بررسی الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های پری‌پلاسمی و غشاء خارجی سویه‌های *سالمونلا انتریکا* تحت گونه *انتریکا* سرووار *آبورتوس اویس* جدا شده از ایران

ایوبی، ح.ر.[۱]، تاج بخش، ح.[۲]، زهرایی صالحی، ت.[۲]*

دریافت : ۱۳۸۸/۸/۱۳ پذیرش: ۱۳۸۹/۳/۲۱

خلاصه:

هدف از این تحقیق بررسی الگوی پروتئین‌های غشاء خارجی و پری‌پلاسمی در سویه‌های *سالمونلا آبورتوس اویس* جدا شده از ایران و مطالعه تفاوت‌های الگوی پروتئینی آنهاست. جهت استخراج پروتئین غشاء خارجی سویه‌های *سالمونلا آبورتوس اویس* جدا شده از ایران، از روش سونیکه کردن و تریتون X-100 استفاده شد. پروتئین‌های پری‌پلاسمی با استفاده از سوکروز ۵۰۰ میلی مولار و روش شوک اسمزی استخراج گردید. جهت مشاهده این پروتئین‌ها از روش SDS-PAGE در شرایط احیائی و رنگ‌آمیزی نیترات نقره استفاده شد. نتایج نشان داد الگوی الکتروفورتیک پروتئین پری‌پلاسمی در سویه‌های مختلف *سالمونلا آبورتوس اویس* بسیار متفاوت است. تفاوت‌های اندکی در الگوی پروتئین‌های غشاء خارجی این سویه‌ها مشاهده گردید. باتوجه به یکسان بودن شرایط رشد باکتری، تفاوت‌های موجود در الگوی پروتئین پری‌پلاسمی و غشاء خارجی نشان دهندهٔ وجود یکسری اختلافات ژنوتیپی در این سویه‌ها می‌باشد. این تفاوت‌ها بعنوان یک شاخص جهت بررسی‌های اپیدمیولوژی مولکولی قابل ارزیابی هستند.

واژه‌های کلیدی: *سالمونلا آبورتوس اویس*، پروتئین پری‌پلاسمی، پروتئین غشاء خارجی، SDS-PAGE، ایران.

۱- دانشکده علوم، دانشگاه کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

۲- گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

*نویسنده مسؤول: tsalehi@ut.ac.ir

مقدمه:

سالمونلاانتریکا، تحت گونه *انتریکا* و سرووار *آبورتوس اویس* با ساختار پادگنی4,12[27]c:1,6 متعلق به گروه سرمی B می‌باشد (زهرائی، ۱۳۷۸). این سرووار عادت یافته به میزبان و عمدتاً در گوسفند بیماری‌زا است. این سرووار در اروپا و خاورمیانه اشاعه دارد و باعث سقط جنین و خسارت اقتصادی فراوان در صنعت پرورش گوسفند می‌گردد، به طوری که در مناطق اندمیک ۳۰ تا ۵۰ درصد میش‌های آبستن، سقط می‌کنند (Jack ، ۱۹۶۸؛ Pardon و همکاران، ۱۹۸۰؛ Pardon و همکاران، ۱۹۸۸). سقط جنین معمولاً در طی آبستنی اول رخ می‌دهد و در آبستنی‌های بعدی به علت ایجاد مقاومت و ایمنی نسبی علیه بیماری، کمتر اتفاق می‌افتد پس از یک دوره محدود، مجدداً جمعیت ایمن جای خود را به جمعیت حساس داده و در نتیجه ممکن است سقط جنین ناگهانی رخ دهد (Berthon و همکاران، ۱۹۹۴؛ Pardon و همکاران، ۱۹۸۰). بعضی میش‌ها پس از سقط، تلف می‌شوند و بره‌های زنده متولد شده نیز می‌میرند و گاهی نیز از این بره‌ها به عوارض مختلفی از قبیل پنومونی، لنگش و اسهال مبتلا می‌شوند (تاجبخش، ۱۳۵۲؛ تاجبخش، ۱۳۵۵؛ تاجبخش و نادعلیان، ۱۳۵۷؛ تاجبخش و محزونیه، ۱۳۷۸؛ Tadjebhche وNadalian، ۱۹۸۰). گوسفندان آبستنی که در ۱۶ هفتگی یا بعد از آن آلوده شوند معمولاً جنین‌های سالم به دنیا می‌آورند. پس از سقط براحتی می‌توان این باکتری را تا چندین هفته از ترشحات واژینال گوسفند جدا کرد. بیماری ناشی از این باکتری کم و بیش در همه نقاط مملکت وجود دارد که در این بین منطقه ورامین، کرج، استان خراسان و اصفهان از نظر آلودگی در رده اول اهمیت قرار دارند. کنترل بیماری در مناطق آندمیک مبتنی بر واکسیناسیون می‌باشد (Pardon و همکاران، ۱۹۸۰) تاجبخش در سال ۱۹۸۰ واکسن غیرفعال شده‌ای را تهیه کرد و ایمنی‌زائی آن را در میش مورد بررسی قرار داد (تاجبخش و نادعلیان، ۱۳۵۷ ; Tadjebhche وNadalian، ۱۹۸۰ ; Tadjebhche و Touvay ، ۱۹۷۹).

