دانشور
پزشکی

تهیه آنتی‌بادی منوکلونال علیه آنتی‌ژن A۶۰ از مایکوباکتریوم بویس

نویسندگان: سالار بختیاری[1*]، دکتر محمد تقی‌خانی[2]، دکتر علیرضا خبیری[3]، رسول موخواه[1] و جواد محمدنژاد آروق[1]

۱. دانشجوی دکتری بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۲. دانشیار گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۳. استادیار گروه انگل‌شناسی، انستیتو پاستور
* نویسنده مسئول: Email: salar_bakhtiari@yahoo.com

دوماهنامه علمی – پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال چهاردهم – شماره ۶۶
دی ۱۳۸۵

وصول: ۸۳/۸/۲
ارسال اصلاحات: ۸۴/۳/۹
دریافت اصلاحات: ۸۴/۳/۱۰
ارسال اصلاحات: ۸۴/۴/۲۰
دریافت اصلاحات: ۸۴/۴/۲۲
پذیرش: ۸۴/۶/۱۵

چکیده

مقدمه: آنتی‌بادی منوکلونال علیه آنتی‌ژن A۶۰ در مایکوباکتریوم بویس دارای کاربردهای فراوانی است که مهم‌ترین آن‌ها شامل طراحی کیت تشخیصی سریع به روش ELISA برای بیماری سل، و شیمی‌درمانی برخی از انواع سرطان است.

روش بررسی: یکی از متداول‌ترین روش‌های تولید آنتی‌بادی منوکلونال، امتزاج لنفوسیت‌های B طحال موش‌های ایمن شده و سلول‌های میلوما است. در این پژوهش، ابتدا موش‌های Balb/c ماده، تحت تزریقات منظم BCG و آنتی‌ژن A۶۰ قرار گرفتند و تیتر آنتی‌بادی تولید شده پس از هر تزریق مورد بررسی قرار گرفت. پس از اطمینان از ایمن شدن موش‌ها، بین لنفوسیت‌های طحالی آن‌ها و سلول‌های میلومای Sp2/0 با کمک پلی‌اتیلن‌گلیکول (50%, PEG) امتزاج برقرار شد و سلول‌ها در محیط انتخابی HAT قرار گرفتند. بر روی مایع رویی تمام کلون‌های تشکیل شده، آزمون الایزا انجام گرفت تا کلون‌های مولد آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن A۶۰ شناسایی و انتخاب شوند.

یافته‌ها: طی یک بار فیوژن ۶۲ کلون هیبریدوما به‌دست آمد که از این تعداد، ۲ کلون MB_1D_5 و MB_3F_8 که مولد آنتی‌بادی اختصاصی و واجد جذب بالا در آزمون الایزا بودند، انتخاب گشتند. سپس بر روی آن‌ها آزمون آخرین حد رقت (limiting dilution) انجام شد و تک کلون‌های تولیدکننده آنتی‌بادی منوکلونال علیه آنتی‌ژن A۶۰ تکثیر شدند.

بحث و نتیجه‌گیری: بهتر است در تهیه آنتی‌بادی منوکلونال علیه آنتی‌ژن A۶۰ اپی‌توپ‌های ویژهٔ گونه‌ای به خوبی شناسایی شوند تا آنتی‌بادی منوکلونال تولید شده علیه این آنتی ژن با سایر گونه‌های مایکوباکتریوم واکنش متقاطع نداشته باشند.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌بادی منوکلونال، مایکوباکتریوم بویس، هیبریدوما، آنتی‌ژن A۶۰

مقدمه

آنتی‌ژن ماکرومولکولی مقاوم در برابر حرارت (Thermostable Macromolecular Antigen: TMA) موجود در M.Bovis BCG همان کمپلکس آنتی‌ژن A۶۰ است. آنتی‌ژن A۶۰ یک ماده‌فعال‌از نظر ایمنی(immune reactive) است و عامل اصلی اثر ایمنی‌زایی در واکسن BCG محسوب می‌شود [۱،۲،۳،۴،۵،۶و۷] با بررسی آنتی‌ژن A۶۰ تحت اثر مواد شیمیایی (محلول‌های آلی، اسید و قلیا)، مشخص شده که این آنتی‌ژن، یک کمپلکس گلیکولیپوپروتئین است که از ۳ جزء چربی‌های آزاد،

