Archive of SID

مجله دنیای میکروب ها
سال دوم، شماره یک، ۱۳۸۸
صفحات ۱۱ـ ۷

Original Article

جداسازی آنتی ژن کپسولی باکتری سالمونلا تایفی *Ty2* و تست حیوانی آن به منظور تهیه واکسن

دکتر مجید مقبلی*[۱]، دکتر علی اکبر شعبانی[۲]، الهه اکبری فر[۳]

[۱]گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، [۲] گروه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی سمنان،

[۳]کارشناس ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

چکیده

سابقه وهدف: بیماری تیفوئید یا حصبه گسترش جهانی دارد و شایع ترین عامل آن سالمونلا تایفی می باشد. ایجاد سویه های مقاوم به آنتی‌بیوتیک ها درمان را پیچیده کرده و این بیماری را به عنوان یک تهدید برای اپیدمی های آینده مطرح نموده است. واکسیناسیون یکی از راهبردهای اساسی مقابله با این بیماری محسوب می شود. هدف از این پژوهش جداسازی آنتی ژن کپسولی (Vi) باکتری سالمونلا تایفی، و ارزیابی ایمنی زایی آن در مدل حیوانی می باشد.

مواد وروش ها: در این مطالعه پس از کشت سویه سالمونلا تایفی *Ty2* در محیط مولرهینتون آگار، سوسپانسیون سلولی در سرم فیزیولوژی تهیه و کپسول پلی ساکاریدی توسط رسوب گیری باحلال آلی ستاولون استخراج گردید. میزان اسید نوکلئیک موجود در نمونه با کدورت سنجی در طول موج 260 nm و میزان پروتئین با روش SDS-PAGE و برادفورد بررسی گردید. سپس از روش ایمونودیفیوژن برای بررسی صحت آنتی ژن Vi جدا شده استفاده شد. درنهایت ایمنی زایی آنتی ژن Vi بر روی موش بررسی گردید.

یافته ها: میزان اسید نوکلئیک و پروتئین در نمونه جدا شده به ترتیب ۰/۰۸ µg/ml و ۲/۵۹ µg بود. در SDS-PAGE، باند حاصل از نمونه جدا شده کاملاً مشابه با استاندارد بود. ایجاد خط رسوبی درایمونودیفیوژن وجود آنتی ژن Viرا تأیید کرد. در بررسی آنتی ژن Vi جدا شده بر روی موش، ۸۰٪ مصونیت ایجاد شد. همچنین تزریق به خرگوش نشان داد که میزان لیپوپلی ساکارید (LPS) موجود در نمونه در حد ایجاد تب نیست.

نتیجه گیری: با توجه به اینکه واکسن انسانی حصبه درحال حاضردر ایران تولید نمی شود، از این روش می توان به منظور جدا سازی آنتی‌ژن Vi استفاده نمود و آن را به عنوان یک کاندید واکسن انسانی معرفی کرد.

واژگان کلیدی: سالمونلا تایفی *Ty2* ، آنتی ژن Vi، واکسن

دریافت مقاله: پاییز ۸۷ پذیرش برای چاپ: زمستان ۸۷

مقدمه

تب روده (تیفوئید) بیماری سیستمیکی است که در اثر سالمونلا تایفی ایجاد می شود. تخمین زده می شود که سالیانه ۱۶ میلیون مورد جدید بیماری با ۶۰۰ هزار مورد مرگ ناشی از آن در سطح جهان رخ می‌دهد (۱ و ۲). در قرن نوزدهم حصبه به عنوان عامل مهم مرگ و میر و بیماری در مناطق شهری پر جمعیت و غیر بهداشتی آمریکا و اروپا قلمداد می شد. تهیه و تدارک سیستم های آب و فاضلاب منجر به کاهش این بیماری در مناطق مذکور گردید. امروزه این بیماری در کشورهای در حال توسعه که از وضعیت بهداشتی مطلوبی برخوردار نیستند همچنان به عنوان نوعی بیماری شایع مطرح است (۳). متاسفانه بلافاصله پس از کشف کلرامفنیکل در سال ۱۹۸۴ سویه های مقاوم سالمونلا تایفی از مناطق مختلف دنیا گزارش گردید (۴). واکسیناسیون همچنان به عنوان ابزار ضروری جهت مدیریت مؤثر این بیماری باقی مانده است. در سال ۱۹۸۹ از توانایی این باکتری در تولید لایه

