

مقایسه الگوی الکتروفور تیک پروتئین های تام و سیتوپلاسمی سویه های سالمونلا انتریکا تحت گونه انتریکا، سروتیپ آبورتوس اویس جدا شده از ایران

دکتر حسن تاج بخش^۱ دکتر حمیدرضا ایوبی^{۲*} دکتر ملیحه پورکبیره عباسعلی^۳ دکتر تقی زهرائی صالحی^۱

دریافت مقاله: ۱۲ اسفند ماه ۱۳۸۱

پذیرش نهایی: ۲۹ شهریور ماه ۱۳۸۲

Comparision of total and cytoplasmic protein pattern in *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar *abortusovis* strains isolated from Iran

Tadzbakhsh, H.,¹ Ayubi, H.R.,² Pourkabire-Abbasali, M.,³ Zahraie Salehi, T.¹

¹Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran. ²Department of Biology, Faculty of Sciences, Razi university of Kermanshah, Kermanshah - Iran.

³Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.

objectives: The comparison of total and cytoplasmic protein patterns between *Salmonella abortusovis* strains isolated from Iran.

Design: Electrophoretic study of protiens.

Samples: *Salmonella abortusovis* strains isolated from Iran.

Procedure: Total proteins were prepared by sonication with a microprobe. Cytoplasmic proteins were percipitated by the addition of 3 volumes of acetone. Total and cytoplasmic extracted proteins were analysed by SDS-PAGE and silver staining.

Results: The results showed that there were considerable differences between total protein profile of *S. abortusovis* strains. The cytoplasmic protein patterns were similar among the strains.

Conclusion: The protein profile differences and number of protein bands are showed in figure and tables. Infact this variations indicating a certain genotypic distance between bacterial strains that isolated from different geographical area of Iran and may be useful for describing the epidemiology or at least genetic relatedness of *Salmonella abortusovis* wild types. *J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran*. 59, 2: 147-151, 2004.

Key words: *Salmonella abortusovis*, Cytoplasmic protein, Total protein, SDS-PAGE, Silver staining.

Corresponding author email:htaj@ut.ac.ir

ورامین، کرج، استان خراسان و اصفهان از نظر آلودگی در رده اول اهمیت قرار دارند (۱،۳،۱۸). پس از سقط می توان این باکتری را تا چندین هفته از ترشحات واژینال گوسفند جدا کرد. تاج بخش در سال ۱۹۷۵ نشان داد که سالمونلا آبورتوس اویس بیش از پنج ماه در خاک زنده می ماند و توان بیماریزایی خود را حفظ می کند (۱۹،۲۲). کنترل بیماری در مناطق آندمیک مبتنی بر واکسیناسیون می باشد (۱۲). تاج بخش در سال ۱۹۸۰ واکسن غیر فعال شده ای را تهیه نمود و ایمنی زائی آن را در میش مورد بررسی قرار دارد (۲۰،۲۱). با توجه به آندمیک بودن بیماری در این مناطق و خسارت های وارده به صنعت پرورش گوسفند، انجام مطالعات مولکولی روی سوش های جدا شده از ایران امری ضروری به نظر می رسد. لذا از روش SDS-PAGE

هدف: مطالعه الگوی پروتئین های تام و سیتوپلاسمی در سوش های سالمونلا آبورتوس اویس جدا شده از ایران و بررسی تفاوت های الگوی پروتئینی آنها.

طرح: مطالعه الکتروفور تیک پروتئین در باکتری.

نمونه ها: سویه های باکتری سالمونلا آبورتوس اویس جدا شده از ایران.

روش: جهت استخراج پروتئین تام از روش سونیکه کردن استفاده شد. پروتئین های سیتوپلاسمی با استفاده از استن رسوب داده شد. جهت مشاهده این پروتئین ها از روش SDS-PAGE در شرایط احیایی و غیر احیایی و رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده شد.

نتایج: الگوی پروتئین تام در سویه های مختلف سالمونلا آبورتوس اویس تفاوت های قابل ملاحظه ای را نشان داد. البته الگوی پروتئین های سیتوپلاسمی در سویه های مختلف در شرایط احیایی و غیر احیایی مشابه بود.