Archive of SID
www.SID.ir

لیپوپلی‌ساکارید و لیپوپروتئین تشکیل شده که با تجزیه شیمیایی قابل جداسازی‌اند. جزء لیپید آزاد باعث پایداری اجزای همراهش می‌شود. دو جزء دیگر را می‌توان از چربی‌های همراهش جدا کرد و پلی‌ساکارید و پروتئین بدون چربی به‌دست آورد. مشخص شده که آنتی‌ژن A۶۰ تقریباً از ۳۰ جزء شامل لیپیدها، پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌های مختلف تشکیل شده است. اجزای پلی‌ساکاریدی آنتی‌ژن A۶۰ دارای واکنش متقاطع با آرابینومانان و آرابینوگالاکتان هستند. آنتی‌ژن A۶۰ حاوی گلوکز، مانوز و مقدار کمی آرابینوز است. بررسی شیمیایی اجزای لیپیدی TMAsنشان داده است که آنتی‌ژن A۶۰ دارای لیپیدهای آزاد با اسیدهای چرب اشباع C12-C14 و اسیدهای چرب غیراشباع C18، فسفاتیدیل اینوزیتیدمانوزید و چربی‌های متصل به گلیکان و پپتیدوگلیکان است [۳و۸]. مطالعات با آنتی‌بادی‌منوکلونال پروتئین‌های KDa ۳۸ متصل به فسفات و KDa۳۵ در ارتباط با غشای پلاسمایی، پروتئین KDa۱۹ و پروتئین شوک حرارت KDa۱۴ را در آنتی‌ژن A۶۰ مشخص کرده است. به‌طور کلی، آنتی‌ژن‌های TMA متعلق به اجزای آنتی‌ژنی با واکنش متقاطع ایمونولوژیک (Immuno Cross Reactive Antigenic Components: Im-CRAC) هستند، که آنتی‌ژن‌های TMAs در بین سه‌جنس از باکتری‌های Nocardia، Mycobacterium و Corynebacterium (CMN group) واکنش متقاطع (cross-reactivity) شدیدی دارند. تنها ۷/۸ درصد از اپی‌توپ‌های آنتی‌ژن A۶۰ ویژه‌گونه‌ای (species specific) هستند [۱و۸].

مواد و روش

موش Balb/c، BCG لیوفیلیزه و واکسن BCG از انستیتو پاستور کرج و آنتی‌ژن A۶۰ از شرکت آندا (Anda) خریداری شد. تمام مواد شیمیایی از شرکت‌های «مرک و سیگما» (Merck & Sigma) خریداری گردید.

تزریق BCG به هر موش، در نوبت اول به‌صورت داخل صفاقی بود. غلظت µg/mL ۱۰ از BCG در بافر PBS تهیه شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از این محلول با یک میلی‌لیتر ادجوانت ناقص فروند به خوبی مخلوط گردید تا غلظت µg/mL ۵ از BCG حاصل شود. حجم تزریقی به هر موش ۰/۲ میلی‌لیتر بود.