با توجه به اندمیک بودن بیماری در ایران و خسارت‌های وارد شده به صنعت پرورش گوسفند و از طرفی کم اهمیت بودن آن در سایر کشورها، انجام مطالعات مولکولی روی سویه‌های جدا شده از ایران، امری ضروری تلقی می‌گردد. لذا در این مطالعه پروتئین‌های پری‌پلاسمی و غشاء خارجی باکتری استخراج گردید، و جهت بررسی الگوی الکتروفورتیک این پروتئینها از روش SDS-PAGE و رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده شد.

مواد و روش کار:

الف: سویه‌های باکتری

سویه‌های باکتری مورد استفاده در این مطالعه، طی یک دورهٔ سی ساله از نواحی اندمیک در ایران و از واگیری‌های مختلف جدا گردیده و به صورت لیوفیلیزه نگهداری شده‌اند (Sidurchuk و همکاران، ۱۹۷۷). تعداد این نمونه‌ها ۳۰ سویه بود که طی سال های ۱۳۴۹ تا ۱۳۷۹ از موارد سقط میش از شهرهای ورامین و کرج، استان خراسان، اصفهان، رشت و دماوند جدا شده بود.

ب-۱- استخراج پروتئین پری‌پلاسمی

یک پرگنه از باکتری *سالمونلا آبورتوس اویس* در ۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت LB کشت داده شد و پس از یک شب نگهداری در گرمخانه ۳۷ درجه (روی شیکر) به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. رسوب حاصله در ۳۷۵ میکرولیتر از بافری مرکب از [تریس (۲۰۰ میلی مولار،PH=۸) EDTA (۰/۵ میلی مولار) و سوکروز (۵۰۰ میلی مولار)] به صورت سوسپانسیون درآمد (Clement و Popescu، ۱۹۹۱). سپس لوله‌ها را به ظرف یخ انتقال داده، به مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شدند. پس از آن به هر یک از لوله‌ها ۵۶۰ میکرولیتر آب مقطر سرد حاوی فنیل متان سولفونیل فلورایدˡ (یک میلی مولار) افزوده و به مدت نیم ساعت در ظرف یخ قرار داده شدند. سپس لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شدند. محلول روئیˢ را جدا کرده و با بافر نمونه هم حجم آن شامل [۳٪ سدیم دو دسیل

[1] - Phenyl methane sulphonil fluoride (pmsf)
[2] - Supernatant

سولفات (SDS)، ۵٪ بتا مرکاپتواتانل، ۱۰ درصد گلیسرول، ۰/۰۰۵ درصد برم فنل بلو، تریس بازی ۶٪ (pH=۷/۳)] مخلوط نموده و به مدت ۵ دقیقه جوشانده شدند. بعد از آن مقدار ۳۰ میکرولیتر از این مخلوط 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 (Harris و Angal، ۱۹۸۹) رنگ‌آمیزی شد. جهت اندازه-گیری غلظت پروتئین از روش برادفورد استفاده شد (Brandford، ۱۹۷۶). مقدار پروتئین در هر چاهک معادل ۵ میکروگرم بود.

