



## جداسازی آنتی ژن کپسولی باکتری سالمونلا تایفی Ty2

### و تست حیوانی آن به منظور تهیه واکسن

دکتر مجید مقبلی<sup>۱\*</sup>، دکتر علی اکبر شعبانی<sup>۲</sup>، الهه اکبری فر<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، <sup>۲</sup> گروه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی سمنان،

<sup>۳</sup> 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 آنتی بیوتیک 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 مولر هینتون 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. در نهایت 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 Vi را 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 حاضر در ایران تولید نمی شود، از این روش می توان به منظور جدا سازی آنتی ژن 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

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). متأسفانه 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

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 می دهد (۱ و ۲). در قرن نوزدهم حصبه به عنوان عامل مهم مرگ و میر و بیماری در مناطق شهری پر جمعیت و غیر

\* آدرس برای مکاتبه: دامغان: جاده چشمه علی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دانشکده علوم پایه تلفاکس: ۰۲۱-۲۴۵۳۷۴۷-۲۱- moghbeli552@gmail.com پست الکترونیک:

شده به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شده، محلول شفاف رویی جمع آوری و به آرامی ستاولون ۲٪ به میزان نهایی ۰/۱٪ اضافه گردید. محلول کدر حاصله در ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس به رسوب حاصل از آن در یک میلی لیتر کلرید کلسیم 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 فریزر ۲۰- 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 (RNase ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) و 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 پلی کلونال ضد Vi و در چاهک های دیگر آب مقطر و آنتی ژن بدست آمده از رسوب گیری با ستاولون ریخته شد و ۴۸ ساعت در یخچال قرار داده شد.

و) بررسی ایمنی زایی: برای بررسی میزان ایمنی زایی، آنتی ژن Vi جدا شده به درون صفاق موش تزریق گردید. بدین منظور از بین موش های سوری نر سفید، ۴۰ موش دارای محدوده وزنی ۲۵-۲۰ 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

پلی ساکاریدی در خارج دیواره سلولی آنتی ژن (Vi) جهت ساخت واکسن غیر خوراکی استفاده شد (۵). از نظر فیزیکی آنتی ژن پلی ساکاریدی Vi مانع اتصال آنتی بادی ها به آنتی ژن O می شود، از طرف دیگر باکتری را در برابر فاگوسیتوز و لیز سلولی با واسطه کمپلمان محافظت می کند. بدین ترتیب آنتی ژن Vi، اجازه می دهد 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. اما تناقض های مهمی به ویژه در مورد شیمی آنتی ژن 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 آنتی ژن Vi می باشد که بدون نیاز به مواد و تجهیزات گران قیمت و تیمار شیمیایی شدید با حداقل امکانات توانایی ایجاد بیشترین ایمنی زایی را در موش داشته باشد.

## مواد و روش ها

الف) کشت باکتری و تست های تأییدی: باکتری سالمونلا تایفی Ty2 بصورت هدیه از آقای دکتر تیرایی از انستیتو پاستور ایران دریافت شد. ویال لیوفیلیزه شده باکتری پس از احیا شدن به محیط BHI منتقل و ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد. سپس یک کلنی خالص باکتری به محیط های بلاد آگار، سالمونلا-شیکلا 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 تست های بیوشیمیایی ارائه شده در کتاب Bergey's Manual Systematic Bacteriology انجام شد.

ب) جداسازی آنتی ژن Vi: یک کلونی تک از باکتری سالمونلا تایفی Ty2 بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت 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 rpm ۱۸۰ به مدت یک ساعت قرار داده شد. در مرحله بعد سوسپانسیون شیکر

کپسول پلی ساکاریدی سالمونلا تایفی Ty2 با حلال آلی ستاولون استخراج شد و پس از حذف پروتئین و اسید نوکلئیک باقیمانده به وسیله آنزیم های پروتئیناز، DNase و RNase، میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری 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 در نمونه مورد استفاده جهت تزریق بعد از رقیق سازی تقریباً صفر می شود. طبق روش برادفورد، در طول موج ۵۹۵ نانومتر میزان جذب نمونه را ۰/۰۱۱ 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. در الکتروفورز روی ژل پلی آکریل آمید ۱۵٪ به روش ناپیوسته (SDS-PAGE) باند حاصله از نمونه تست کاملاً 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 پلی کلونال ضد Vi) و چاهک دارای آنتی ژن 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 (شکل ۲). 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

هر موش گروه آزمایش، (به عنوان بوستر)، تزریق شد. در روز هفدهم تعداد ۱۰<sup>۹</sup> عدد از باکتری سالمونلا تیفی Ty2 به حجم ۰/۲ میلی لیتر به صورت درون صفاقی به هر موش (گروه شاهد و گروه آزمایش) تزریق گردید و مدت ۱۵ روز تمام موش ها مورد بررسی قرار گرفتند.

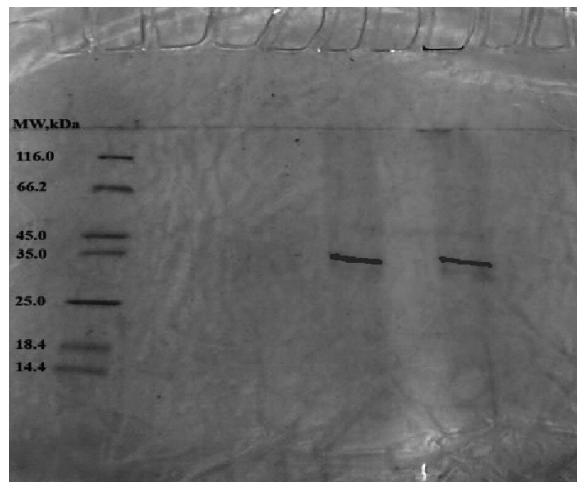
(ز) بررسی میزان LPS: به منظور تعیین وجود یا عدم وجود LPS واکنش تب زایی در خرگوش مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب که ۲ میلی لیتر آنتی ژن Vi رقیق شده به خرگوش نر ۱/۵ کیلوگرمی که از دو روز قبل برای سازگار شدن با محیط در شرایط آزمایشگاه نگهداری شده بود به صورت داخل وریدی تزریق گردید. از نیم ساعت قبل از تزریق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

