مقایسه الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های تام و سیتوپلاسمی سویه های *سالمونلا انتریکا* تحت گونه *انتریکا*، سروتیپ *آبورتوس اویس* جدا شده از ایران

دکتر حسن تاج بخش[1] دکتر حمیدرضا ایوبی[2]* دکتر ملیحه پورکبیره عباسعلی[3] دکتر تقی زهرائی صالحی[1]

دریافت مقاله: ۱۲ اسفند ماه ۱۳۸۱
پذیرش نهایی: ۲۹ شهریور ماه ۱۳۸۲

هدف: مطالعه الگوی پروتئین‌های تام و سیتوپلاسمی در سوش‌های *سالمونلا آبورتوس‌اویس* جدا شده از ایران و بررسی تفاوتهای الگوی پروتئینی آنها.

طرح: مطالعه الکتروفورتیک پروتئین در باکتری.

نمونه ها: سویه های باکتری *سالمونلا آبورتوس‌اویس* 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 پروتئین‌ها از روش SDS-PAGE در شرایط احیایی و غیر احیایی و رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد.

نتایج: الگوی پروتئین تام در سویه‌های مختلف *سالمونلا آبورتوس‌اویس* تفاوتهای قابل ملاحظه‌ای را نشان داد. البته الگوی پروتئین‌های سیتوپلاسمی در سویه‌های مختلف در شرایط احیایی و غیر احیایی مشابه بود.

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

واژه‌های کلیدی: *سالمونلا آبورتوس‌اویس*، پروتئین تام، پروتئین سیتوپلاسمی، SDS-PAGE، رنگ‌آمیزی نیترات نقره.

جنس *سالمونلا* متعلق به خانواده *انتروباکتریاسه* و دارای بیش از ۲۵۰۰ سروتیپ با میزبانهای اختصاصی مختلف می‌باشد. *سالمونلا انتریکا*، تحت گونه *انتریکا* و سروتیپ *آبورتوس‌اویس* با فرمول آنتی‌ژنی O: 4.12 [۲۷]C:1.6 متعلق به گروه سرمی B می‌باشد (۴). این سروتیپ فوق‌العاده به گوسفند عادت یافته است و در نواحی اندمیک در ۳۰ تا ۵۰ درصد میشهای یک گله ممکن است سقط ایجاد نماید (۱۰،۱۱،۱۳).

سقط جنین معمولاً در طی آبستنی اول اتفاق می‌افتد و در آبستنیهای بعدی به علت ایجاد ایمنی، کمتر رخ می دهد (۵،۱۵). این باکتری عمدتاً در گوسفند بیماریزا بوده و باعث خسارات اقتصادی فراوان در صنعت پرورش گوسفند می‌گردد. این سروتیپ عمدتاً در اروپا و خاورمیانه اشاعه دارد و عمدتاً در دو ماهه آخر آبستنی باعث سقط جنین می‌گردد (۱۷). بعضی از میشها پس از سقط تلف می‌شوند و بره های زنده متولد شده نیز می‌میرند و گاهی نیز این بره‌ها به عوارض مختلفی از قبیل پنومونی، لنگش و اسهال مبتلا می‌گردند (تاج بخش: گزارشهای منتشر نشده). گوسفندان آبستنی که در ۱۶ هفتگی یا بعد از آن آلوده شوند معمولاً جنینهای سالم به دنیا می‌آورند. بیماری ناشی از این باکتری تقریباً در تمام نقاط ایران وجود دارد، ورامین، کرج، استان خراسان و اصفهان از نظر آلودگی در رده اول اهمیت قرار دارند (۱،۳،۱۸). پس از سقط می‌توان این باکتری را تا چندین هفته از ترشحات واژینال گوسفند جدا کرد. تاج‌بخش در سال ۱۹۷۵ نشان داد که *سالمونلا آبورتوس‌اویس* بیش از پنج ماه در خاک زنده می‌ماند و توان بیماریزایی خود را حفظ می‌کند (۱۹،۲۲). کنترل بیماری در مناطق آندمیک مبتنی بر واکسیناسیون می‌باشد (۱۲). تاج‌بخش در سال ۱۹۸۰ واکسن غیر فعال شده‌ای را تهیه نمود و ایمنی‌زائی آن را در میش مورد بررسی قرار داد (۲،۲۰،۲۱). با توجه به اندمیک بودن بیماری در این مناطق و خسارتهای وارده به صنعت پرورش گوسفند، انجام مطالعات مولکولی روی سوش‌های جدا شده از ایران امری ضروری به نظر می‌رسد. لذا از روش SDS-PAGE

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 مسؤول htaj@ut.ac.ir

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

Tadjbakhsh, H.,[1] Ayubi, H.R.,[2] Pourkabire-Abbasali, M.,[3] Zahraie Salehi, T.[1]

[1]*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.* [2]*Department of Bioloy, Faculty of Sciences, Razi university of Kermanshah, Kermanshah - Iran.* [3]*Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.*

objectives: The comparison of total and cytoplamic 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 microbrobe. 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 usful 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

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- سویه‌های باکتری: سویه‌های مورد استفاده در این مطالعه، طی یک دوره سی‌ساله از نواحی اندمیک در ایران و از واگیریهای 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.