ب- ۲- روش استخراج پروتئین‌های غشاء خارجی[3] (OMPs)

ابتدا یک پرگنه از باکتری *سالمونلا آبورتوس اویس* در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB کشت داده و به مدت یک شب در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد (روی شیکر) نگهداری شد. سپس سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. رسوب حاصله در ۵ میلی‌لیتر بافر سونیکیشن [تریس هیدروکلراید (۵۰ میلی مولار pH=۷/۴) MgSO4، (۰/۵ میلی مولار)] به صورت سوسپانسیون درآمده و مجدداً با دور ۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید تا باکتری‌ها شستشو شوند. رسوب در ۳ میلی لیتر بافر سونیکیشن (بافر فوق) حاوی pmsf (یک میلی مولار) به صورت سوسپانسیون درآمد و تا مدت سونیکه کردن روی یخ قرار داده شد (Isibsi و همکاران، ۱۹۸۸). سپس با دستگاه سونیکاتور (مدل 3.75MK2:، ساخت شرکت MSE فرانسه) به مدت ۲ دقیقه سونیکه شد (با شدت[4] ۳۰ppm).

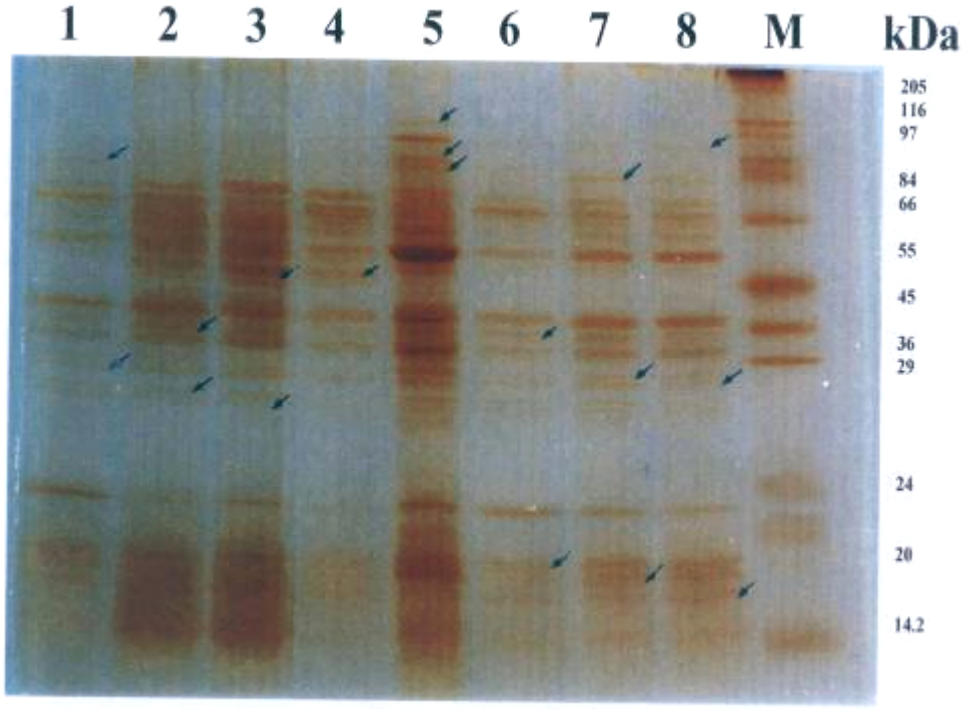
سپس نمونه به ظرف یخ منتقل گردید و با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب حاصله در ۵ میلی‌لیتر از بافر فوق و ۲۰۰ میکرلیتر تریتون X-۱۰۰ (۲۰درصد) حل گردید و به مدت ۲ ساعت روی یخ نگهداری شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰۰ دور سانتریفوژ گردیدند. سرانجام محلول روئی را جدا کرده با بافر نمونه هم حجم مخلوط نموده، پس از جوشانیدن به مدت ۵ دقیقه، میزان ۳۰ میکرولیتر از آن روی ژل ۱۲/۵ درصد پلی آکریلامید به مدت ۳ ساعت در شدت جریان ثابت ۳۰ میلی آمپر الکتروفورز گردید.

