پژوهش و سازندگی
در امور دام و آبزیان
شماره ۶۹، زمستان ۱۳۸۴

بررسی پروتئین‌های پادگنی برخی سویه‌های *Salmonella abortus ovis* با استفاده از روش وسترن بلاتینگ

• غلامرضا نیکبخت بروجنی و • حسن تاج بخش، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران
گروه آموزشی میکرب شناسی ، تهران - ایران

تاریخ دریافت: مرداد ماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: دی ماه ۱۳۸

Email:nikbakht@ut.ac.ir

چکیده

S. abortus ovis یکی از عوامل مهم سقط جنین گوسفند و بز در ایران است. به نظر می‌رسد که بررسی تفاوت‌های پادگنی در سویه‌های مختلف این سالمونلا بتواند به طراحی واکسن موثر در پیشگیری از بیماری کمک نماید. در این تحقیق تعداد ۳۷ سویه *S. abortus ovis* مورد مطالعه قرار گرفتند و روش وسترن بلات برای بررسی پادگن‌های عمده باکتری در سویه‌های مختلف استفاده شد. پروتئین‌های ۲۶، ۱۵ تا ۲۰ و کمتر از ۹ کیلو دالتون واکنش موثرتری را با پادتن‌های سرمی داشتند. پادگن ۲۶ کیلو دالتون در تمامی‌نمونه‌های ایران (ورامین و چهارمحال و بختیاری) و $SS_{۴۴}$ مشاهده شد. در مجموع در سویه‌های استان چهارمحال و بختیاری و $SS_{۴۴}$ حداقل پنج پروتئین ایمونوژن و در سویه های ورامین سه پروتئین ایمونوژن مشخص گردید. در بین سویه‌های مورد مطالعه پادگن‌های مشترک و غیر مشترکی وجود داشتند. حضور پادگن‌های متفاوت در بین سویه‌های مختلف باکتری می‌تواند رهیافت مناسبی در بررسی‌های اپیدمیولوژیک باشد. در عین حال پادگن‌های مشترک و همچنین غیر مشترک در بین سویه‌های مناطق مختلف ایران را می‌توان در طراحی واکسن‌های مطلوب و موثر مورد استفاده قرار داد.

کلمات کلیدی: *Salmonella abortus ovis*، وسترن بلاتینگ، پادگن‌های مشترک و اختصاصی

Pajouhesh & Sazandegi No:69 pp: 53-57

Antigenic characterization in *Salmonella abortus ovis* by western-blot method

By: Gh. Nikbakht Brujeni and H.Tadjbakhsh., University of Tehran, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Tehran-Iran

Salmonella abortus ovis is the main causative agent of sheep abortion in Iran. Study of major antigens among different *S.abortus ovis* strains seems to be useful for designing the effective vaccine. In this experiment 37 *S. abortus ovis*

strains were studied.Western- blot method has been applied to detect major antigens in *S.abortus ovis* strains.All strains developed 5 and 3 major antigens respectively for SS44 and CH-Bakhtiary strains and Varamin strains. Antigens with 26, 15-20 and less than 9 kD yield more effective reaction with serum antibodies. Band of 26 kD was identical among all strains. Different *S. abortus ovis* strains revealed both identical and non identical antigens that not only could be used for further epidemiological studies but also assist designing of more effective vaccines for local and universal applications.

Key Words: *Salmonella abortus ovis*, Western-blotting, Common and different antigens.

