التنميط الحيوي لجرثومة البروسيلا المعزولة من الابقار بأستخدام تقنية تفاعل سلسلة البلمرة نوع تقييد طول الجزء المتعدد الاشكال (RFLP-PCR) في مدينة الديوانية

* أزهار عبدالسادة نعمة
كلية الطب البيطري / جامعة القادسية

عدنان حمد الحمداني
كلية الطب / جامعة القادسية

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية الى توصيف جرثومة البروسيلا المجهضة *Brucella abortus* في الابقارعلى المستوى الجزيئي بعد عزلها وتشخيصها مظهرياً ومصلياً بأستخدام تضخيم البادئات الخاصة بالجين *omp2a* المشفر لبروتينات الغشاء الخارجي للجرثومة بتقنية تفاعل سلسلة البلمرة نوع RFLP– PCR. جمع 105 نموذج من دم الابقار المشكوك بأصابتها سريرياً بداء البروسيلا المجهضة للمدة من تشرين الثاني / 2011 ولغاية ايار / 2012 من حظائر حيوانية في مناطق مختلفة في مدينة الديوانية. حضر مصل الدم (Serum) لأجراء الفحوصات المختبرية والتي تضمنت الأختبارات المصلية (اختبارالروزبنكال Rose Bengal test واختبار التلازن الانبوبي Tube agglutination test) ثم عزل جرثومة البروسيلا في اوساط زرعية انتقائية مثل وسط اكار البروسيلا والتي تم تاكيد تشخيصها جزيئياً باستخدام تقنية تفاعل سلسلة البلمرة التقليدي PCR باستخدام البادئ *OMP2a*، بعدها استخدمت تقنية تفاعل سلسلة البلمرة نوع تقييد طول الجزء المتعدد الاشكال (RFLP–PCR) لتحديد النوع والانماط الحيوية للعزلات المشخصة باستخدام انزيم القطع *PSTI* لنواتج تضخيم الجين *omp2a*. اما نتائج العزل الجرثومي على وسط اكار البروسيلا الانتقائي فكانت18/15 (83.3%) . اظهرت نتائج تفاعل سلسلة البلمرة التقليدي (Classical PCR) كفحص توكيدي لجرثومة البروسيلا بعد استخلاص ال DNA (Extraction) من العزلات وتضخيمه (Amplification) باستخدام بادئات نوعية للجرثومة متمثلة بالجين *omp2a* [1]ظهور حزمة مفردة المرحلة كهربائياُ على هلام الاكاروز تمثل ناتج ال DNA المضخم (Amplified DNA) ذو حجم جزيئي (1100) زوجاً قاعدياً وكانت نسبة الكشف عن تواجد الجرثومة بهذه التقنية (12.3%) 15/13 . اظهرت نتائج تفاعل سلسلة البلمرة نوع تقييد طول الجزء المتعدد الاشكال(RFLP– PCR) للتمييز بين الانواع والانماط الحيوية للبروسيلا ظهور حزمتين متميزتين المرحله كهربائياُ على هلام الاكاروز ذات حجم جزيئي 200 و550 زوجاً قاعدياً تعودان الى نوعين من البروسيلا هما *B.melitensis* ذات الانماط الحيوية (biovars 1,3) و *B. abortus* ذات الانماط الحيوية (biovars 3, 5, 6 ,9) على التوالي .