نتیجه گیری: با توجه به یکسان بودن شرایط رشد باکتری، تفاوت های موجود در الگوی پروتئین تام نشان دهنده وجود یکسری اختلافات ژنوتیپی در این سویه ها می باشد. این تفاوت ها به عنوان یک شاخص جهت بررسی های اپیدمیولوژی مولکولی قابل ارزیابی هستند. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۳) دوره ۵۹، شماره ۲، ۱۵۱-۱۴۷.

واژه های کلیدی: سالمونلا آبورتوس اویس، پروتئین تام، پروتئین سیتوپلاسمی، SDS-PAGE، رنگ آمیزی نیترات نقره.

جنس سالمونلا متعلق به خانواده انتروباکتریاسه و دارای بیش از ۲۵۰۰ سروتیپ با میزبان های اختصاصی مختلف می باشد. سالمونلا انتریکا، تحت گونه انتریکا و سروتیپ آبورتوس اویس با فرمول آنتی ژنی O: 4.12 [۲۷]C: 1.6 متعلق به گروه سرمی B می باشد (۴). این سروتیپ فوق العاده به گوسفند عادت یافته است و در نواحی آندمیک در ۳۰ تا ۵۰ درصد میش های یک گله ممکن است سقط ایجاد نماید (۱۰،۱۱،۱۳).

سقط جنین معمولاً در طی آبستنی اول اتفاق می افتد و در آبستنی های بعدی به علت ایجاد ایمنی، کمتر رخ می دهد (۵،۱۵). این باکتری عمدتاً در گوسفند بیماریزا بوده و باعث خسارت اقتصادی فراوان در صنعت پرورش گوسفند می گردد. این سروتیپ عمدتاً در اروپا و خاورمیانه اشاعه دارد و عمدتاً در دو ماهه آخر آبستنی باعث سقط جنین می گردد (۱۷). بعضی از میش ها پس از سقط تلف می شوند و بره های زنده متولد شده نیز می میرند و گاهی نیز این بره ها به عوارض مختلفی از قبیل پنومونی، لنگش و اسهال مبتلا می گردند (تاج بخش: گزارش های منتشر نشده). گوسفندان آبستنی که در ۱۶ هفتهگی یا بعد از آن آلوده شوند معمولاً جنین های سالم به دنیا می آورند. بیماری ناشی از این باکتری تقریباً در تمام نقاط ایران وجود دارد.

(۱) گروه آموزشی میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی تهران، تهران-ایران.

(۲) گروه آموزشی بیولوژی دانشکده علوم دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه-ایران.

(۳) گروه آموزشی علوم پایه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران.

(* نویسنده مسؤل htaj@ut.ac.ir



و رنگ آمیزی نیترات نقره جهت بررسی و مقایسه الگوی پروتئین های تام و سیتوپلاسمی استخراج شده از باکتری استفاده گردید.

مواد و روش کار

الف- سوبه های باکتری: سوبه های مورد استفاده در این مطالعه، طی یک دوره سی ساله از نواحی اندمیک در ایران و از واگیرهای مختلف جدا گردیده و به صورت لیوفیلیزه نگهداری شده اند (۱۸). تعداد این نمونه ها ۳۰ سوش بود که طی سالهای ۱۳۷۹-۱۳۴۹ از موارد سقط میش از شهرهای ورامین، کرج، استان خراسان، اصفهان، رشت، دماوند جدا شده بود و تحت عنوان SAO ۱ تا SAO ۳۰ نامگذاری شدند که در جدول زیر آمده است.

نام سوبه	محل جداسازی
SAO۱-SA0۳	ورامین
SAO۴-SA0۱۲	کرج
SAO۱۳-SA0۲۴	استان خراسان
SAO۲۵-SA0۲۸	اصفهان
SAO۲۹-SA0۳۰	دماوند