مقدمه

یکی از معضلات پرورش گوسفند به‌ویژه در سیستم های روستایی و شرایط کوچ نشینی سقط های بدون علامت است. بروسلا و سالمونلا از جمله عوامل عمده این گونه سقط‌ها به شمار می‌روند. درمیان سروتیپ‌های سالمونلا که باعث سقط در میش‌ها می‌شوند، عفونت *S. abortus ovis* به کلی متفاوت است، چرا که عموماً با علائمی‌که در ابتلای میش‌ها به سایر سروتیپ‌ها مشهود است، مثل انتریت، متریت، توکسمی، شوک و مرگ همراه نیست (۲۱،۱۳،۱۱) . *S. abortus ovis* یکی از عوامل مهم سقط جنین گوسفند و بز در خاورمیانه و بخش‌هایی از اروپاست (۲۰،۱۷،۱۵،۱۲،۱۱) . در ایران نیز بروسلا و سالمونلا عوامل عمده سقط جنین درگوسفند شناخته شده‌اند (۱ ،۴، ۵ ،۸). در سال ۱۳۴۴ شیمی و افنان *S. abortus ovis* را مورد مطالعه قرار دادند (۷). کیهانی در سال ۱۹۷۱ نیز به فاژی اختصاصی برای سویه‌های ایران دست یافت که بر روی سویه‌های جدا شده از انگلستان وکانادا تأثیری نداشت(۱۴). براساس بررسی‌های تاج بخش در سال ۱۳۵۵، میزان آلودگی گوسفندان کشور به سالمونلا ۱/۵ تا ۲درصد و بزها ۳تا۴ درصد بوده است (۱۹،۲) تاکنون بررسی جامعی بر روی میزان آلودگی گوسفند در ایران صورت نگرفته است اما به نظر می‌رسد که موارد سقط جنین سالمونلایی در گوسفندان در برخی مناطق در حال افزایش است(۶ ،۱۶). اکنون به دلیل استفاده از واکسنی نسبتاً موثر (Rev_1) در گوسفند کاهشی در موارد سقط جنین بروسلایی مشاهده می‌شود ولی هنوز سقط جنین های ناشی از *S. abortus ovis* که به صورت دوره‌ای در گله‌های گوسفند رخ می‌دهند خسارات سنگینی به دامداران محلی و کوچ نشینان وارد می‌سازند (۶،۱) .

یکی از روش های موثر در کنترل بیماری استفاده از واکسن های موثر است. تهیه واکسن های موثر بر علیه بیماری به‌طور قطع نیازمند بررسی‌های بیشتر برروی خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی عامل بیماری است. ما در تحقیقات پیشین خود به بررسی برخی خصوصیات بیوشیمیایی و ژنتیکی باکتری پرداخته‌ایم (۳ ، ۱۶) . در این مطالعه ویژگی‌های پادگنی جرم در حد ملکولی بیشتر مورد توجه قرار خواهد گرفت. مشخص نمودن تنوع پادگنی در بین سویه‌هایی که تنوع ژنتیکی آنها با سایر روش‌ها مشخص شده است و بررسی پادگن‌های عمده از اهداف دیگری است که در این تحقیق دنبال شده و شاید بتوان از نتایج آن در طراحی واکسن و مطالعات اپیدمیولوژیک گسترده تر بهره برد.

مواد و روش‌ها

در مجموع تعداد ۳۷ سویه *S. abortus ovis* در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند. تعداد ۳۴ سویه در طی دو سال ۱۳۷۷ و ۱۳۷۸ در شبکه دامپزشکی استان چهارمحال و بختیاری جدا شده بودند. دو سویه از موارد سقط گوسفند در ورامین در سال ۱۳۴۹ جدا شده بود و یک سویه $SS_{۴۴}$ که متعلق به جزیره ساردنیا در ایتالیا است (۱۸،۱۶). همانگونه که ذکر شد این بررسی بر روی سویه هایی صورت گرفت که پیش از این با استفاده از روش انگشت نگاری IS۲۰۰ و پلاسمید پروفایلینگ تایپینگ شده بودند (۸) . در ابتدا با استفاده از روش SDS-PAGE به بررسی پروفایل پروتئینی سویه های مذکور پرداخته شد و سپس خصوصیات پادگنی آنها با استفاده از روش وسترن بلات مورد مطالعه قرار گرفت.