## نتایج

کلنی های باکتری سالمونلا تایفی احیا شده در روی محیط سالمونلا-شیگلا آگار بی رنگ بود و در مرکز کلنی ها نقطه سیاه رنگی دیده شد. در محیط بلاد آگار کلنی ها مرطوب و دارای ۲-۳ میلی متر 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 رنگ آمیزی کپسول، وجود کپسول به صورت هاله شفاف در اطراف باکتری و بنفش رنگ در یک زمینه تیره مورد تأیید قرار گرفت. همچنین ویژگی های بیوشیمیایی باکتری کشت داده شده نیز مطابق با جداول تعیین هویت کتاب برگی بود.



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



شکل ۱: SDS-PAGE آنتی ژن جدا شده و نمونه استاندارد. چاهک دوم (سایز مارکر)، چاهک ششم (نمونه تست)، چاهک هشتم (Vi - استاندارد).

از کروماتوگرافی روی دی اتیل آمینو اتیل جهت خالص سازی آنتی ژن Vi استفاده کردند (۱۲). Tesheva و همکاران در سال ۲۰۰۲، آنتی ژن Vi را 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 مصنوعیت زایی آنتی ژن را تحت تأثیر قرار دهد و نیاز به استفاده از دوره‌های بالای سانتیفریژ 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٪ مصنوعیت 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 حصه 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 می باشد.

### نتیجه گیری

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

### تشکر و قدردانی

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

موش‌های گروه شاهد از بین رفتند و از بین موش‌های گروه آزمایش ۸ موش مردند و ۳۲ موش زنده ماندند. بدین ترتیب می توان 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، می توان به این نتیجه رسید که روش مورد استفاده در این پژوهش برای خالص سازی آنتی ژن Vi سالمونلا تایفی Ty2 فاقد خاصیت تب‌زایی و یا فاقد میزان مورد نیاز برای تب‌زایی می باشد.

### بحث

از نظر شیمیایی آنتی ژن Vi هومو پلی ساکارید خطی است که از واحدهای N-استیل-D-گالاکتوز آمینورونیک اسید تشکیل شده است (۵). تاکنون روش‌های گوناگونی به منظور جداسازی آنتی ژن Vi سالمونلا تایفی توسط محققین مورد پژوهش قرار گرفته است. آنتی ژن Vi بدست آمده در این روش‌ها از لحاظ خواص فیزیکی شیمیایی و ایمونولوژیکی با هم متفاوتند. این تفاوت‌ها 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 Vi را 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. اما چون نیاز به استفاده از اسید استیک داغ جهت هیدرولیز داشت، آنتی ژن Vi دیپلمریزه شده و مصنوعیت زایی آن تحت تأثیر قرار می گرفت (۸). Baker و همکاران در ۱۹۵۹، استخراج را با استفاده از سالین - اتانول در دماهای مختلف انجام دادند (۹). Jarvis و همکاران در ۱۹۶۰، از روش تیمار با 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

## 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* Ty2: 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 in Laboratory 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.



## Isolation of Vi antigen from *Salmonella Typhi Ty2* and its animal test for preparation of vaccine

Majid Moghbeli<sup>1</sup>, Ali Akbar Shaebani<sup>2</sup>, Elaheh AkbariFar<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Islamic Azad university, Damghan Branch, Damghan, Iran

<sup>2</sup>Department of Microbiology School of Public Health Semnan University, Semnan, Iran

<sup>3</sup>Department of Microbiology, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran

### Abstract

**Background and objective:** Typhoid is a worldwide disease. *Salmonella Typhi* is the most common agent causing typhoid. It is difficult to treat typhoid due to antibiotics multiple resistance and the bacterium is menace for future epidemic. Vaccination is the most successful method against this diseases. The aim of this study is the isolation of Vi antigen from *Salmonella Typhi Ty2* and evaluation of its immunogenicity in animal model.

**Material and methods:** In this research, *Salmonella Typhi Ty2* was cultured in Muller Hinton Agar Medium. After harvesting the cells and their suspension into physiologic serum, polysaccharide capsule was extracted by precipitation with cetavlon. Amount of Nucleic acid in the sample was tested with Spectrophotometere at 260 nm and amount of protein were investigated with Bradford method and SDS-PAGE and the Immunodiffusion method was used to study of isolated Vi antigen. In final, immunogenesity of Vi antigen was tested in mouse.

**Result:** Amount of Nucleic acid and protein in the isolated sample were 0.08 µg/ml and 2.59µg respectively. In the SDS-PAGE, smear band of the Standard Vi was similar to isolated sample completely. The precipitation band in the Immunodiffusion method confirmed the presence of Vi antigen. In the study of Vi antigen on the mouse, 80 percent immunity was created. Also injection in Rabbit showed that LPS level in the sample does not cause much fever.

**Conclusion:** With regard to the fact that the human Vaccine of Typhoid is not produced in Iran at present, this method can be used to isolate Vi antigen and this method can be introduced as a vaccine candidate.

**Keywords:** *Salmonella typhi Ty2*, Typhoid, Vi antigen, vaccine

---

Correspondence to: Majid Moghbeli

Tel: (+98)2122453749

Email: moghbeli552@gmail.com

Journal of Microbial World 2009, 2(1), 7-11