۱- استخراج پروتئین تام: ابتدا یک پرگنه از باکتری سالمونلا آبورتوس /ویس از محیط کشت لوریا آگار در ۲۵ میلی لیتر از محیط کشت لوریا براس کشت داده شد و به مدت یک شب در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد (روی شیکر) نگهداری شد. سپس سوسپانسیون باکتری مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. رسوب حاصله در ۳ میلی لیتر از بافری مرکب از تریس (۵۰ میلی مولار، pH=7.5)، EDTA (Etylen diamine tetra acetate) ۰/۵ میلی مولار) و تریتون ۱۰۰-X (یک درصد) به صورت سوسپانسیون درآمده و تا زمان سونیکه کردن روی یخ قرار داده شد و با دستگاه سونیکاتور (مدل 3.75MK2، ساخت شرکت MSE فرانسه) با شدت 30 PPM به مدت ۳۰ ثانیه سونیکه شد. البته قبل از سونیکه کردن از فنیل متان سولفونیل فلوراید (یک میلی مولار) جهت مهار کردن سرین پروتئینازها استفاده شد. سپس نمونه به ظرف یخ منتقل گردید و با دور ۲۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. محلول رویی را جدا نموده و بافر نمونه هم حجم که شامل ۳ درصد سدیم دو دسیل سولفات (SDS)، ۵ درصد بتامرکاپتوانال، ۱۰ درصد گلیسرول ۰/۰۰۵، درصد برم فنل بلو ۶ درصد، تریس بازی (pH = 7/3) بود مخلوط نموده و پس از جوشاندن به مدت ۵ دقیقه، مقدار ۳۰ میکرولیتر از آنها روی ژل ۱۲/۵ درصد پلی آکریلامید به مدت ۳ ساعت در شدت جریان ثابت ۳۰ میلی آمپر، الکتروفورز گردید. سپس ژل به روش نیترات نقره (۸) رنگ آمیزی شد.

۲- جداسازی پروتئین های سیتوپلاسمی: رسوب حاصله از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط LB [جذب نوری ۲ (OD = ۲) در ۶۰۰ نانومتر] در ۳ میلی لیتر با فرسونیکشن (تریس ۱۰ میلی مولار، pH=۸، ۵ MgCl₂ میلی مولار) به صورت تعلیق درآورده و به مدت یک دقیقه سونیکه شد.

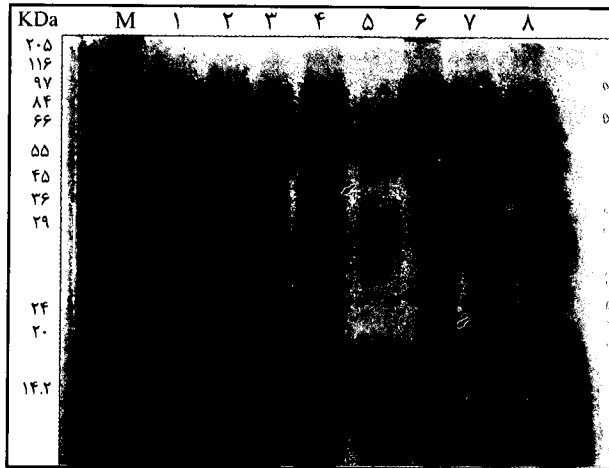
نتایج

پروتئین های تام و سیتوپلاسمی در شرایط احیایی و غیراحیایی به روش الکتروفورز (SDS-PAGE) بررسی شدند. نتایج حاصله در تصاویر ۱ و ۳ (پروتئین تام) و تصویر ۲ (پروتئین های سیتوپلاسمی) مشخص می باشند. چنانچه در تصویر ۱ مشاهده می شود پروتئین های باکتری تحت شرایط احیایی (با استفاده از ۲- مرکاپتوانال) استخراج شده است. در این نمونه ها تعداد ۲۳-۳۳ باند مشاهده می شود (جدول ۱ مربوط به تصویر ۱).

با توجه به اینکه این سوبه های باکتریایی از محل های جغرافیایی مختلف جدا شده اند، لذا تفاوت هایی در تعداد باندهای پروتئینی مشاهده می گردد (جدول ۱ الی ۳). ضمناً در برخی سوبه ها باندهایی مشاهده می شود که اختصاص به همان سوبه دارد. در تصویر ۱ (ستون ۱: سوبه جدا شده از کرج) دو باند ۱۵ و ۵۰ کیلودالتنی مشاهده می گردد که در هیچ یک از سوبه ها دیده نشد. در ستون ۲ (سوبه جدا شده از قاسم آباد) دو باند ۳۲ و ۴۳ کیلودالتنی اختصاصی مشاهده گردید. در ستون ۳ و ۴ (سوبه های جدا شده از مشهد) دو باند ۲۳ و ۱۱۷ کیلودالتنی دیده شد که در سایر سوبه ها وجود نداشت. در ستون ۵ (سوبه مربوط به چناران) دو باند ۴۸ و ۵۳ کیلودالتنی اختصاصی مشاهده گردید. در سوبه جدا شده از ورامین (ستون ۶) یک باند ۱۳۶ کیلودالتنی مشاهده گردید. در سوبه جدا شده از دماوند (ستون ۷) دو باند اختصاصی ۳۰ و ۴۵ کیلودالتنی مشاهده شد. در سوبه جدا شده از اصفهان (ستون ۸) یک باند اختصاصی با وزن کمتر از ۱۴ کیلو دالتن مشاهده گردید.