نتایج:

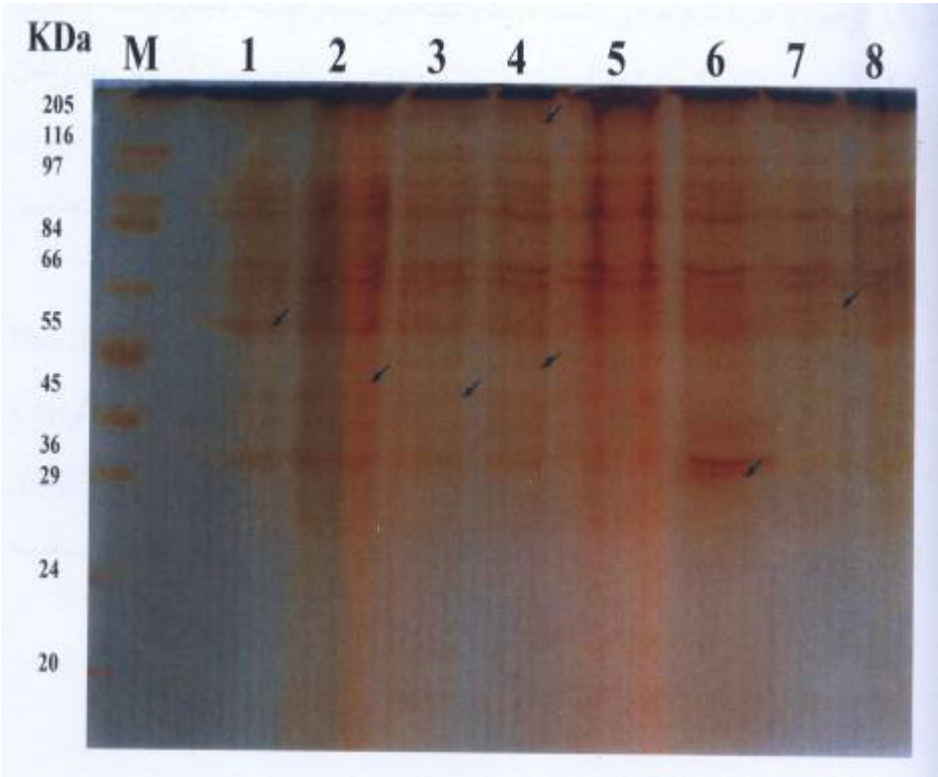
مقایسه الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های پری پلاسمی

نتایج مربوط به الکتروفورز پروتئین‌های سیتوپلاسمی سویه‌های *سالمونلا آبورتوس اویس* به روش SDS-PAGE در شکل ۱ نشان داده شده است. در این نمونه‌ها تعداد ۱۲ الی ۱۶ باند مشاهده می‌شود (جدول ۱). همانطور که در شکل مشخص شده است در برخی سویه‌ها باندهایی مشاهده می‌شود که در سایرین وجود ندارد. همچنین تفاوت‌هایی در تعداد باندهای پروتئینی این سویه‌ها وجود دارد. در سویه‌های جدا شده از ورامین (ستون ۲ و ۳) یک باند پروتئینی با وزن تقریبی ۴۴ کیلو دالتون مشاهده گردید که اختصاص به این سویه‌ها دارد. در سویه‌های استان خراسان (ستون ۱، ۷ و ۸) یک باند اختصاصی با وزن کمتر از ۶۶ کیلو دالتون دیده می‌شود. ضمناً در این سویه‌ها یک باند با وزن کمتر از ۱۷ کیلودالتون نیز مشاهده می‌گردد. سویه استاندارد (ستون ۵) از سویه‌های جدا شده از ایران تفاوت‌های مشخصی دارد.

[3] - Outer membrane proteins
[4] - Peak to peak microns



شکل ۱- تفکیک اجزای پروتئین پری پلاسمی به روش SDS-PAGE رنگ‌آمیزی نیترات نقره ستون M مارکر وزن مولکولی، ستون ۱الی ۸ شامل سویه مشهد، ورامین، ورامین، دماوند و سویه استاندارد انگلیس، چناران، نیشابور و قاسم‌آباد.