*) آدرس برای مکاتبه: دامغان: جاده چشمه علی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دانشکده علوم پایه تلفاکس: ۰۲۱-۲۲۴۵۳۷۴۷
پست الکترونیک: moghbeli552@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

پلی‌ساکاریدی در خارج دیواره سلولی آنتی ژن (Vi) جهت ساخت واکسن غیر خوراکی استفاده شد (۵). از نظر فیزیکی آنتی ژن پلی‌ساکاریدی Viمانع اتصال آنتی بادی ها به آنتی ژن O می‌شود، از طرف دیگر باکتری را در برابر فاگوسیتوز و لیز سلولی با واسطه کمپلمان محافظت می کند. بدین ترتیب آنتی‌ژن Vi، اجازه می‌دهد سالمونلا تایفی در خون باقی مانده و منجر به سپتی سمی شود. تاکنون محققان تلاش های زیادی را در زمینه خالص سازی آنتی ژن Vi انجام داده اند و خواص بیوشیمیایی و بیولوژیکی آن را شرح داده اند. امّا تناقض های مهمی به ویژه در مورد شیمی آنتی‌ژن وجود دارد. بطور کلی این اختلاف ها ممکن است به تفاوت در محصول خالص شده و ایجاد تغییر شیمیایی در حین خالص کردن آنتی ژن نسبت داده شود (۵).

هدف از این پژوهش ابداع روشی به منظور جداسازی آنتی‌ژن Vi می‌باشد که بدون نیاز به مواد و تجهیزات گران قیمت و تیمار شیمیایی شدید با حداقل امکانات توانایی ایجاد بیشترین ایمنی‌زایی را در موش داشته باشد.

مواد و روش ها

الف) کشت باکتری وتست‌های تأییدی: باکتری سالمونلا تایفی *Ty2* بصورت هدیه از آقای دکتر تبرایی از انستیتو پاستور ایران دریافت شد. ویال لیوفیلیزه شده باکتری پس از احیا شدن به محیط BHI منتقل و۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد. سپس یک کلنی خالص باکتری به محیط های بلاد آگار، سالمونلا ـ شیگلا آگار، مک کانکی آگار و ائوزین متیلن بلو آگار (EMB) منتقل و ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شد. جهت مطالعه شکل باکتری در زیر میکروسکوپ از روش رنگ آمیزی گرم و جهت مطالعه کپسول در باکتری از روش آنتونی استفاده شد. تشخیص نهایی سالمونلا تایفی بر اساس تستهای بیوشیمیایی ارائه شده در کتاب Bergey's Manual Systematic Bacteriology انجام شد.

ب) جداسازی آنتی ژن*Vi*: یک‌کلونی تک از باکتری سالمونلا تایفی *Ty2* بر روی محیط مولر هینتون آگارکشت داده و پس از ۲۴ ساعت گرما گذاری در ۳۷ درجه سانتیگراد، باکتری های رشد کرده روی پلیت ها را جمع آوری و در ۴ میلی لیتر سالین استریل به ازای هر پلیت سوسپانسیون گردید. سوسپانسیون حاصله در انکوباتور شیکر دار در ۳۵ درجه سانتیگراد با دور ۱۸۰rpm به مدت یک ساعت قرار داده شد. در مرحله بعد سوسپانسیون شیکر شده به مدّت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شده، محلول شفاف رویی جمع آوری و به آرامی ستاولون ۲٪ به میزان نهایی ۰/۱٪ اضافه گردید .محلول‌کدر حاصله در ۱۳۰۰۰rpm به مدّت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس به رسوب حاصل از آن در یک میلی‌لیترکلریدکلسیم یک مولار اضافه و نمونه ها روی یخ قرار داده شد. در مرحله بعد ۵۰۰ میکرولیتر الکل خالص سرد به آن اضافه و ۱۵ دقیقه در فریزر۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید. سپس نمونه ها ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و پس از جداسازی محلول رویی، رسوب در دمای آزمایشگاه خشک شد. رسوب خشک شده (پلی ساکارید Vi) در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر حل گردید. با اضافه کردن ۵ میکرولیتر (۵۰۰RNase میکروگرم در میلی لیتر) ۵ میکرولیتر DNase (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) و پروتئیناز K با غلظت ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر در مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه به ترتیب RNA، DNA و پروتئین باقیمانده حذف شد. سپس میزان جذب نمونه ها با کدورت سنج در طول موج های ۲۶۰ نانومتر تعیین شد.