در فواصل بین تزریقات و تقریباً در زمانی حدود ۲۰ روز پس از تزریق اول، به‌منظور ارزیابی میزان پاسخ سیستم ایمنی نسبت به آنتی‌ژن، آزمون ELISA انجام شد. پس از ۴۵-۳۰ روز، تزریق دوم صورت گرفت که روش کار آن دقیقاً مطابق با تزریق اول بود؛ با این تفاوت که در تزریق دوم، به‌جای BCG، از آنتی‌ژن A۶۰ استفاده شد. تزریق سوم نیز ۴۵-۳۰ روز پس از تزریق دوم انجام گردید که در این‌جا میزان آنتی‌ژن تزریقی به هر موش، فقط ۲-۱ میکروگرم بود و از هیچ نوع ادجوانتی نیز استفاده نشد، بلکه آنتی‌ژن A۶۰ مستقیماً به همراه PBS به داخل صفاق موش تزریق شد. حجم تزریقی، همانند قبل، ۰/۲ میلی‌لیتر به ازای هر موش بود. تزریق درون وریدی، ۳ تا ۵ روز قبل از فیوژن (fusion) انجام شد. در تزریق درون وریدی به موش، ۴ تا ۵ میکروگرم آنتی‌ژن در بافر PBS توسط سرنگ انسولین و از طریق ورید دم تزریق شد. حجم محلول تزریقی ۰/۱ میلی‌لیتر بود. یکی از موش‌ها که بهترین پاسخ را به آنتی‌ژن داده بود، کشته شد و سلول‌های طحال آن با نسبت ۳ به ۱ تا ۱۰ به ۱ با سلول‌های میلومای Sp2/0 ادغام شدند. بعد از فیوژن، سلول‌ها در محیط انتخابی HAT قرار داده و در چاهک‌های متعددی تقسیم شدند. بررسی مایع رویی سلول‌های هیبریدوما با استفاده از تکنیک ELISA صورت گرفت. سپس آزمون رقت‌های نهایی (limiting dilution) انجام گرفت (به‌طوری که در هر چاهک، یک سلول هیبریدوما قرار گیرد) و مجدداً آزمون ELISA انجام شد. در روش ELISA ابتدا آنتی‌ژن A۶۰ با غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌متر در بافر PBS تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول به هر یک از چاهک‌های پلیت الایزا افزوده شد و مدت یک شب در یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) یا ۲ ساعت در دمای ۳۷

Archive of SID
www.SID.ir

درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. با محلول ۰/۰۵ درصد PBS- Tween (۰/۵ میلی‌لیتر محلول Tween به یک لیتر بافر PBS اضافه شد) سه تا چهار بار عمل شستشو انجام شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی هیبریدوماها به چاهک‌های مذکور، بجز دو چاهک آخر، اضافه گردید (به یکی از دو چاهک آخر سرم موش ایمونیزه شده با آنتی‌ژن A۶۰ و به دیگری مایع رویی سلول‌های میلومای Sp2/0 اضافه گردید) و یک ساعت و نیم در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. شستشوی پلیت با محلول ۰/۰۵ درصد PBS-Tween سه تا چهار بار انجام شد. به تمام چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از کانژوگه ضد آنتی‌بادی موش، تهیه شده در بز (HRP Conjugated–goat anti mouse Ig) با رقت ۱:۴۰۰۰ اضافه و یک ساعت و نیم در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. شستشوی پلیت با محلول ۰/۰۵ درصد PBS-Tween سه مرتبه انجام شد. به تمام چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای تازه تهیه شده TMB اضافه و در دمای اتاق و تاریکی به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه انکوبه شد. واکنش با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر سود ۳ نرمال یا اسید کلریدریک ۱ نرمال متوقف گردید و جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد.

نتایج

نتایج حاصل از آزمون ELISA بر روی هیبریدوماها در جدول ۱ آورده شده است.

کلون‌های MB_1D_5 و MB_3F_8 که دارای جذب بسیار بالا بودند، انتخاب شده، بر روی آن‌ها آزمون رقت‌های نهایی انجام شد که نتایج آن در جدول ۲ و جدول ۳ آمده است.