شکل ۲. تفکیک اجزاء پروتئین‌های غشاء خارجی (OMPs) سویه‌های *سالمونلا آبورتوس اویس* به روش SDS-PAGE رنگ‌آمیزی با نیترات نقره، ستون M: مارکروزن مولکولی (کیلودالتون)، ستون‌های ۱ الی ۸ به ترتیب شامل سویه‌های جدا شده از ورامین، نیشابور، قاسم آباد، چناران، مشهد، اصفهان، دماوند و کرج

شماره ستون ژل	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸
تعداد باند پروتئینی	۱۳	۱۵	۱۵	۱۲	۱۹	۱٤	۱٦	۱٦

جدول ۱- تعداد باندهای پروتئینی پری پلاسمی در سویه‌های مختلف *سالمونلا آبورتوس اویس*

مقایسه الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های غشاء خارجی

نتایج حاصله از الکتروفورز پروتئین‌های غشاء خارجی سویه‌های *سالمونلا آبورتوس اویس* در شکل ۲ نشان داده شده است. در این نمونه‌ها تعداد ۹ تا ۱۱ باند پروتئین مشاهده می‌شود (جدول ۲). وزن مولکولی این پروتئین‌ها بین ۲۶ تا ۹۷ کیلودالتون است. همانطور که از مشاهدهٔ شکل بر می‌آید، تفاوت‌های اندکی در الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های غشاء خارجی وجود دارد. در سویه جدا شده از اصفهان (ستون ۶) یک باند ۳۱ کیلودالتونی اختصاصی مشاهده می‌گردد.

شماره ستون ژل	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸
تعداد باند پروتئینی	۱۰	۱۲	۱۱	۱۱	۱۰	۱۰	۱۰	۹

جدول ۲- تعداد باندهای پروتئین‌های غشاء خارجی (OMPs) در سویه‌های مختلف *سالمونلا آبورتوس اویس*

بحث

الگوی پروتئین‌های غشاء خارجی سویه‌های مورد مطالعه بسیار یکنواخت بوده و لذا به عنوان یک شاخص اپیدمیولوژیک تلقی نمی‌گردد (شکل ۲). تنوع بیشتری در الگوی الکتروفورتیک و تعداد باندهای پروتئینی پری‌پلاسمی سویه‌های مختلف (شکل ۱) مشاهده می‌گردد. ضمناً باکتری‌های جدا شده از یک ناحیه دارای باندهای اختصاصی هستند که با پیکان روی تصاویر مشخص شده و در سایر سویه‌ها حضور ندارند؛ بنابراین این تفاوت‌ها را به عنوان یک شاخص جهت مطالعات اپیدمیولوژی می‌توان به کار برد.

در مطالعات انجام شده توسط Helmuth و همکاران (۱۹۸۵)، مشاهده گردید که الگوی پروتئین‌های غشایی در هفت سرووار شایع سالمونلا از تشابه زیادی برخوردار هستند و این دسته از پروتئین‌ها به عنوان یک ویژگی اپیدمیولوژیک در نظر گرفته نشدند.

باتوجه به تفاوت‌های مشاهده شده در الگوی پروتئین‌های پری

پلاسمی سویه‌های *سالمونلا آبورتوس اویس*، با مقایسه الگوی پروتئینی مربوط به سویه‌های جدیدعامل سقط جنین در یک منطقه، می‌توان از نحوهٔ انتشار و منشاء آلودگی آگاهی یافت و آن را 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. تاج‌بخش نشان داد که این باکتری قادر است به صورت خاموش در خاک زنده بماند و مجدداً ایجاد آلودگی و سقط کند (Tadjebakhche و Nazari، ۱۹۷۴). باتوجه به جابه-جایی میش در مراتع، ردیابی نحوهٔ انتشار باکتری در داخل مناطق جغرافیایی مشکل است ولی با مطالعه ساختار پروتئینی باکتری می‌توان به اپیدمیولوژی مولکولی باکتری پی برد. همانطور که در این مطالعه مشاهده می‌گردد، سو**یه**های جدا شده از نواحی جغرافیایی خاص دارای اختلاف قابل ملاحظه‌ای در تعداد باندهای پروتئین‌های پری‌پلاسمی هستند و با توجه به یکسان بودن شرایط کشت باکتری، این تفاوت‌ها نشان دهندهٔ اختلاف ژنوتیپی در این سوش‌ها است. بنابراین با استفاده از الگوی پروتئین‌های پری‌پلاسمی می‌توان تا حدودی سویه‌های *سالمونلا آبورتوس اویس* ایجاد کننده سقط در واگیری‌های مختلف را تشخیص و ردیابی کرد.