* **بحث مستل من اطروحة الباحث الاول**

المقدمة

يعد داء البروسيلات في الابقار Bovine Brucellosis واحد من أهم الأمراض المعدية والذي يسبب مشاكل كثيرة في مناطق عديدة من العالم ولاسيما في جنوب وشرق أسيا والمناطق المطلة على البحر الأبيض المتوسط والخليج العربي فضلاً عن دول عديدة في العالم ، وبالرغم من ان دول شمال ووسط أوربا وكندا واليابان واستراليا ونيوزلندا تمكنت أخيراً من السيطرة على انتشار هذا المرض وأصبحت خالية منه (1) . يحدث المرض بسبب الاصابة بجراثيم من نوع البروسيلا المجهضة *Brucella abortus* وهي عصيات مكورة (Coccobacilli) , اختيارية المعيشة داخل الخلايا (Facultative intracellular bacteria) وان هذا المرض مرتبط بالبلوغ الجنسي والحمل ،حيث يحصل الإجهاض لإناث الحيوانات المصابة في النصف الثاني من الحمل ، فضلاً عن التهاب الخصية والمفاصل في الذكور والعقم المؤقت أو الدائم في الذكور والإناث (2,3) . وتوجد ثمانية انماط حيوية (Biovars) للبروسيلا المجهضة *B. abortus*, اذ ان جميعها تصيب الابقار إلا ان النمط الحيوي الأول (1 biovar) غالباً ما يعزل من الأبقار (4,5,6) واما *B. suis* فإن الانماط الحيوية الأولى والثالثة (1,3 biovars) قادرة على إصابة الأبقار بشكل جزئي بالرغم من ان الإصابة عادةً لا ترتبط مع العلامات السريرية (7), و ل *B. Melitensis* و *B.suis* تصيب الأبقار بالتداخل مع التشخيص المصلي للإصابة بالبروسيلا المجهضة 8) (. وعادةً يكون حدوث ثورات لداء البروسيلا في الأبقار مرتبط مع حدوث الإجهاض أثناء فترة الحمل الأخيرة وإنتاج عجول حديثة الولادة ضعيفة وحدوث العقم في إناث الأبقار (9) . وتعد الفحوصات الجزيئية الحديثة المستخدمة مثل تقنية تفاعل سلسلة البلمرة في تشخيص البروسيلا ذات اهمية كبيرة لكافة المختصين في هذا المجال من حيث امكانية استخدامها في كشف حالات الاصابة بداء البروسيلا وذلك لكونها تتصف بكفاءة عالية في التشخيص ونتائجها توكيدية ، اذ تعطي تقنية تفاعل سلسلة البلمرة – تقييد طول الجزء المتعدد الاشكال (RFLP-PCR) دليلاً عن تعدد الاشكال (Polymorphisms) في عدد من الجينات مثل جينات *omp2* و *dnak* و*htr* و *ery* ، وتعد الجينات المشفرة لبروتينات الغشاء الخارجي (OMPs) لانواع البروسيلا أولى الجينات التي شخصت في بداية الثمانينات, ولاهمية هذه الجراثيم في احداث الاجهاض في الابقار وبشكل وبائي مما يؤدي الى حدوث خسائر اقتصادية كبيرة ولوجود تشابه كبير بالصفات المظهرية والزرعية للاجناس الموجودة ضمن عائلة Brucellacease ، فضلاً عن وجود تشابة كبير بين بعض الانماط الحيوية *Brucella abortus* bvs. 3,5,6,9 والنوع *B.melitensis* bvs. 1,3 عند تضخيم الجين *omp2a* ولندرة الدراسات المتعلقة باستخدام التقنيات الحديثة الجزيئية في تشخيص جرثومة البروسيلا تبلورت فكرة الدراسة لاستخدام الطرائق الجزيئية Molecular) (methods لتوصيفها بشكل دقيق وتحديد النوع (species) والنمط الحيوي (biovars) لجرثومة البروسيلا اعتماداً على تضخيم احد البادئات النوعية) (specific primers التي تشفر لتتابع جيني معين ضمن جينيوم البروسيلا ، فقد هدفت الدراسة الحالية الى عزل توصيف جرثومة البروسيلا المعزولة من عينات دم اناث الابقار مظهرياً بعد اثبات وجودها باستخدام بعض الاختبارات المسحية (المصلية) ثم التمييز بين النوع والنمط الحيوي (biovars) للجرثومة بأستخدام تقنية تفاعل سلسلة البلمرة التقليدي (Classical PCR) ونوع تقييد طول الجزء المتعدد الاشكال RFLP-PCR في مدينة الديوانية .

المواد وطرائق العمل

- **جمع العينات**

جمعت 105عينات دم وبصورة عشوائية من اناث الأبقار للمدة منتشرين الثاني /2011 حتى ايار /2012 من مناطق مختلفة في مدينة الديوانية ،وبأعمار مختلفة تراوحت مابين 2 سنة الى اكثر من 6 سنة ، تم سحب (5مل) دم من الوريد الوداجي في الابقار بأستخدام محاقن معقمه بأستعمال أنابيب مفرغة من الهواء ثم نقلت العينات الى المختبر بأسرع وقت ممكن في حاويات تحتوي على الثلج . لغرض اجراء اختبار الروزبنكال وبعدها تم وضع عينات الدم التي اعطيت نتائج موجبة للروزبنكال في أنابيب زجاجية معقمه لتكون جاهزة للأستنبات في الاوساط الزرعية الخاصة بالبروسيلا .

العزل والتشخيص الجرثومي

تم زرع نماذج الدم في انابيب حاوية على 5 مللتر من مرق نقيع القلب والدماغ ووضعت في الحاضنة بدرجة حرارة 37 مئوية لمدة ثلاثة ايام , ثم اجريت زراعات ثانوية بمعدل مرتين اسبوعياً ولمدة ثلاثة اشهر , على وسط اكار البروسيلا Brucella agar بمعدل طبقين لكل عينة اظهرت نمواً جرثومياً في وسط مرق نقيع القلب والدماغ ثم حضنت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة 37 م^5 ولمدة 2-3 ايام (11, 10) .