روش SDS-PAGE

۲ میلی لیتر از کشت باکتری به مدت یک شب در ۱۰۰۰۰ دور به مدت۲ دقیقه سانتریفوژ شده و رسوب باکتری در ۱۰۰ میکرولیتر بافر دناتوره کننده حل می‌شد. ترکیب بافر مورد استفاده بدین قرار بود: تریس هیدروکلراید ۰/۱ مول pH=۶ SDS ۴ درصد، برم فنل بلو ۰/۲ درصد، گلیسرول ۲۰ درصد و بتا مرکاپتواتانل ۵ درصد. پس از حل کردن باکتری‌ها در بافر فوق مخلوط به مدت ۳ دقیقه در حمام آب جوش قرارگرفته و سپس در ۱۰ هزار دور در دمای آزمایشگاه به مدت کوتاهی سانتریفوژ می‌شد.۱۰ میکرولیتر از مایع رو جهت الکتروفورز استفاده می‌گردید. غلظت ژل ا کریلامید ۷/۵ درصد تعیین گشته و برای رنگ آمیزی از کوماسی بلو ۰/۰۵ درصد در متانل ۵۰ درصد و اسید استیک ۱۰ درصد استفاده شد. تمامی اعمال انجام شده بر اساس روش شرح داده شده جهت الکتروفورز یک بعدی پروتئین‌ها توسط Ausubel و همکاران بوده است (۹) .

روش وسترن بلات

در این مرحله از سونیکه کردن یاخته‌های باکتری جهت جداسازی پروتئین‌های جدار یاخته ها از سایر پروتئین‌ها نیز استفاده شد. به همین منظور پس از سانتریفوژ نمودن

باکتری‌هایی که به مدت یک شب در محیط LB (لوریا برتانی) کشت شده بودند رسوب باکتری‌ها در PBS مجدداً حل گشته و از هر نمونه هم به صورت سونیکه و هم به‌صورت غیر سونیکه در SDS-PAGE استفاده شد. نمونه‌های سونیکه بدین صورت تهیه شدند: مخلوط باکتری ها در PBS به مدت ۵ ثانیه در ظرف یخ سونیکه شده و سپس به مدت ۳۰ ثانیه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. از مایع رو جهت الکتروفورز استفاده شد.

پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریلامید به روشی که شرح آن قبلاً داده شد (رجوع شود به روش SDS-PAGE). انتقال پروتئین‌ها به غشای PVDF با استفاده از دستگاه ترانس بلات[۲] شرکت Bio – RAD و بر اساس دستورالعمل پیشنهادی همراه دستگاه صورت گرفت. غشای PVDF پس از خروج از دستگاه به مدت یک ساعت در محلول بلوکینگ حاوی PBS (۰/۵٪) و Tween ۲۰ قرار داده شد. سپس از محلول بلوکینگ خارج شده و در محلول بلوکینگ به همراه BSA ۳ درصد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت.

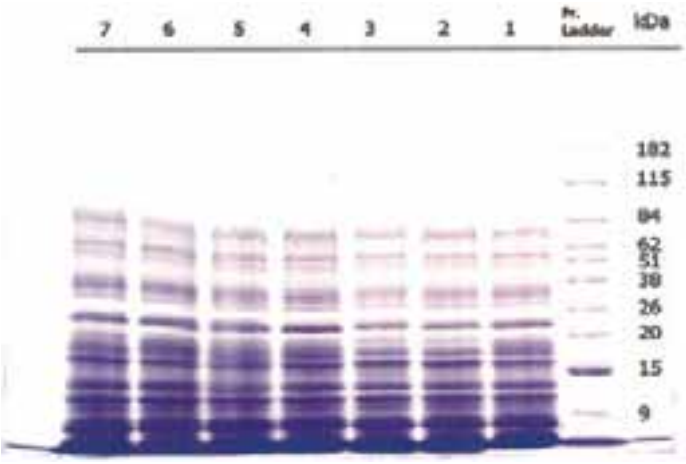
از سرم گوسفندان آلوده به سویه بومی *S. abortus ovis* جدا شده در جزیره ساردنیا به عنوان پادتن اولیه[۳] استفاده شد. عیار پادتن در سرم مذکور Hc ۱به ۱۲۵۰ بود که در محلول بلوکینگ حاوی BSA به میزان ۱/۵۰ رقیق گردید. غشای PVDF به مدت یک شب در محلول حاوی پادتن قرار گرفت. روز بعد پس از سه بار شستشوی غشا در بافر بلوکینگ از پروتئین G کونژوگه پروکسیداز (Roch biochemical) به جای پادتن ثانویه[۴] استفاده شد. در اینجا غشا به مدت یک ساعت در محلول بلوکینگ حاوی پروتئین G قرار گرفت. پس از آن سه بار غشای PVDF در بافر بلوکینگ شسته شده و برای رؤیت باندها از محلول TMB و آلفا کلرونفتول (کیت سوبسترای پروکسیداز ساخت شرکت Pierc) استفاده شد.