در این پژوهش جهت استخراج پروتئین‌های پری‌پلاسمی از روش کلمنت[5] و پوپسکو (Petrichev و همکاران، ۱۹۶۸) با برخی تغییرات استفاده گردید (Clement و Popescu، ۱۹۹۱) در این روش با استفاده از شوک اسمزی (با استفاده از بافر ذکر شده در مقاله) سلول باکتری را به پروتوپلاست تبدیل نموده، پس از رسوب دادن بقایای دیوارهٔ سلولی و پروتوپلاست‌ها، آنزیم‌ها و پروتئین‌های پری‌پلاسمی در فاز مایع روئی استخراج گردیدند. در این بررسی مشاهده شد که پروتئین‌های پری‌پلاسمی اکثراً در محدوده وزن مولکولی ۱۴ الی ۱۰۰ کیلودالتون قرار دارند. برخلاف پروتئین‌های غشاء خارجی، فضای پری‌پلاسمی طیف وسیعتری از پروتئین‌ها را به خود اختصاص داده و در این محدوده وزن مولکولی، پراکندگی قابل ملاحظه‌ای داشته‌اند. الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های پری‌پلاسمی در مقایسه با پروتئین‌های OMP از تنوع بیشتری برخوردار بود. این تفاوت‌ها با پیکان روی تصویر شکل ۱ نمایش داده شده است. باتوجه به حضور برخی از باندهای اختصاصی در سویه‌های جدا شده از یک منطقه جغرافیایی، می‌توان همگام با الگوی پروتئین تام (تاج‌بخش و همکاران، ۱۳۸۳) از پروتئین‌های فضای پری‌پلاسمی نیز به عنوان یک مارکر جهت بررسی‌های اپیدمیولوژیک استفاده کرد.

جهت استفاده OMPs از روش سونیکه کردن و تریتون X -۱۰۰ استفاده گردید. الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های غشاء خارجی در سویه‌های مورد مطالعه، بسیار مشابه بود. بنابراین در مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی نمی‌توان از آن به عنوان یک شاخص مولکولی استفاده نمود. (Isibsi و همکاران، ۱۹۸۸). با استفاده از سوئیکه کردن، پروتئین‌های غشاء خارجی سالمونلا تیفی و تیفی موریوم را استخراج کردند (Isibsi و همکاران، ۱۹۸۸). نامبردگان مشاهده نمودند که پروتئین‌های اصلیOMP در دو دسته با وزن مولکولی ۳۶-۴۱ و ۲۳-۲۸ کیلودالتون قرار دارند. ضمناً چند باند پروتئینی با وزن ۱۷-۷۰ کیلودالتون در الگوی پروتئینی این سروتیپ‌ها مشاهده گردید. در مطالعهٔ دیگری مشخص شد که الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های غشاء خارجی در ۷ سروتیپ شایع سالمونلا (*سالمونلا تیفی موریوم*، *انتریتیدیس*، *دابلین*، *کلراسویس*، *اینفنیتس*، *پاناما* و *هایدلبرگ*) از تشابه زیادی برخوردار هستند به طوری که تمام سویه‌های *سالمونلا تیفی موریوم*، *پاناما* و *هایدلبرگ*، الگوی یکسانی را نشان دادند (Helmuth و همکاران، ۱۹۸۵). بنابراین بر اساس نتایج تحقیق حاضر نیز از الگوی پروتئین‌های غشاء خارجی نمی‌توان به عنوان یک شاخص در بررسی‌های اپیدمیولوژیک بهره‌مند شد.