جدول ۱ نتایج آزمون الایزای مایع رویی کلون‌های هیبریدومایی حاصل از فیوژن

نمونه	جذب	نمونه	جذب	نمونه	جذب
MB_1C_2	0.18	MB_2F_7	0.27	MB_3C_7	0.13
MB_1C_3	0.12	MB_2C_8	0.14	MB_3E_7	0.32
MB_1E_3	0.26	MB_2D_8	0.12	MB_3F_8(+)	1.46
MB_1D_4	0.18	MB_2E_8	0.1	MB_3G_8	0.12
MB_1D_5(+)	1.51	MB_2C_9	0.15	MB_3B_9	0.18
MB_1G_5	0.35	MB_2F_9	0.27	MB_3C_{10}	0.24
MB_1C_6	0.21	MB_2G_9	0.14	MB_3B_{11}	0.21
MB_1G_2	0.31	MB_2C_{10}	0.19	MB_3C_{11}	0.19
MB_1D_7	0.19	MB_2E_{10}	0.21	MB_3F_{11}	0.27
MB_1F_7	0.19	MB_2C_{11}	0.3		
MB_1C_8	0.28	MB_2F_{11}	0.31		
MB_1B_9	0.26	MB_2G_{11}	0.22	کنترل منفی(سوپ کشت سلول‌های	0.09
MB_1E_9	0.11	MB_3C_2	0.18		
MB_1G_9	0.19	MB_3D_2	0.2	میلومای(Sp2/0)	
MB_1D_{10}	0.17	MB_3E_2	0.11		
MB_1C_{11}	0.31	MB_3G_2	0.28		
MB_1E_{11}	0.3	MB_3B_3	0.18		
MB_1F_{11}	0.21	MB_3F_3	0.12		
MB_1G_{11}	0.13	MB_3F_4	0.15	کنترل مثبت (سرم موش ایمونیزه شده با	
MB_2D_2	0.22	MB_3G_4	0.23		
MB_2E_2	0.13	MB_3B_5	0.14	آنتی‌ژن A۶۰ با رقت ۱/۱۰۰۰)	1.5
MB_2B_3	0.26	MB_3C_5	0.16		
MB_2C_3	0.33	MB_3F_5	0.11		
MB_2E_3	0.36	MB_3G_5	0.09		
MB_2C_4	0.17	MB_3B_6	0.22		
MB_2D_7	0.17	MB_3D_6	0.3		

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲ نتایج آزمون الایزا بر روی ساب کلون‌های MB_1D_5 پس از آزمون رقت نهایی

نمونه	جذب	نمونه	جذب
$MB_1D_5A_5$	1.51	$MB_1D_5F_1$	1.49
$MB_1D_5F_3$	1.5	$MB_1D_5A_4$	1.52
$MB_1D_5G_4$	1.48	$MB_1D_5E_7$	1.51
$MB_1D_5C_7$	1.56	کنترل منفی (سوپ کشت سلول‌های میلومای Sp2/0)	0.08
$MB_1D_5F_8$	1.49		
$MB_1D_5C_9$	1.53	کنترل مثبت(سرم موش ایمونیزه شده با آنتی‌ژن A۶۰ با رقت ۱/۱۰۰۰)	1.41
$MB_1D_5H_{12}$	1.48		

جدول ۳ نتایج آزمون الایزا بر روی ساب کلون‌های MB_3F_8 پس از آزمون رقت نهایی

نمونه	جذب	نمونه	جذب
$MB_3F_8G_6$	1.44	$MB_3F_8D_5$	1.48
$MB_3F_8G_3$	1.49	$MB_3F_8D_{11}$	1.51
$MB_3F_8F_6$	1.48	$MB_3F_8E_7$	1.52
$MB_3F_8C_5$	1.45	$MB_3F_8G_9$	1.47
$MB_3F_8C_8$	1.45	$MB_3F_8A_{12}$	1.46
$MB_3F_8H_1$	1.48	کنترل منفی(سوپ کشت سلول‌های میلومای Sp2/0)	0.1
$MB_3F_8B_4$	1.46		
$MB_3F_8F_9$	1.44	کنترل مثبت(سرم موش ایمونیزه‌شده با آنتی‌ژن A۶۰ با رقت ۱/۱۰۰۰)	1.51
$MB_3F_8A_1$	1.45		

نتایج حاصل از آزمون ELISA بر روی مایع رویی ساب کلون‌های MB_1D_5 و MB_3F_8 نشان داد که این کلون‌ها از ابتدا به‌صورت تک کلون بوده‌اند، زیرا تمامی ساب کلون‌ها دارای جذب بالا در آزمون ELISA بودند.