نتایج

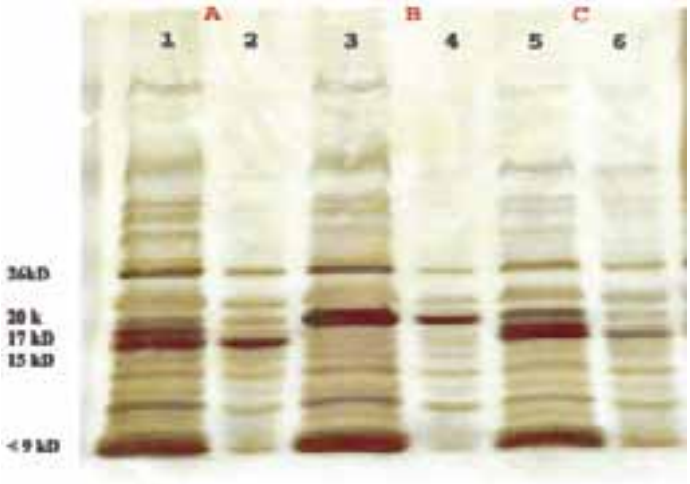
نتایج بدست آمده از الکتروفورز پروتئین تام *S. abortus ovis* بر روی ژل پلی اکریلامید در شکل شماره ۱ نشان داده شده است.

باندهای پروتئین عمدتاً بین ۹ تا ۸۴ کیلو دالتون قرار گرفته اند. همان‌گونه که مشاهده می‌شود در میان نمونه‌های مورد آزمایش تفاوتی به چشم نمی‌خورد. همچنین سویه‌های ایران با سویه $SS_{۴۴}$ متعلق به جزیره ساردنیا نیز تفاوت قابل توجهی را نشان نمی‌دهند.

در آزمون وسترن بلات همانگونه که در شکل شماره ۲ مشاهده می‌شود، پروتئین‌های ۲۶، ۱۵ تا ۲۰ و کمتر از ۹ کیلو دالتون واکنش موثر تری را با پادتن های سرمی‌داشته اند. غلظت پروتئین ۲۶ کیلودالتون پس از سونیکه نمودن کاهش یافته و بنا بر این باند ضعیف تری را نشان می‌داد. پادگن ۲۶ کیلو دالتون در تمامی‌نمونه های ایران (ورامین و چهارمحال و بختیاری) و $SS_{۴۴}$ مشاهده می‌شود. حضور سه باند بین ۱۵ تا ۲۰ کیلودالتون در نمونه‌های چهارمحال و بختیاری و $SS_{۴۴}$ مشاهده شد ولی در سویه ورامین تنها باند ۲۰ کیلودالتون با واکنشی قوی مشاهده می گردد. جالب آنکه



شکل ۱ – نتایج الکتروفورز پروتئین تام سویه‌های مختلف *S. abortus* ovis بر روی ژل اکریلامید با رنگ آمیزی کوماسی بلو



شکل شماره ۲- نتایج وسترن بلات بر روی سویه های مختلف A: . *S. abortus* ovis سویه چهارمحال و بختیاری غیر سونیکه(۱) و سونیکه(۲) B: سویه ورامین غیر سونیکه(۳) و سونیکه(۴) $SS_{۴۴}$ C: غیر سونیکه(۵) و سونیکه(۶)

باند فوق پس از سونیکه کردن واکنش تقلیل یافته‌ای را دارا است. به عوض در سویه‌های چهارمحال و بختیاری و $SS_{۴۴}$ باند ۱۵ کیلو دالتون حتی پس از سونیکه کردن نیز به طور مشخص حضور داشت. در تمامی‌سویه‌ها باند کمتر از ۹ کیلودالتون تنها در نمونه‌های غیر سونیکه وجود دارد.