Isibsi و همکاران (۱۹۸۸)، گزارش کردند که OMPs *سالمونلا تیفی* قادر است ایمنی محافظت‌کننده در مقابل چالش با جرم زنده ایجاد نماید مطالعات انجام شده روی OMP سایر باکتری های گرم منفی نظیر *نایسریا گونوره* (Buchanan و همکاران ۱۹۹۷) *نایسریا مننژیتیدیس* (Wang و Frasgm، ۱۹۸۴) *سودوموناس آئروژینوزا* (Gilleland و همکاران، ۱۹۸۴)، *هموفیلوس آنفلوانزا* (Guling و همکاران، ۱۹۸۲)، *شیگلا سونئی* و *شیگلا*

[5] - Clement

فلکسنری (Adamus و همکاران، ۱۹۸۰) توانایی ایمنی‌زایی این پروتئین‌ها را نشان داده است. با توجه به ایمنی‌زایی بالقوه ایران، در صورت استخراج مقادیر فراوان OMPs مربوط به این سویه‌ها (با توجه به روش توصیه شده در این پژوهش) می‌توان قابلیت آنها را جهت تهیه واکسن‌های تحت واحدی جهت پیشگیری از سقط‌های سالمونلایی ارزیابی کرد.

این اجزاء پروتئینی و همچنین تشابه فراوان الگوی الکتروفورتیک پروتئین‌های غشاء خارجی سویه‌های جدا شده از

تشکر و قدردانی

نگارندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و دانشکده دامپزشکی به خاطر تأمین اعتبار طرح تحقیقاتی شماره ۲۱۵/۲/۵۱ که این مقاله مستخرج از آن است ابراز می‌دارند.

Journal of Veterinary Medicine & Laboratory 2(2010) 21-30

The study of periplasmic and outer membrane proteins patterns in *Salmonella* enterica subsp. enterica serovar Abortusovis strains isolated from Iran

Ayoubi, H.R.[1], Tadjbakhsh, H.[2], Zahraei Salehi, T.[2]*

Received: 04.11.2009 Accepted: 11.06.2010

Abstract:

Aim of this study was comparison of periplasmic and outer membrane proteins (OMPs) patterns between *Salmonella abortus ovis* strains isolated from Iran. Outer membrane proteins were prepared by sonication in triton X-100. Periplasmic proteins were extracted by 500 Mm Sucrose osmotic shock. Periplasmic and OMPs extracted proteins were analyzed by SDS-PAGE and silver staining. The results showed that there is considerable difference between periplasmic protein profiles of *S. abortus ovis* strains. The outer membrane proteins patterns were approximately similar among the strains. The protein profile differences and number of protein bands showed in figure and tables. In fact these 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 abortus ovis* wild types.

Key words: *Salmonella abortus ovis*, Periplasmic protein, Outer membrane prote PAGE, Iran.

1: Faculty of Science, Kermanshah University, Kermanshah, Iran.
2:Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
*Corresponding author: tsalehi@ut.ac.ir

منابع

تاج‌بخش، ح. ۱۳۵۲. تحقیقات مربوط به سقط جنین‌های ناشی از *سالمونلا آبورتوس اویس* در ایران. پنجمین کنگره دامپزشکی،

تهران، ۳۰۶-۳۱۱.

تاج‌بخش، ح. ۱۳۵۵. وضعیت سالمونلاهای دامی ایران. هشتمین کنگره دامپزشکی ایران، تهران، خلاصه مقالات ۱۶-۱۵.

تاج‌بخش، ح.؛ نادعلیان، م. ۱۳۵۷. ایمنی تجربی ناشی از *سالمونلا آبورتوس اویس* در گوسفندان، پژوهنده ۲۳، علوم پزشکی ۵، انتشارات وزارت علوم و آموزش عالی- صفحه ۲۱۳-۲۲۷.

تاج‌بخش،ح.؛ ایوبی، ح.؛ پورکبیره، م.؛ زهرائی‌صالحی، ت. ۱۳۸۳. مقایسه الگوی الکتروفورتیک پروتیئن‌های تام و سیتوپلاسمی سویه‌های *سالمونلا انتریکا* سروتیپ *آبورتوس اویس* جدا شده از ایران. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، **۵۹ (۲)**، ۱۴۷- ۱۵۱.

تاج‌بخش، ح.؛ محزونیه، م. ۱۳۷۸ . آنتی‌ژنهای *سالمونلا آبورتوس اویس* و ره‌یابی سرم شناسی برای تشخیص موارد آلودگی با کمک آنتی‌ژن‌های اختصاصی.مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، **۵٤(۲)**، ۴۳-۴۸.

زهرایی صالحی، ت. ۱۳۷۸. سالمونلا، انتشارات دانشگاه تهران، شماره۲۴۲۹، ۱۷۹-۱۸۰.