محل جداسازی	نام سویه
ورامین	SAO۱-SAO۳
کرج	SAO۴-SAO۱۲
استان خراسان	SAO۱۳-SAO۲۴
اصفهان	SAO۲۵-SAO۲۸
دماوند	SAO۲۹-SAO۳۰

۱- استخراج پروتئین تام: ابتدا یک پرگنه از باکتری *سالمونلا آبورتوس اویس* از محیط کشت لوریا آگار در ۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت لوریا براس کشت داده شد و به مدت یکشب در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد (روی شیکر) نگهداری شد. سپس سوسپانسیون باکتری مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. رسوب حاصله در ۳ میلی‌لیتر از بافری مرکب از تریس (۵۰ میلی مولار pH=7.5)، EDTA (Etylen diamin tetra acetate) ۰/۵ میلی مولار) و تریتون X-۱۰۰ (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 مهارکردن سرین پروتئازها 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 بتامرکاپتواتانل، ۱۰ درصد گلیسرول، ۰/۰۰۵ درصد برم فنل بلو ۶ درصد، تریس بازی (pH = ۷/۳) بود مخلوط نموده و پس از جوشاندن به مدت ۵ دقیقه، مقدار ۳۰ میکرولیتر از آنها روی ژل ۱۲/۵ درصد پلی آ کریلامید به مدت ۳ ساعت در شدت جریان ثابت ۳۰ میلی‌آمپر، الکتروفورز گردید. سپس ژل به روش نیترات نقره (۸) رنگ آمیزی شد.

۲- جداسازی پروتئین‌های سیتوپلاسمی: رسوب حاصله از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط LB [جذب نوری ۲ (۲ = OD) در ۶۰۰ نانومتر] در ۳ میلی لیتر با فرسونیکشن (تریس ۱۰ میلی مولار pH=۸، $Mgcl_2$ ۵ میلی مولار) به صورت تعلیق درآورده و به مدت یک دقیقه سونیکه شد. سوسپانسیون فوق را به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰۰ دور سانتریفوژ نموده تا ذرات درشت باکتری های تخریب نشده رسوب نمایند. سپس محلول رویی را جدا و در ۳ برابر حجم استن مخلوط نموده و حداقل به مدت یکساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد قرار داده شد تا پروتئین‌های محلول سیتوپلاسمی رسوب نمایند (۱۴). این پروتئین ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰۰۰ دور سانتریفوژ شدند. سپس رسوب را خشک و در ۱۰۰ میکرولیتر PBS حل نموده و هم حجم آن بافر نمونه اضافه گردید. جهت اندازه گیری غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد(۶). مقدار پروتئین در هر چاهک معادل ۵ میکروگرم بود.

نتایج

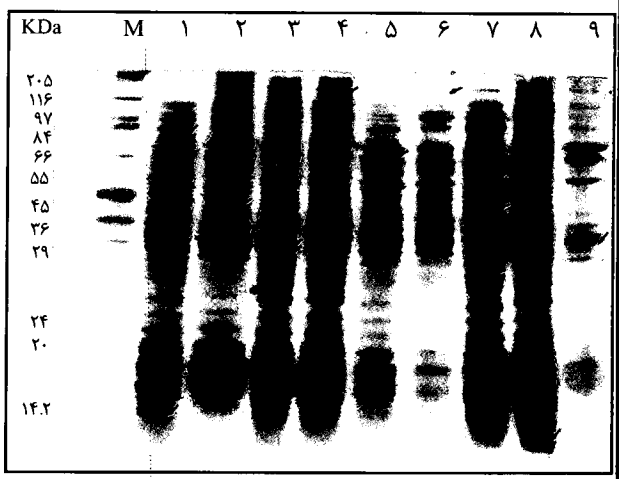
پروتئین های تام و سیتوپلاسمی در شرایط احیایی و غیراحیایی به روش الکتروفورز (SDS-PAGE) بررسی شدند. نتایج حاصله در تصاویر ۱ و ۳ (پروتئین تام) و تصویر ۲ (پروتئین های سیتوپلاسمی) مشخص می باشند.

چنانچه در تصویر ۱ مشاهده می‌شود پروتئین‌های باکتری تحت شرایط احیایی(با استفاده از ۲- مرکاپتواتانل) استخراج شده است. در این نمونه ها تعداد ۳۳-۲۳ باند مشاهده می‌شود (جدول ۱ مربوط به تصویر۱).