بحث

آنتی‌ژن A۶۰ کمپلکس اصلی ایمونوژنیک‌مایکوباکتریوم بویس BCG است که سبب آغاز واکنش‌های ایمنی سلولی و هومورال می‌شود؛ مضافاً این‌که در مقابل عفونت‌های محیطی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سبب محافظت می‌شود [۳و۸]. آنتی‌ژن A۶۰ دارای کاربردهای متعددی است که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

– در کیت تشخیصی سریع بر مبنای الایزا، برای تشخیص سریع بیماری سل [۹و۱۰].

– به‌عنوان ساب یونیت جدید واکسن جایگزین واکسن BCG [۱۱و۱۲].

– در شیمی‌درمانی برخی از انواع سرطان [۷و۱۳].

آنتی‌ژن A۶۰ سبب ایمنی علیه بیماری سل می‌شود، بدین‌ترتیب که باعث تحریک لنفوسیت‌های افراد مبتلا به بیماری سل به ترشح میزان بالای IL-2 INF-γ می‌گردد [۳،۴،۹،۱۳،۱۴و۱۵].

از جمله عوامل مهم در تولید آنتی‌بادی منوکلونال ایمونیزاسیون است. عوامل متعددی بر میزان ایمونیزاسیون تأثیر می‌گذارند که از آن جمله می‌توان به سن، جنس و سوش حیوان اشاره کرد [۱۶].

برای ایمونیزه کردن حیوان آزمایشگاهی با آنتی‌ژن‌های محلول، حضور ادجوانت بسیار مهم است و

Archive of SID
www.SID.ir

به همین علت در این تحقیق در تزریقات اول و دوم از ادجوانت استفاده شد. در تزریق اول و دوم ادجوانت ناقص به‌کار رفت، زیرا آنتی‌ژن A۶۰ بسیار ایمونوژن است و نیازی به استفاده از ادجوانت کامل برای تحریک بیش‌تر سیستم ایمنی نیست [۱۴].

در مورد آنتی‌ژن‌های نامحلول، استفاده از ادجوانت ضروری به‌نظر نمی‌رسد؛ زیرا آنتی‌ژن‌های محلول به سرعت حذف شده، از دسترس سیستم ایمنی بدن دور می‌شوند و اگر هم بتوانند دستگاه ایمنی بدن را تحریک کنند فعالیت حاصل، پایدار نیست و دوام چندانی ندارد. لذا همزمان با تجزیه و حذف آنتی‌ژن، پاسخ ایمنی مربوط نیز دچار زوال خواهد شد. به همین علت، قالبی که بتواند همانند یک چهار دیواری محکم، آنتی‌ژن محلول را دربر گیرد و ذره ذره آن را در معرض سیستم ایمنی قرار دهد، در پایدارسازی پاسخ ایمنی علیه آنتی‌ژن، نقش مؤثری خواهد داشت[۱۶]. به‌علاوه، اغلب ادجوانت‌ها، موجب تجمع سلول‌های دستگاه ایمنی در محل شده، میزان پاسخ را افزایش می‌دهند. اما در مورد آنتی‌ژن‌های غیرمحلول، وضعیت فرق می‌کند و امکان موفقیت بدون استفاده از ادجوانت نیز وجود دارد. در مجموع در مسیر تولید آنتی‌بادی منوکلونال، روش ایمن‌سازی حیوان، متنوع‌ترین مرحله است [۵،۱۶و۱۷].

پیشنهادها

محققین متعددی علیه آنتی‌ژن A۶۰ آنتی‌بادی منوکلونال تهیه کرده‌اند؛ اما چون این آنتی‌ژن در بین گونه‌های مایکوباکتریوم مشترک است و تنها ۷/۸ درصد از اپی‌توپ‌های آن ویژه گونه‌ای (species specific) هستند، اکثر آنتی‌بادی‌های منوکلونال تولید شده دارای واکنش متقاطع بین گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم هستند [۳،۱۰و۱۲]. پس در تهیه آنتی‌بادی منوکلونال علیه آنتی‌ژن A۶۰ ابتدا باید اپی‌توپ‌های ویژه گونه‌ای به‌خوبی شناسایی شوند تا آنتی‌بادی منوکلونال تولید شده علیه این آنتی‌ژن با سایر گونه‌های مایکوباکتریوم واکنش متقاطع نداشته باشند. پس اگر بتوان آنتی‌بادی منوکلونال علیه اپی‌توپ‌های ویژه آنتی‌ژن A۶۰ از منشأ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تهیه کرد، می‌توان این آنتی‌بادی منوکلونال را در طراحی کیت تشخیصی، برای تشخیص سریع بیماری سل به‌کار برد. روش‌های تشخیص سل، مثل کشت میکروبی به زمان زیادی نیاز دارند و یا روش‌های PCR از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نیستند. با تهیه آنتی‌بادی منوکلونال علیه آنتی‌ژن A۶۰ می‌توان یک کیت تشخیصی ELISA-based برای تشخیص سریع بیماری سل طراحی کرد.