در ستونهای شماره ۵ و ۶ (تصویر ۳) یک باند با وزن کمتر از ۲۹ کیلو دالتن مشاهده می گردد که به این سوبه اختصاص دارد. ضمناً همان طوری که در تصویر مشاهده می گردد باند پروتئینی ۲۹ کیلو دالتنی در تمام سوبه ها بیان نشده است. در ستون شماره ۸ نیز یک باند ۲۶ کیلو دالتنی اختصاصی مشاهده می گردد.

تفاوت های اصلی موجود در الگوی پروتئینی سوبه های مختلف با پیکان روی تصاویر مربوطه نمایش داده شده است. لازم به ذکر است که علاوه بر تفاوت در تعداد باندها، مشاهده می گردد که برخی از باندهای پروتئینی فقط در بعضی سوبه ها بیان شده است.

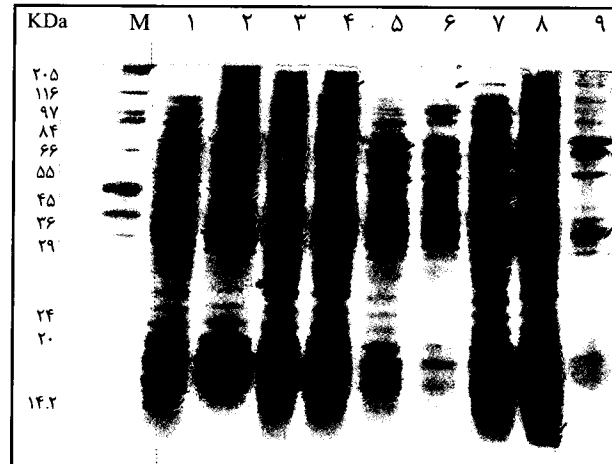


تصویر ۲- تفکیک اجزای پروتئین سیتوپلاسمی (شرایط احیایی) سویه های سالمونلا آبورتنوس / اویس به روش SDS-PAGE رنگ آمیزی با نیترات نقره.
ستون M: مارکر وزن مولکولی (کیلو دالتن) ستونهای ۱-۸ به ترتیب شامل سویه های جدا شده از دماوند، ورامین، چناران، مشهد، اصفهان، سویه استاندارد انگلیس، ورامین، مشهد.

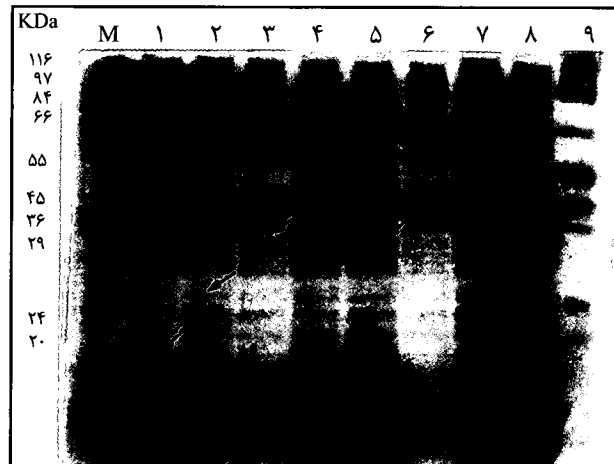
پروتئین های تام در برگیرنده پروتئین غشایی، سیتوپلاسمی و پری پلاسمی هستند، یکی از علل تنوع پروتئین های تام در سویه های مختلف سالمونلا آبورتنوس / اویس می تواند مربوط به پروتئین های فضای پری پلاسمی باشد. با توجه به تفاوت های مشاهده شده در الگوی پروتئین تام سویه های سالمونلا آبورتنوس / اویس، با مقایسه الگوی پروتئینی مربوط به سویه های جدید عامل سقط جنین در یک منطقه، می توان از نحوه انتشار و منشأ آلودگی آگاهی یافت و آنرا جهت بررسی های اپیدمیولوژی مولکولی به کار گرفت.