ج) بررسی مقدار پروتئین: جهت بررسی میزان پروتئین از روش Bradford استفاده شد (۶).

د) ارزیابی وزن مولکولی آنتی ژن *Vi*: برای ارزیابی آنتی ژن کپسولی از روش SDS-PAGE استفاده شد. برای این منظور از ژل پلی آکریل آمید ۱۵٪ به روش ناپیوسته مطابق روش های استاندارد استفاده شد (۷).

ه) تأیید *Vi* خالص شده با استفاده از روش ایمونودیفیوژن: ابتدا ۲۰ میلی لیتر آگاروز ۱٪ تهیه و داخل پلیت منتقل گردید و پس از سفت شدن، سه چاهک در آن ایجاد شد. در چاهک وسطی آنتی بادی پلی‌کلونال ضد Vi و در چاهک های دیگر آب مقطر و آنتی ژن بدست آمده از رسوب‌گیری با ستاولون ریخته شد و ۴۸ ساعت در یخچال قرار داده شد.

و) بررسی ایمنی زایی: برای بررسی میزان ایمنی زایی، آنتی ژن Viجدا شده به درون صفاق موش تزریق گردید. بدین منظور از بین موش های سوری نر سفید، ۴۰ موش دارای محدوده وزنی ۲۰-۲۵ گرم، برای گروه آزمایش و ۱۰ موش برای گروه شاهد انتخاب گردید. سپس ۸۰۰ میکرولیتر آنتی ژن Vi را با ۸ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل رقیق کرده و ۰/۲ میلی لیتر به درون صفاق هر موش گروه آزمایش تزریق گردید. به هر موش گروه شاهد فقط ۰/۲ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل تزریق شد. ۱۴ روز پس از اولین تزریق، دوباره ۰/۲ میلی لیتر از آنتی ژن رقیق شده به داخل صفاق

www.SID.ir

Archive of SID

هر موش گروه آزمایش، (به عنوان بوستر)، تزریق شد. در روز هفدهم تعداد 10^9 عدد از باکتری سالمونلا تیفی *Ty2* به حجم ۰/۲ میلی لیتر به‌صورت درون صفاقی به هر موش (گروه شاهد و گروه آزمایش) تزریق گردید و مدت ۱۵ روز تمام موش‌ها مورد بررسی قرار گرفتند.

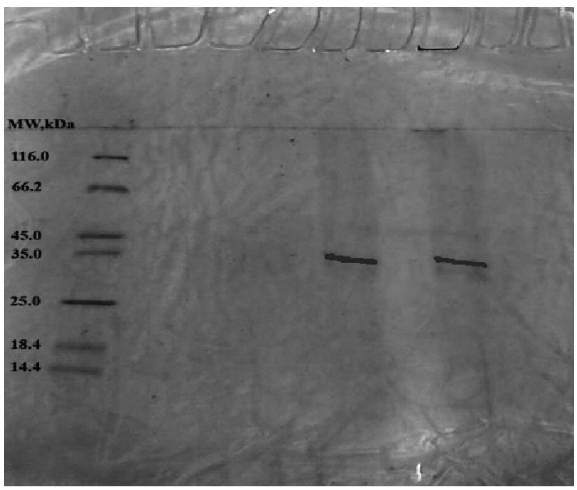
ز) بررسی میزان *LPS*: به منظور تعیین وجود یا عدم وجود LPS واکنش تب زایی در خرگوش مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب که ۲ میلی لیتر آنتی ژن Vi رقیق شده به خرگوش نر ۱/۵ کیلوگرمی که از دو روز قبل برای سازگار شدن با محیط در شرایط آزمایشگاه نگهداری شده بود به صورت داخل وریدی تزریق گردید. از نیم ساعت قبل از تزریق تا ۲ ساعت پس از تزریق هر نیم ساعت یک‌بار دمای بدن خرگوش از طریق رکتوم اندازه گیری شد.