در مجموع در سویه‌های استان چهارمحال و بختیاری و $SS_{۴۴}$ حداقل پنج پروتئین پادگنی و در سویه‌های ورامین سه پروتئین پادگنی مشخص گردید(جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱- اوزان باندهای پروتئینی بدست آمده در روش وسترن بلاتینگ

	A		B		C	
شماره نمونه	۱	۲	۳	۴	۵	۶
وزن باندهای پروتئینی به کیلودالتون	۲۶		۲۶		۲۶	
	۲۰		۲۰	۲۰	۲۰	
	۱۷				۱۷	
	۱۵	۱۵			۱۵	۱۵
	<۹		<۹		<۹	

بحث

ساختار پادگنی *S. abortus ovis* توسط تاج بخش و محزونیه مورد بررسی قرار گرفته است. در این بررسی حداقل ۶ نوع پادگن مجزا با استفاده از روش ایمنودیفوزیون مشخص شده است(۴). یکی دیگر از نکات جالب این تحقیق اختلافات پادگنی سویه های مختلف باکتری است که می‌تواند مبنایی برای بررسی های اپیدمیولوژیک قرار گیرد (۴). ما نیز در این تجربه حضور حداقل پنج پروتئین را با استفاده از روش وسترن بلات در سویه های جدا شده در استان چهارمحال و بختیاری به اثبات رساندیم. باید توجه نمود که این تحقیق با سرم گوسفندان آلوده به سویه بومی جزیره ساردنیا صورت گرفته و در صورت استفاده از سرم گوسفندان آلوده به سویه بومی‌ایران ممکن است نتایج بیشتری را در بر داشته باشد. به هر حال آنچه در کل نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر قابل توجه است را می‌توان به شرح زیر خلاصه نمود:

در مقایسه نتایج نمونه‌های سونیکه و غیر سونیکه مشاهده می‌شود که پروتئین‌های ۱۷، ۲۰ و ۲۶ کیلو دالتون احتمالاً بخشی از ماکروملکول‌های یاخته‌ای با وزن بالا هستند که در سونیکاسیون و سانتریفوژ از نمونه مورد آزمایش جدا شده اند. این مطلب به‌ویژه با مشاهده عدم حضور باندهای فوق به طور قوی در نمونه‌های سونیکه مشخص می‌شود. این پروتئین‌ها به‌شدت در اثر سونیکاسیون تقلیل یافته اند. باند کمتر از ۹ کیلودالتون مربوط به پروتئین‌های تحلیل رفته[۵] است و باز هم به نظر می‌رسد که در اثر سونیکاسیون و سانتریفوژ حذف شده باشد. اما در خصوص سویه ورامین باند ۲۰ کیلودالتون در نمونه سونیکه نیز حضور داشته و بیشترحاکی از حضور مشخص پروتئین ۲۰ کیلو دالتون در سویه مذکور است.

موضوع قابل توجه دیگر مشابهت کامل الگوی پادگنی سویه چهارمحال و بختیاری با سویه $SS_{۴۴}$ است. پیش از این مشخص کردیم که سویه‌های ساردنیا (ایتالیا) با سویه‌های ایران تفاوت‌های مشخصی را در الگوهای ژنومی‌خود دارا هستند (۸، ۱۰، ۱۶، ۱۸) . شاید این تصور باشد که نمونه سرمی گوسفندان ساردنیا بیشتر قادر به مشخص نمودن ویژگی‌های سویه‌های بومی باشند ولیکن تشابه کامل سویه های چهارمحال و بختیاری و ساردنیا در این تجربه گواه بر پادگن های عمده‌ای است که در غالب سویه ها حضور دارند (۲۶ و ۱۵-۲۰ کیلو دالتون). همچنین حضور پادگن های ۲۶ و ۲۰ کیلو دالتون در نمونه‌های غیر سونیکه و بویژه در تمامی‌سویه‌های مورد آزمایش دلیل دیگری بر این مدعاست.