سالمونلا آبورتنوس / اویس بعد از ایجاد سقط در یک گله، از طریق جنین سقط شده و ترشحات در مرتع پراکنده می شود. مشاهده شده است که پس از عفونت تجربی، ترشح طولانی و متناوب جرم در ترشحات واژن و مدفوع وجود دارد. به طوری که تا چندین ماه بعد از عفونت، سالمونلا از روده کوچک، رحم و عقده های لنفاوی مزانتریک گوسفند جدا می شود (۲۳، ۲۴). تاج بخش نشان داد که این باکتری قادر است به صورت خاموش در خاک زنده بماند و مجدداً ایجاد آلودگی و سقط نماید (۱۹). با توجه به جا به جایی میسر در مراتع، ردیابی نحوه انتشار باکتری در داخل مناطق جغرافیایی مشکل می باشد ولی با مطالعه ساختار پروتئینی باکتری می توان به اپیدمیولوژی مولکولی باکتری پی برد. همان طور که در این مطالعه مشاهده می گردد، سویه های جدا شده از نواحی جغرافیایی خاص دارای اختلاف قابل ملاحظه ای در تعداد باندهای پروتئین تام هستند و با توجه به یکسان بودن شرایط کشت باکتری، این تفاوت ها نشان دهنده اختلافات ژنوتیپی در این سوش ها می باشد، بنابراین با استفاده از الگوی پروتئین تام می توان تا حدودی سویه های سالمونلا آبورتنوس / اویس ایجاد کننده سقط در واگیرهای مختلف را تشخیص و ردیابی نمود.

در این تحقیق مشاهده گردید که پروتئین های سیتوپلاسمی اکثراً در محدوده وزن مولکولی ۱۴ الی ۸۰ کیلو دالتن قرار دارند (تصویر ۲) در صورتی که پروتئین های تام طیف وسیعتری را بخود اختصاص داده و در محدوده



تصویر ۱- تفکیک اجزای پروتئین تام (شرایط احیایی) سویه های سالمونلا آبورتنوس / اویس به روش SDS-PAGE رنگ آمیزی با نیترات نقره.
ستون M: مارکر وزن مولکولی (کیلو دالتن)، ستونهای ۱-۹ به ترتیب شامل سویه های جدا شده از کرج، قاسم آباد، مشهد، چناران، ورامین، دماوند، اصفهان، مشهد.



تصویر ۳- تفکیک اجزای پروتئین تام (شرایط غیر احیایی) به روش SDS-PAGE رنگ آمیزی با نیترات نقره.
ستون M: مارکر وزن مولکولی (کیلو دالتن)، ستونهای ۱-۹ شامل سویه استاندارد انگلیس، سویه های جدا شده از اصفهان، قاسم آباد، چناران، مشهد، ورامین، دماوند، کرج.

بحث

الگوی پروتئین های سیتوپلاسمی اصلی در سویه های مورد مطالعه بسیار یکنواخت بوده و لذا به عنوان یک شاخص اپیدمیولوژیک تلقی نمی گردد (تصویر ۲) ولی تنوع بیشتری در الگوی الکتروفورتیک و تعداد باندهای پروتئینی تام سویه های مختلف (تصویر ۱) مشاهده می گردد. ضمناً باکتری های جدا شده از یک ناحیه دارای باندهای اختصاصی هستند (با پیکان روی تصاویر مشخص شده) که در سایر سویه ها حضور ندارند، بنابراین این تفاوتها به عنوان یک شاخص جهت مطالعات اپیدمیولوژی قابل ارزیابی هستند.