با توجه به اینکه این سویه‌های باکتریایی از محلهای جغرافیایی مختلف جدا شده اند، لذا تفاوتهایی در تعداد باندهای پروتئینی مشاهده می گردد (جداول ۱ الی ۳). ضمناً در برخی سویه‌ها باندهایی مشاهده می شود که اختصاص به همان سویه دارد. در تصویر ۱ (ستون ۱: سویه جدا شده از کرج) دوباند ۱۵ و ۵۰ کیلودالتنی مشاهده می گردد که در هیچ یک از سویه ها دیده نشد. در ستون ۲ (سویه جداشده از قاسم آباد) دو باند ۳۲ و ۴۳ کیلودالتنی اختصاصی مشاهده گردید. در ستون ۳ و ۴ (سویه های جدا شده از مشهد) دو باند ۳۳ و ۱۱۷ کیلودالتنی دیده شد که در سایر سویه ها وجود نداشت. در ستون ۵ (سویه مربوط به چناران) دو باند ۴۸ و ۵۳ کیلودالتنی اختصاصی مشاهده گردید. در سویه جداشده از ورامین (ستون ۶) یک باند ۱۳۶ کیلودالتنی مشاهده گردید. در سویه جدا شده از دماوند (ستون ۷) دو باند اختصاصی ۳۰ و ۴۵ کیلودالتنی مشاهده شد. در سویه جدا شده از اصفهان (ستون ۸) یک باند اختصاصی با وزن کمتر از ۱۴ کیلو دالتن مشاهده گردید.

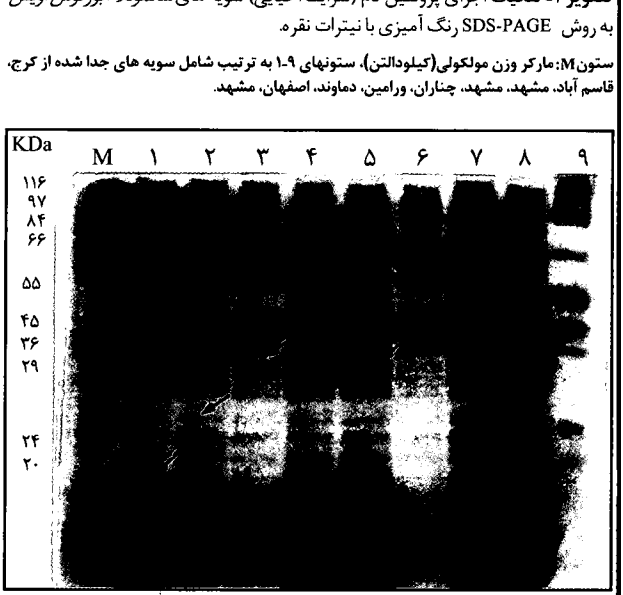
در ستونهای شماره ۵ و ۶ (تصویر۳) یک باند با وزن کمتر از ۲۹ کیلو دالتن مشاهده می گردد که به این سویه اختصاص دارد. ضمناً همان طوری که در تصویر مشاهده می گردد باند پروتئینی ۲۹ کیلو دالتنی در تمام سویه ها بیان نشده است. در ستون شماره ۸ نیز یک باند ۲۶ کیلو دالتنی اختصاصی مشاهده می گردد.

تفاوتهای اصلی موجود در الگوی پروتئینی سویه‌های 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 سویه ها بیان شده است.



تصویر ۱- تفکیک اجزای پروتئین تام (شرایط احیایی) سویه های *سالمونلا آبورتوس اویس* به روش SDS-PAGE رنگ آمیزی با نیترات نقره.

ستون M: مارکر وزن مولکولی(کیلودالتن)، ستونهای ۹-۱ به ترتیب شامل سویه های جدا شده از کرج، قاسم آباد، مشهد، مشهد، چناران، ورامین، دماوند، اصفهان، مشهد.



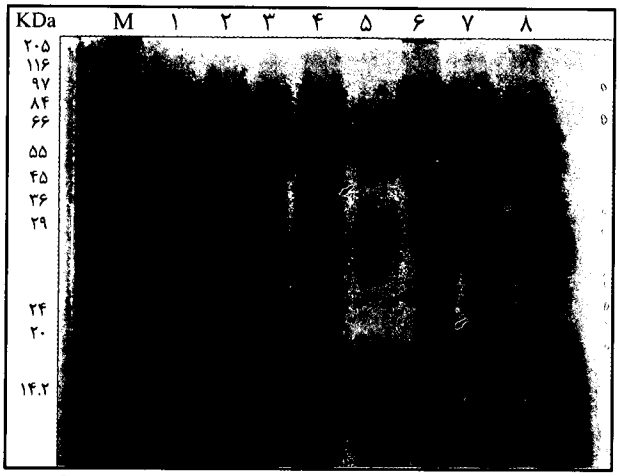
تصویر ۳- تفکیک اجزای پروتئین تام (شرایط غیر احیایی) به روش SDS-PAGE رنگ آمیزی با نیترات نقره.