منابع

۱. ابوالحسنی، محسن (مؤلف)، راهنمای علمی تهیه منوکلونال آنتی‌بادی. تهران، انتشارات بال گستر، ۱۳۷۶.

2. Damiani G, Biano A, Beltrame A. Generation and characterization of monoclonal antibodies to 28-, 35-, 65-Killodalton proteins of *Mycobacterium Tuberculosis*. Infect and Immun 1988: 56:1281-1287.

3. Harboe M, Closs O, Bjorvantn B, Bjune G. Antibodies against BCG antigen A60 mycobacterial infection. Brit Med J 1997: 2:430-433.

4. Coetsier C, Baelden MC, Coene M, Cocito C. Immunological analysis of the component of the antigen complex A60 of *Mycobacterium Bovis BCG*. Clin And Diag Lab Immunol 1994: 1:139-144.

5. Gilot P, Coene M. Thermostable macromolecular antigens from mycobacteria. Can J Microbiol 1994: 40:605-611.

6. Cocito C, Bealden MC, Benoit C. Mycobacterium proliferation in macrophage is prevented by incubation with lymphocyte activated in vitro a mycobacterial antigen complex. Eur J immunol 1995: 41:53-64.

7. Cocito C, Bealden MC, Benoit C. Alteration of immune response during cancer development and preventation by administration of a Mycobacterial antigen. Scand J Immunol 1995: 41:53-64.

8. Brodeur BR. High yeild monoclonal antibody production in ascites. J Immunol Meth 1986: 86: 239-241.

9. Freund YR, Blair PB. Depression of natural killer activity and mitogen responsiveness in mice treated with pristine. J Immunol 1982: 129: 2826-2830.

10. Maes H, Roland F. A60-antigen from mycobacteria and use thereof as Tuberculin and as vaccine. U.S.P. 187919.

Archive of SID

www.SID.ir

11. **Cocito C, Vanliden F. immunological properties of A60 of BCG induction of humeral and cellular immune reaction. Scand J Immunol 1987: 25:579-585.**

12. **Cocito C, Vanliden F. Comparison between *Bacillus Calmete-Guerin* and A60 mycobacterium antigen complx used as cancer preventive immunotherapies. J Can Res Clin Oncol 1996: 122:296-300.**

13. **Cocito C, Vanliden F. Delayed hypersensivity reaction between the Mycobacterial antigen A60 and cutaneous testing in tuberculosis. Med Microbiol Immunol 1989: 178:105-112.**

14. **Hubbard RD, Flory CM, Collins FM. Immunization of mice with antigen A60 of *Mycobacterium Bovis BCG*. Clin Exp Immunol 1982: 88:129-131.**

15. **Cocito C, Bealden MC, Benoit C. Immunological properties of A60 of BCG induction of humeral and cellular reaction. Scand J Immunol 1987: 25:579-585.**

16. **Freedman A, Marti J, Riska P, and *et al*. Monoclonal antibodies to surface antigens of *Mycobacterium Tuberculosis* and use in modified enzyme- linked immunosorbent spot assay for detection of mycobacteria. J Clin Microbiol 1996: 34:2795-2802.**

17. **Minden P, Kelleher P, Freed J, and *et al*. Immunological evaluation of a component isolated from *Mycobacterium Bovis BCG* with a monoclonal antibody to *Mycobacterium Bovis BCG*. Infect and Immun 1984: 46:519-525.**

Archive of SID

www.SID.ir