در مطالعات انجام شده توسط Helmuth و همکاران در سال ۱۹۸۵ مشاهده گردید که الگوی پروتئین های غشایی در هفت سروتیپ شایع سالمونلا از تشابه زیادی برخوردار هستند و این دسته از پروتئین ها به عنوان یک ویژگی اپیدمیولوژیک در نظر گرفته نشدند (۷). با توجه به اینکه



جدول ۲- تعداد باندهای سیتوبلاسمی در شرایط احیایی

شماره ستون زل	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸
تعداد باندهای پروتئینی	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۷	۱۷	۱۶

جدول ۱- تعداد باندهای پروتئینی تام در سویه های مختلف (شرایط احیایی)

شماره ستون زل	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹
تعداد باندهای پروتئینی	۳۱	۲۸	۳۰	۳۳	۳۱	۲۸	۳۰	۲۶	۲۳

جدول ۳- تعداد باندهای پروتئینی تام در سویه های مختلف (شرایط غیراحیایی)

شماره ستون زل	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹
تعداد باندهای پروتئینی	۸	۱۵	۱۶	۱۴	۱۵	۱۶	۱۳	۱۶	۱۴

References

۱. تاج بخش، حسن. (۱۳۵۵): بررسی سرولوژیک آلودگی گوسفندان ایران به بروسلوز و سالمونلوز (سالمونلا آبورنوس/ویس)، پژوهنده، شماره ۱۳ علوم پزشکی ۲، انتشارات وزارت فرهنگ و آموزش عالی، صفحه: ۱۱۱۳-۱۰۷.
۲. تاج بخش، ح. و نادعلیان، م. ق. (۱۳۵۷): ایمنی تجربی ناشی از سالمونلا آبورنوس/ویس در گوسفندان، پژوهنده، شماره ۲۳، علوم پزشکی ۵، انتشارات وزارت علوم و آموزش عالی، صفحه: ۲۲۷-۲۱۳.
۳. تاج بخش، ح. و محزونیه، م. ر. (۱۳۷۸): آنتی ژنهای سالمونلا آبورنوس/ویس و رهیایی سرم شناسی برای تشخیص موارد آلودگی با کمک آنتی ژنهای اختصاصی، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۴، شماره ۲، صفحه: ۴۸-۴۳.
۴. زهرایی صالحی، ت. (۱۳۷۸): سالمونلا، انتشارات دانشگاه تهران، شماره ۲۴۲۹، صفحه: ۵۹ و ۱۸۰ - ۱۷۹.
5. Berthon, P., Gohin, I. Lantier, I. and Oliver, M.R. (1994): Humoral immune rsnponse to *Salmonella abortusovis* in sheep invitro induction of an antibody synthesis from either sensitised or unprimed lymph nodes cells. *Vet. Immunol. Immunopatol.* 41: 275-294.
6. Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensetive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding, *Anal. Biochem.* 72: 248- 254.
7. Helmuth, R., Stephan, R., Bunge, C., Hoog, B., stinbeck, A. and Bulling, E.(1985): Epidemiology of virulence associated plasmids and outer membrane protein patterns within seven common *Salmonella* serotypes. *Infec. Immunol.* 48: P: 175-182.
8. Harris, E.L.V. and Angal, A. (1989): Protein purification methods: a practical approach. Oxford university Press. PP: 33-35.
9. Isibasi, A., Ortiz, 70 , Vargas , M. , Paniagua,J., Gonzalez, C., moreno, J. and kumate, J. (1988): Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after Immunization with outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* 9,12, d, vi. *Inf. Imm.* 56: 2953- 2959.
10. Jack, K.J. (1968): *Salmonella abortusovis*: an atypical *Salmonella*. *Vet. Rec.* 82: 1168-1174.
11. pardon, P., Marly, J. and sanchis, R. (1980): Experimental *Salmonella abortusovis* infection in ewes, *Vet. Rec.* 106: 389-390.