نتایج

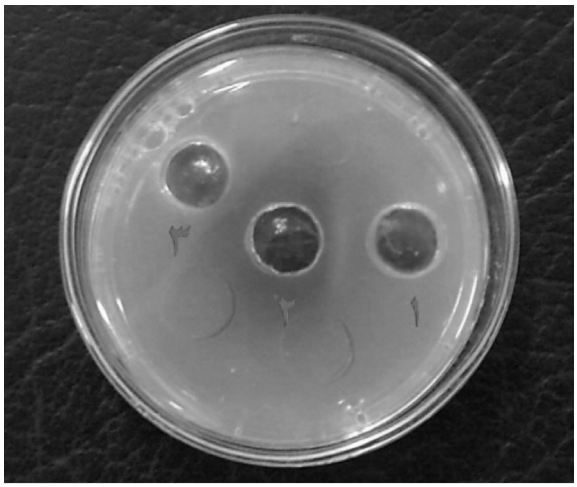
کلنی های باکتری سالمونلا تایفی احیا شده در روی محیط سالمونلا ـ شیگلا آگار بی رنگ بود و در مرکز کلنی ها نقطه سیاه رنگی دیده شد. در محیط بلاد آگار کلنی ها مرطوب و دارای ۳-۲ میلی‌متر قطر بودند. همچنین در EMB و مک کانکی، کلنی های شفاف و بی رنگ مشاهده شدند. باکتری در زیر میکروسکوپ نوری بصورت باسیل های گرم منفی تک دیده شد. با انجام رنگ‌آمیزی کپسول، وجود کپسول به صورت هاله شفاف در اطراف باکتری و بنفش رنگ در یک زمینه تیره مورد تأیید قرار گرفت. همچنین ویژگی‌های بیوشیمیایی باکتری کشت داده شده نیز مطابق با جداول تعیین هویت کتاب برگی بود.

کپسول پلی ساکاریدی سالمونلا تایفی *Ty2* با حلال آلی ستاولون استخراج شد و پس از حذف پروتئین و اسید نوکلئیک باقیمانده به‌وسیله آنزیم های پروتئیناز، DNase و RNase، میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتراندازه‌گیری شد. با توجه به اینکه هر واحد جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر برابر با ۵۰ µg/ml اسید نوکلئیک است، لذا جذب ۰/۰۱۶ نشان می دهد که ۰/۰۸ میکروگرم اسید نوکلئیک در هر میلی لیتر از نمونه موجود می باشد که این میزان اسید نوکلئیک درنمونه مورد استفاده جهت تزریق بعد از رقیق سازی تقریبا صفر می شود. طبق روش برادفورد، در طول موج ۵۹۵ نانومتر میزان جذب نمونه را ۰/۰۱ قرائت گردید. از روی فرمول بدست آمده در منحنی استاندارد، ۲/۵۹ میکروگرم پروتئین در نمونه شناسایی شد، که این میزان پروتئین بعد از رقیق سازی کاهش یافته و مشکلی ایجاد نمی کند. درالکتروفورز روی ژل پلی آکریل آمید ۱۵٪ به روش ناپیوسته (SDS-PAGE) باند حاصله از نمونه تست کاملا مشابه با اسمیر Vi استاندارد (که در کیت تست ویدال استفاده می شود و مخلوط با رنگ می باشد) بود. پس می توان نتیجه گیری کرد که در نمونه تست آنتی ژن پلی ساکاریدی Vi وجود دارد (شکل ۱).

وجود خط رسوبی بین چاهک وسط (حاوی آنتی بادی پلی‌کلونال ضد Vi) و چاهک دارای آنتی‌ژن در روش ایمونودیفیوژن، در اثر واکنش نمونه با آنتی بادی پلی کلونال ضد Vi بود و در نتیجه تایید کننده نمونه جدا شده می باشد (شکل۲). در مرحله بعد به دنبال تزریق باکتری سالمونلا تایفی *Ty2* در روز هفدهم به هر دو گروه شاهد و آزمایش در کمتر از ۲۴ ساعت تمامی



شکل۱: SDS-PAGE آنتی ژن جدا شده و نمونه استاندارد. چاهک دوم (سایز مارکر)، چاهک ششم (نمونه تست)، چاهک هشتم Vi(ـ استاندارد).



شکل ۲: ژل ایمونودیفیوژن: حفره (۱) نمونه تست، حفره (۲) آنتی بادی پلی کلونال ضد Vi، حفره، (۳) آب مقطر.

www.SID.ir

Archive of SID

موش‌های گروه شاهد از بین رفتند و از بین موش‌های گروه آزمایش ۸ موش مردند و ۳۲ موش زنده ماندند. بدین ترتیب می‌توان نتیجه‌گیری نمود که با این روش می توان تا ۸۰٪ ایمنی‌زایی ایجاد کرد. پس از تزریق درون وریدی آنتی ژن Vi به خرگوش در نیم ساعت اول و دوم پس از تزریق، دمای بدن خرگوش به ۳۹/۴ درجه سانتیگراد و در نیم ساعت سوم و چهارم به ۳۹/۷ درجه سانتیگراد رسید. با توجه به اینکه قبل از تزریق دمای بدن خرگوش ۳۸/۹ درجه بود و در فاصله زمانی دو ساعت پس از تزریق، دمای بدن خرگوش کمتر از یک درجه افزایش داشت، می‌توان به این نتیجه رسید که روش مورد استفاده در این پژوهش برای خالص سازی آنتی ژن Vi سالمونلا تایفی $Ty2$ فاقد خاصیت تب زایی و یا فاقد میزان مورد نیاز برای تب زایی می باشد.