حضور بسیار مشخص باند ۲۰ کیلو دالتون در سویه ورامین و عدم حضور باندهای ۱۷ و ۱۵ کیلودالتون در این سویه‌ها نشان‌دهنده تنوع پادگنی در سویه‌های متفاوت است به گونه‌ای که پروتئین ۲۰ کیلو دالتون در سویه ورامین با مقدار بیشتر و ویژگی بالاتری تولید شده و پروتئین‌های ۱۷ و ۱۵ کیلودالتون نقش ایمنی‌زایی چندانی نیافته‌اند. اینکه ذکر می‌شود نیافته‌اند از آن روست که سویه ورامین با فاصله حدود ۳۰ سال از سویه‌های چهارمحال و بختیاری جدا شده و در بررسی‌های ژنومی‌نیز نیز پروفایل مشابه سویه مذکور تا کنون در هیچ کجای ایران مشاهده نشده است(۸، ۱۶). از سوی دیگر پروفایل پلاسمیدی سویه‌های ایران دو جمعیت باکتریایی متمایز را نشان می‌دهند(۸). پروفایل پادگنی سویه‌های مذکور در این تجربه نیز کاملاً با پروفایل‌های پلاسمیدی بدست آمده منطبق است. بنابر این شاید تفاوت های پادگنی مشاهده شده به تفاوت های ژنومی‌خارج کروموزومی در *S. abortus ovis* باز گردد. عناصر پلاسمیدی در باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه همواره منشا تفاوت های فنوتیپی بارزی بوده‌اند. این عناصر خارج کروموزومی‌در طول زمان دستخوش تغییر و کسب خصوصیات جدیدند. کشف منشا تفاوت‌های مشاهده شده نیازمند تحقیقات بیشتر در زمینه ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی باکتری است.

به هر حال از تفاوت‌های پادگنی موجود در بین سویه های مختلف باکتری به خوبی می‌توان در بررسی‌های اپیدمیولوژیک و همچنین منشا واگیری‌ها بهره برد. از سوی دیگر اختلافات پادگنی و پادگن‌های مشترک در بین سویه‌های مختلف راهنمای مناسبی در طراحی واکسن‌های موثر برای مناطق جغرافیایی مختلف خواهند بود.

پاورقی‌ها

1- Western Blot
2- Minitrans- Blot
3- Primary Antibody
4- Secondary Antibody
5- Degredate

منابع مورد استفاده

۱ -تاج بخش، حسن،۱۳۵۵؛ بررسی سرولوژیک آلودگی گوسفندان ایران به بروسلوز و سالمونلوز، پژوهنده، شماره۱۳- علوم پزشکی۲، انتشارات وزارت فرهنگ وآموزش عالی، ص۱۵۷- ۱۱۳.

۲ -تاج بخش، حسن،۱۳۵۵؛ وضعیت سالمونلوزهای دامی ایران، هشتمین کنگره دامپزشکی ایران، تهران.

۳ -تاج بخش، حسن و غلامرضا نیکبخت ، ۱۳۸۳؛ بررسی خواص بیو شیمیایی و الگوهای انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی جهت بیوتایپینگ سویه های سالمونلا آبورتوس اوویس جدا شده از استان چهار محال بختیاری، شماره۱، دوره ۵۹، ص۱۳-۱۶

۴ - تاج بخش، حسن و محمدرضا محزونیه ،۱۳۷۸؛ آنتی ژن‌های سالمونلا آبورتوس اویس و ره یابی سرم شناسی برای تشخیص موارد آلودگی با کمک آنتی ژن‌های اختصاصی، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره۲، دوره ۵۴،