۱۴ الی ۱۵۰ کیلو دالتن پراکندگی داشته اند. باندهای سنگینی که در الگوی پروتئین تام رؤیت می شوند اکثراً مربوط به پروتئین های غشایی هستند که توسط تریتون ۱۰۰-X از دیواره باکتری آزاد شده اند (۹،۱۶). الگوی پروتئین تام سویه های سالمونلا آبورنوس/ویس در شرایط غیراحیایی (تصویر ۴) دارای تعداد کمتری باند پروتئینی نسبت به شرایط احیایی می باشد که علت آن تفکیک مناسب پروتئین ها در شرایط احیایی (در حضور ۲- مرکاپتواتانل) است. لازم به ذکر است در شرایط غیراحیایی نیز تفاوتی قابل ملاحظه ای در تنوع باندهای پروتئین تام مشاهده گردید. در این مطالعه جهت استخراج پروتئین تام از روش سونیکش (با استفاده از بافر ذکر شده در مقاله) استفاده گردید. لازم به ذکر است که این روش در مقایسه با سایر روشهای مرسوم مانند جوشاندن (در حضور لیزوزیم) یا استفاده از بافر لیزکننده (۲۰۰ میکرولیتر بافر نمونه حاوی اوره ۳/۵ مولار) از کارایی و وضوح بالاتری برخوردار بود (۱۴).

تشکر و قدردانی

نظر به اینکه این مقاله از طرح تحقیقاتی شماره ۲۱۵/۲/۵۱ استخراج گردیده، نگارندگان بر خود لازم می دانند مراتب تشکر و قدردانی خود را از شورای محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی و معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران بعمل آورند. ضمناً از حسن همکاری و مساعدتهای فراوان، سرکار خانم دکتر پروانه خضرائی نیا ریاست محترم آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی، مراتب تشکر و سپاسگزاری بعمل می آید.



12. pardon, P., sanchis, R., Marly, J., Lantier, F., Guillotiau, L., Buzoni, G. D., Oswald, I. P., Pepin, M., Kaeffer, B., Berthon, P. and Popoff, M.Y. (1990): Experimental oviane salmonellosis (*Salmonella abortusovis*): pathogenesis and vaccination. Res. Microbiol.41: 945-953.
13. pardon, P., Sanchis, R., Marly, J., Lantier, F., Papin, M. and Popoff, M. (1988): Ovine salmonellose due a *Salmonella abortusovis*. Ann. Rech. Vet. 19: 221-235.
14. Roe, S. (2001): Protein purification technique: a practical approach. Oxford University press, 2nd ed. PP: 25, 38, 100, 139-141.
15. Sanchis ,R., Pardon, P. and Abadei, G (1990): Abortion and serological reaction of ewes after conjuntivial instillation of *Salmonella enterica subsp. enterica ser. abortusovis*, Ann. Rech. Vet. 22: 1,59 -64.
16. Sherman, P., Cockerill, F., Sonio, R. and Brunton, J. (1991): Outer membranes are competitive inhibitors of *Escherichia coli* O 157: H7 adherence to epithelial cells, Inf. Immunol. 59: 890-899.
17. Sojka, W.J., wray, C., Shreere, J.E. and Bell, J.C. (1983): The incidence of *Salmonella* infection in sheep in England and wales, 1975-1981. British vet. J. 139: 386- 392.
18. Tadjebakhche, H., Deslins, M. and Hedyazi, M. (1971): Bacteriology of outbreaks of abortion due to *Salmonella abortusovis* in Iran. Revue de medicine Vet. 122: 621-628.
19. Todjebachch, H. and Nazari, A.A. (1974): Resistance of *Salmonella abortusovis* in soil. Revue d'Eleavage et de medicine veterinaire des pays tropicaux. 27:57-59.
20. Tadjebachch, H. and Nadalian, M.G (1980): Immunity induced experimentally in ewes by *Salmonella abortusovis*. Revue de medicine Vet.131: 247-250.
21. Tadjebachche, H. and Touway, G. (1979): Development of antidodies in ewes immunized against *Salmonella abortusovis* with killed vaccines. Revue de med. Vet. 130: 1635- 1648.
22. Timony, J.F. and Cillespie, J.H. (1992): Hagan and Bruners microbiology and infectious disease of domestic animals. 8th ed. Comstock publishing Ass. PP: 74-88.
23. Vodas, K. and Martinov, S. (1987): The epidemic process in yearling ewes experimentally infected with both *Salmonella abortusovis* and *Chlamidia psittaci var.ovis*, Veterinamomedsinki nauki. 24: 28- 33.
24. Zakhriev, T.S. and Kaloyanov, I. (1971): Carriaye of *Salmonella obortasovis* by experimentally infected sheep. V. B. (41): 1609.