بحث

از نظر شیمیایی آنتی ژن Viهومو پلی ساکارید خطی است که از واحدهای N ــ استیل ــ D ــ گالاکتوز آمینورونیک اسید تشکیل شده است (۵). تاکنون روش های گوناگونی به منظور جداسازی آنتی ژن Vi سالمونلا تایفی‌توسط محققین مورد پژوهش قرار گرفته است. آنتی ژن Viبدست آمده در این روش ها از لحاظ خواص فیزیکوشیمیایی و ایمونولوژیکی با هم متفاوتند. این تفاوت ها به ایجاد تغییر شیمیایی در طبیعت آنتی ژن طی مراحل خالص سازی نسبت داده می شود. Webster و همکاران در سال ۱۹۵۲ جداسازی آنتی ژن Viرا با اتانول در حضور کلرید سدیم با استفاده از هیدرولیز با اسیداستیک انجام دادند که آنتی ژن Vi بسیار خالص با مقادیر نسبتاً بالا حاصل شد. امّا چون نیاز به استفاده از اسید استیک داغ جهت هیدرولیز داشت، آنتی ژن Vi دپلیمریزه شده و مصونیت زایی آن تحت تأثیر قرار می گرفت (۸). Baker و همکاران در ۱۹۵۹، استخراج را با استفاده از سالین ــ اتانول در دماهای مختلف انجام دادند (۹). Jarvis و همکاران در ۱۹۶۰، از روش تیمار و هیدرولیز در اسید استیک گرم یک مولار استفاده کردند و روش الکتروفورز را جهت تخلیص آنتی ژن Vi بکار بردند که آنتی ژن Vi بدست آمده در این روش نسبت به روش Webster از ایمنی زایی بیشتری در موش برخوردار بود (۱۰). Wong و همکاران در سال ۱۹۷۴ از سلول‌های سالمونلا تایفی $Ty2$ خشک شده در استون استفاده کرده و آنتی ژن Vi را توسط رسوب دادن با ستاولون جدا کردند (۱۱). Talor و همکاران در سال ۱۹۸۰ برای خالص سازی مرحله افزودن اسید را حذف کرده و از کروماتوگرافی روی دی اتیل آمینو اتیل جهت خالص سازی آنتی ژن Vi استفاده کردند(۱۲). Tesheva و همکاران در سال ۲۰۰۲، آنتی ژن Viرا با سه روش رسوبگیری با ستاولون، خالص سازی با کروماتوگرافی و رسوبگیری سه گانه با ستاولون جدا نمودند (۱۳). Chibber و همکاران در سال ۲۰۰۴، تخلیص را با استفاده از تهیه seed culture و رسوبگیری با ستاولون و اتانول انجام دادند (۱۴).

ما در این پژوهش با انجام برخی از تغییرات و حذف مرحله seed culture از روش Chibber استفاده کردیم. از طرفی در این روش نیاز به تیمار شیمیایی شدید به نحوی که فعالیت مصونیت زایی آنتی ژن را تحت تأثیر قرار دهد و نیاز به استفاده از دورهای بالای سانتریفوژ نمی باشد. باند حاصل از الکتروفورز پلی آکریل آمید ۱۵٪ آنتی ژن Vi تخلیص شده و باند ایجاد شده در روش ایمونودیفیوژن در ژل آگاروز ۱٪ دقیقاً مشابه با نتایج بدست آمده توسط Shousun و همکاران (۱۴) بود. در نهایت، آنتی ژن تخلیص شده در موش، ۸۰٪ مصونیت ایجاد کرد و این در حالی است که طبق آمار سازمان بهداشت جهانی (WHO) کارایی واکسن حاوی پلی ساکارید Vi، ۷۲ تا ۷۷ درصد تخمین زده شده است (۱۵). همچنین Audrey و Shousun هم گزارش نموده اند که واکسن‌های دارای Vi، ایمنی بر علیه حصبه را با کارایی حدود ۷۰٪ ایجاد می کنند (۱۵). آنتی ژن جدا شده با این روش، در خرگوش تب‌زایی نداشت و این نتیجه با بررسی که Talor و همکاران در ۱۹۹۴ روی آنتی ژن پلی ساکاریدی Vi انجام دادند، مطابقت دارد. همچنین افزایش دمای بدن هم مربوط به تب نبود و از نوع حرارت افزایشی یا هایپر ترمیا می‌باشد.