ستون M: مارکر وزن مولکولی (کیلو دالتن)، ستونهای ۹-۱ شامل سویه استاندارد انگلیس، سویه های جداشده از اصفهان، قاسم آباد، چناران، مشهد، ورامین، دماوند، کرج.

بحث

الگوی پروتئین‌های سیتوپلاسمی اصلی در سویه های مورد مطالعه بسیار یکنواخت بوده و لذا به عنوان یک شاخص اپیدمیولوژیک تلقی نمی‌گردد (تصویر۲) ولی تنوع بیشتری در الگوی الکتروفورتیک و تعداد باندهای پروتئینی تام سویه های مختلف (تصویر۱) مشاهده می‌گردد. ضمناً باکتری‌های 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



تصویر ۲- تفکیک اجزای پروتئین سیتوپلاسمی(شرایط احیایی) سویه های *سالمونلا آبورتوس اویس* به روش SDS- PAGE رنگ آمیزی با نیترات نقره.

ستون M: مارکر وزن مولکولی(کیلو دالتن) ستونهای ۸-۱ به ترتیب شامل سویه های جداشده 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 آبورتوس/اویس* می تواند مربوط به پروتئین های فضای پری پلاسمی باشد.

با توجه به تفاوتهای مشاهده شده در الگوی پروتئین تام سویه های *سالمونلا آبورتوس/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 بررسیهای اپیدمیولوژی مولکولی به کار گرفت.

سالمونلا آبورتوس/اویس بعد از ایجاد سقط در یک گله،از طریق جنین سقط شده و ترشحات در مرتع پراکنده می‌شود. 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 عقده‌های لنفاوی مزانتریک گوسفند جدا می‌شود (۲۳،۲۴). تاج‌بخش 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 میش در مراتع، ردیابی نحوه انتشار باکتری در داخل مناطق جغرافیایی مشکل می‌باشد ولی با مطالعه ساختار پروتئینی باکتری می‌توان به اپیدمیولوژی مولکولی باکتری پی برد. همان طور که در این مطالعه مشاهده می‌گردد، 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 تفاوت‌ها نشان دهنده اختلافات ژنوتیپی در این سوش‌ها می‌باشد، بنابراین با استفاده از الگوی پروتئین تام می‌توان تا حدودی سویه های *سالمونلا آبورتوس/اویس* ایجاد کننده سقط در واگیریهای 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 (تصویر۲) در صورتی که پروتئین های تام طیف وسیعتری را بخود اختصاص داده و در محدوده

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

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

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 آبورتوس/اویس* در شرایط غیراحیایی (تصویر۳) 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 تفاوتهای قابل ملاحظه ای در تنوع باندهای پروتئین تام مشاهده گردید.

در این مطالعه جهت استخراج پروتئین تام از روش سونیکیش (با استفاده از بافر ذکر شده در مقاله) استفاده گردید. لازم به ذکر است که این روش در مقایسه با سایر روشهای مرسوم مانند جوشانیدن (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 خضرائی‌نیا ریاست محترم آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی، مراتب تشکر و سپاسگزاری بعمل می‌آید.

جدول ۲- تعداد باندهای سیتوپلاسمی در شرایط احیایی.

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

References

۱. تاج بخش، حسن. (۱۳۵۵): بررسی سرولوژیک آلودگی گوسفندان ایران به بروسلوز و سالمونلوز(*سالمونلا آبورتوس/اویس*)، 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 آبورتوس/اویس* در گوسفندان، پژوهنده، شماره ۲۳، علوم پزشکی ۵، انتشارات وزارت علوم و آموزش عالی. صفحه: ۲۲۷-۲۱۳.

۳. تاج‌بخش،ح. و محزونیه، م. ر. (۱۳۷۸): آنتی‌ژنهای *سالمونلا آبورتوس/اویس* و رهیابی سرم شناسی برای تشخیص موارد آلودگی با کمک آنتی‌ژنهای 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 rsponse 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.

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 salminellosis (*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 techique: 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. abortusouis*, 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. Todjebackch, H. and Nazari, A.A. (1974): Resistence of *Salmonella abortusovis* in soil. Revue d'Elevage et de medicine vetarinaire 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 Touvay, 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*, Veterinarnomeditsinki nauki. 24: 28- 33.

24. Zakhriev, T.S. and Kaloyanov, I. (1971): Carriaye of *Salmonella obortasovis* by experimentally infected sheep. V. B. (41): 1609.