ص ۴۳ - ۴۸.
۵ - تاج بخش، حسن و علی اصغر نظری آریا ،۱۳۵۸؛ جغرافیای بیماری‌های واگیر مناطق بیابانی ایران، نامه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره۳ و ۴ دورهٔ ۳۵، ص ۴۵ - ۶۸.
۶ - شریف زاده، علی،۱۳۷۸؛ بررسی سرمی‌عفونت سالمونلا آبورتوس اوویس در گوسفندان استان چهارمحال وبختیاری، پایان نامه شماره۳ دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد.
۷ - شیمی، احمد، عبدالمحمد حسنی طباطبایی و علی اصغر نظری آریا،۱۳۶۴؛ بیماری‌های عفونی دام چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تهران، شماره ۱۸۲۱، ص ۲۹۸-۳۰۰
۸ - نیکبخت بروجنی ، غلامرضا،۱۳۸۰؛ بررسی خصوصیات ژنوتیپی و بیولوژیک سویه‌های سالمونلا آبورتوس اویس جدا شده از استان چهارمحال و بختیاری، پایان نامه دکترای تخصصی میکرب شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ۱۲۴.

9- Ausubel, FM. Brent, R. Kingstone, R. Moore, DD. Seidman, JG . Smith, JA. Struhl, K. eds. 2002; Short protocols in molecular biology John Wiley & Sons, Inc. New York.10-2 to 10-9

10- Beuzon, C. R. and J. Casadesus. 1997; Conserved structure of IS200 elements in Salmonella. Nucleic Acids Res. 25:1355-1361.

11- Fraser.A and T. J. Stamp. 1989; Sheep Husbandry and Disase,. BSP professional Books, England. p. 251

12-Jack.E.J. 1968; *Salmonella abortus ovis* :An atypical salmonella. Veterinary. Record. 82:558-561.

13-Jensen.R. 1974; Disaese of sheep. Lea & Febiger, Philadelpha , p. 57-60.

14-Keyhani, M. 1971; Isolation of *S.abortus ovis* bacteriophage and determination of specificity. Br. Vet J. 125:568-572.

15-Krieg.R.N and Holt, G. J. Bergey's, 1984; Manual of Systematic Bacteriology. William & Wilkins. [1], 428-446..

16.Nikbakht, Gh., Raffatellu, M., Uzzau, S., Tadjbakhsh, H., Rubino S. .2002; IS200 fingerprinting of *S. abortus* ovis strains isolated in Iran, Journal of Epidemiology and Infectious,Vol 128, p.333-336

17-Pardon, P., R. Sanchis, J. Marly, F. Lantier, L. Guilloteau, D. Buzoni-Gatel, I. P. Oswald, M. Pepin, B. Kaeffer, P. Berthon, and M. Y. Popoff. 1990. Experimental ovine salmonellosis (*Salmonella abortus ovis*): Pathogenesis and vaccination. Research. in Microbiology (France.) 141:945-953.

18-Schiaffino, A., C. R. Beuzon, S. Uzzau, G. Leori, P. Cappuccinelli, J. Casadesus, and S. Rubino. 1996; Strain typing with IS200 fingerprints in *Salmonella abortus ovis*. Appl. Environ. Microbiol. 62:2375-2380.

19-Tadjbakhche, H. and A. Gatel. 1972; Epidemiological study of a severe outbreak of ewe abortions due to Salmonella abortusovis in Khorasan, Iran. Archive. of the. Faculty. of Veterinary. Medicine, Tehran. University. , Iran 1:60-64.

20-Travnicek, M., T. Dravecky, J. Balascak, and R. Prochazka. 1986; Bivalent vaccine against *Chlamydia psittaci* and *Salmonella abortus ovis* infection in sheep. Veterinarstvi. 36: 12:548.

21-Uzzau, S., Brown.D.J, T. Wallis, S. Rubino, G. Leori, S. Bernard, J. Casadesus, Platt.D.J, and Olsen.J.E. 2000; Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. Epidemiology and infection 125(2):229-255.