نتیجه گیری

جداسازی آنتی ژن با روش مورد بررسی در این پژوهش از خلوص و مصونیت‌زایی بالایی برخوردار است و از طرف دیگر با حداقل امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی قابل جداسازی می‌باشد. بنابراین استفاده از آن در مراکز پژوهشی مانند انستیتو پاستور ایران و انستیتو رازی به منظور تهیه واکسن انسانی برعلیه سالمونلا پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از جناب آقای دکتر تبرایی به دلیل در اختیار قراردادن سویه استاندارد میکروبی کمال امتنان را دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Guzman,CA, Borsutzky, S, Griot-Wenk, M, Metcalfe, I C, Pearman, J, Collioud, A, Favre, D & Dietrich, G,vaccine against typhoid fever, Vaccine, 2006, 24(18), 3804-3811
2. Parry, CM, Tinh Hien, T, Dougan, G, White,NJ & Farrar, Typhoid Fever, N Engl J Med, 2002, 347(22), 1770-1782
3. Sarman,Singh, Typhoid fever Pathogenesis and Laboratory Diagnosis, Jornal Indian Academy Of Clinical Medicine, 2001;2(1):17-20.
4. Hessel, L, Debois, H, Fletcher, M & Dumas, R, Experience With *Salmonella typhi* Vi Capsular Polysaccharide Vaccine, Eur J Microbiol Infect Dis, 1999, 18(9), 609-20
5. Wong, K H & Feeley, J C, Isolation of Vi Antigen and a Simple Method for Its Measurement, Appl Microbiol, 1972, 24(4), 628-633
6. Rehm H.J., and Reed G., 1993, Biotechnology V. 7b, VHS, pp. 179-184
7. Sambrook J., Russell D., 2001, Molecular cloning, a laboratory manual 3th edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press
8. Baker, E E,Whitesides, R E, Basch, R & Derow, M A, The Vi antigens of the Enterobacteriace. Purification and chemical properties, J.Immunol, 1959, 83:680-686
9. Jarvis, G, Mesenko, M T & Kyle J E, Electrophoretic purification of the Vi antigen, J Bacteriol, 1960, 80(5), 677-682.
10. Wong,K H, Feeley, J C, Northrup, R S & Forlines, M E, Vi Antigen from Salmonella typhosa and Immunity Against Typhoid Fever I. Isolation and Immunologic Properties in Animals, Infect Immun, 1974, 9(2), 348-353
11. Szewczyk B. and Taylor A., Immunochemical properties of Vi antigen from *Salmonella typhi Ty*2: Presence of two antigenic determinants, Journal Infect Immun, 1980;29(2)
12. Tesheva, A M, Aparin P G, L'vov, V L, Isolation of a highly purified capsular polysaccharide from *Salmonella enterica serovar typhi (Salmonella typhi)* and its use in serological diagnostics of typhoid fever, Bioorganicheskaya Khimiya, 2002;28(1):67-68.
13. Chibber, S & Bhardwaj, S B, Protection in a mouse peritonitis model mediated by iron-regulated outer-membrane protein of *Salmonella typhi* coupled to its Vi antigen, J Med Microbiol, 2004;53:705-709.
14. Shousun, CZ, Audery, L, Stone,JD, Robbins, RS & Robbins, JS, Vi Capsular Polysaccharide-Protein Conjugation for Prevention of Typhoid Fever.Preparation, Characterization, and Immunogenicity inLaboratory Animals, Journal of Experimental Medicine, 1987;166:1510-1524
15. Szu, SC, Taylor, DN, Trofa, AC, Clements, JD, Shiloach, J, Sadoff, JC, Bryla, DA & Robbins JB, Laboratory and preliminary clinical characterization of Vi capsular polysaccharide-protein conjugate vaccine, Infect Immun, 1994;62(10):4440-4444.

www.SID.ir