Adamus, G., Mulczka, M., Witkowska, D., Romanowska E. 1980. Protection against keratoconjunctivtis shigellosis induced by immunization with outer membrane proteins of *Shigella* sp. Infect ion and Immunity. **30**, 321-324.

Berthon, P., Gohin, I., Lantier, I., Oliver, M. 1994. Humoral immune response to *Salmonella abortus ovis* in sheep: in vitro induction of an antibody synthesis from either sensitized or unprimed lymph onde cells. Veterinary Immunology and Immunopathology. **41**, 275-294.

Brandford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quanitities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analual Biochemistry. **72**,: 248-254.

Buchanan, T.M., Pearce, W.A., Schoolnich, G.K., Arko, R.J. 1997. Protection against infections with *Neisseria gonorrhoeae* by immunization with outer membrane protein complex and purified pili. Journal of infectious Disease. **136(suppl)**, 132-137.

Clement, J.M., Popescu, O. 1991. MalE as a tool for the Production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. Bulletin of Institute Pasteur. **89**, 243-253.

Gilleland, H. E., Parker, M.G., Matthews, J.W., Berg, R.D. 1984. Use of purified outer membrane protein F (porin) preparation of *Pseudomonas aeroginosa* as a protective vaccine in mice. Infection and Immunity. **44**, 49-54.

Guling, P.A., McCracken, G.H., Frich, C.F., Johnston, K.H., Hansen, E.J. 1982. Antibody response of infants to cell surface exposed outer membrane proteins of *Haemophilus influenza* type b after systemic haemophilus disease. Infection and Immunity. **37**, 82-88.

Harris, E.L.V., Angal, A. 1989. Protein purification methods: A practical approach. Oxford university press. P. 43-45.

Helmuth, R., Stephan, R., Bunge, C., Hoog, B., Steinbeck, A., Bulling, E. 1985. Epidemiology of virulence associated plasmid and outer membrane protein patterns within seven common *Salmonella* serotype. Infection and Immunity. **48**, 175-182.

Isibsi, A., Ortiz, V., Vargas, M., Paniagua, J., Gonzalez, C., Moreno, J., Kumater, J. 1988. Protection against *Salmonella typhi* infection in mice after immunization with outer membrane protein isolated from *Salmonella typhi* 9,12,d.Vi. Infection and Immunity. **56**, 2953-2959.

Jack, E.J. 1968. *Salmonella abortusovis*: An Atypical *Salmonella*. Veterinary Record. **82**, 558-561.

Pardon, P., Marley, J., Sanchis, R. 1980. Experimental *Salmonella abortus ovis* infection in ewes, Veterinary Record. **106(17)**, 389-390.

Pardon, P., Sanchis, R., Marly, J., Lantier, F., Pepin, M., popoff, M. 1988. Ovine salmonellosis

caused by *Salmonlla abortus ovis*. Annual Research in Veterinary Science. **19**, 221-235.
Petrichev, M., Davetkar, R., Lazarov, V., Arsov, P. 1968. Distribution and localization of *Salmonella abortus ovis* in experimentally infected guinea pigs and sheep. Veterinary Bulletin. **38**, 5455.
Sidurchuk, A.A., Arkhangelskill, I.I., Karavaev, Y.D. 1977. Indirect haemaglutination test for salmonellosis in sheep. Veterinarya Moscow USSR. **8**, 110-112.
Tadjebakhche, H., Nazari, A.A. 1974. Persistence of *Salmonella abortus ovis* in soil. Revu d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des pays Tropicaux. **1(27)**, 57-59.
Tadjebakhche, H., Touvay, G. 1979. Evelution des anticorps chez des brebis immunires contre *Salmonella abortus ovis* par diffirents vaccin tues. Médecine Vétérinaire. **12(130)**, 1635-1684.
Tadjebhche, H., Nadalian, M.G. 1980. Immunité expérimentale causée par *Salmonella abortus ovis* chez les brebis.Revue de Medecine veterinaire. **3(131)**, 247-254
Wang, L.I., Frasgm, C.E. 1984. Development of a *Neissreia meningitidis* group B serotype 26 protein vaccine evaluation in a mouse model. Infection and Immunity. **46**, 408-414.