* induced by tolerance to a single antigen. *Science* 1996; 274: 421-3. [\[CrossRef\]](#)
14. Jensen KD, Sercarz EE, Gabaglia CR. Altered peptide ligands can modify the Th2 T cell response to the immunodominant 161-175 peptide of LACK (*Leishmania* homolog for the receptor of activated C kinase). *Mol Immunol* 2009; 46: 366-74. [\[CrossRef\]](#)
15. Dondji B, Perez-Jimenez E, Goldsmith-Pestana K, Esteban M, McMahon-Pratt D. Heterologous prime-boost vaccination with the LACK antigen protects against murine visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 2005; 73: 5286-9. [\[CrossRef\]](#)
16. Basu R, Bhaumik S, Basu JM, Naskar K, De T, Roy S. Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. *J Immunol* 2005; 174: 7160-71. [\[CrossRef\]](#)
17. Ramos I, Alonso A, Marcen JM, Peris A, Castillo JA, Colmenares M, et al. Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response. *Vaccine* 2008; 26: 333-44. [\[CrossRef\]](#)
18. Aebischer T, Wolfram M, Patzer SI, Ilg T, Wiese M, Overath P. Subunit vaccination of mice against new world cutaneous leishmaniasis: Comparison of three proteins expressed in amastigotes and six adjuvants. *Infect Immun* 2000; 68: 1328-36. [\[CrossRef\]](#)
19. Soudi S, Hosseini AZ, Hashemi SM. Co-administration of rectal BCG and autoclaved *Leishmania major* induce protection in susceptible BALB/c mice. *Parasite Immunol* 2011; 33: 561-71. [\[CrossRef\]](#)
20. Musa AM, Khalil EA, Mahgoub FA, Elgawi SH, Modabber F, Elkadaru AE, et al. Immunotherapy of persistent post-kala-azar dermal leishmaniasis: a novel approach to treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 102: 58-63. [\[CrossRef\]](#)