اعتمدت الصفات الزرعية للمستعمرات النامية على الأوساط الزرعية مثل شكل وحجم ولون المستعمرات النامية فضلاً عن فحص المسحات المحضرة من مستعمرات المزارع النقية للعينات لغرض التعرف الى الجراثيم المعزولة فقد تم نقل جزء من المستعمرات الى شريحتين زجاجيتين ثم تصبيغها بصبغة كرام وفحصت تحت العدسة الزيتية للتحّري عن شكل و ترتيب الخلايا (11).لغرض اجراء الاختبارات الكيموحيوية أخذ جزء من المستعمرة النامية وزرعت على وسط مرق نقيع القلب والدماغ وتحضن بدرجة حرارة 37م ولمدة ثلاثة ايام ثم اجريت الاختبارات الاتية (أختبارالأوكسيديز (Oxidase test) و أختبار الكاتاليز (Catalase test) و أختبار ألأنزيم المحلل لليوريا (Urease test) و أختبار انتاج كبريتيد الهيدروجين (Hydrogen sulfide production test))

تفاعل سلسلة البلمرة التقليدي نوع تقييد طول الجزء المتعدد الاشكال

أجري فحص تفاعل سلسلة البلمرة التقليدي لتوكيد تشخيص جرثومة *Brucella* المعزولة من الأبقار والمشخصة بالطرق الزرعية والكيموحيوية والمصلية بإستخدام بادئات ال DNA للجين *OMP2* بينما استخدم RFLP-PCR في التنميط الحيوي (biovars) لجرثومة البروسيلا , اجري الفحص بالخطوات الاتية :

– استخلاص الحمض النووي (DNA)من جراثيم ال *Brucella* وذلك بأستخدام العدة الجاهزة وحسب تعليمات الشركة المجهزة (Primer design /uk) .

2 –حضر مزيج تفاعل سلسلة البلمرة بأستخدام عدة ال(PCR Pre Mix) وحسب تعليمات الشركة المجهزة (Kapa 2G Robust Hotstart /USA) وبالمكونات الاتية (جدول 1)

الجدول(1) مكونات وحجوم مزيج تفاعل سلسلة البلمرة (PCR pre mix)

الحجم (مايكروليتر) Volume	مزيج تفاعل سلسلة البلمرة PCR master mix	
2.5µL	DNA template	
1.25µL	Forward primer	البادئات Primers
1.25µL	Reversed primer	
7.5 µL	PCR water	
12.5 µL	Kapa 2G Robust Hotstart	
25µL	Total Volume	

3-نقلت الأنابيب الحاوية على مزرع تفاعل سلسلة البلمرة بعد مزجها بعناية بجهاز المازج vortex لمدة 5 ثوان الى جهاز المضخم الحراري Thermocycler لتفاعل السلسلة المتبلمرة لأجراء عملية تضخيم ال DNA (DNA Amplication) على وفق الظروف المثلى للدورات الحرارية Thermocycling conditions لجرثومة البروسيلا المجهضة والمتمثلة بعمليات فصل شريط ال DNA (Denaturation) وارتباط البادئات مع الشريط المنفصل (Annealing) وتطويل سلسلة الDNA (Extension) وحسب الجدول (2)

الجدول (2) الظروف المثلى لتضخيم DNA بواسطة المضخم الحراري حسب نوع البادئ Primer النوعي لجرثومة البروسيلا

عدد الدورات Number of cycles	الزمن Time	درجة الحرارة Temperature(مْ)	الخطوات (Steps)
1	1-3min	95	Initial Denaturation
35	10-15sec	95	Denaturation
	10-15sec	60	Primer Annealing
	10-15 sec	72	Extension
1	0-10min	72	Final extension
1	HOLD	4-10	Cooling

4 – تم أجراء الترحيل الكهربائي لهلام الأكاروز المحضر بنسبة 1.5% تحت فرق جهد 100فولت وتيار 80 امبير وزمن ساعة لغرض الكشف عن حزم (Bands) الDNA المستخلص والDNA المضخم والذي يمثل نواتج التضخيم(Amplicon) او نواتج ال (PCR Products) PCR وحسب طريقة (12). بعد انتهاء عملية الترحيل تم فحص الهلام الحاوي على نواتج ال (PCR)بأستخدام مصدر الأشعة فوق البنفسجية U.V (Transilluminator) للتحري عن وجود الDNA.

5 – أجري تفاعل سلسلة البلمرة نوع تقييد طول الجزء المتعدد الاشكال (RFLP –PCR) حسب طريقة (13) لنواتج PCR باستخدام انزيم القطع endonuclease Restriction نوع *PST*I وفق الجدول (3)

الجدول (3) مكونات وحجوم مزيج نوع تقييد طول الجزء المتعدد الاشكال (RFLP)

المادة	الحجم Volum(مايكروليتر)
PCR reaction mixture-1	10 µL (~0.1-0.5 mg) of DNA
Water nuclease free-2	16 µL
10 X recommended buffer for -3 restriction enzyme	2µL
Restriction enzyme-4	2 µL (10-20)
الحجم الكلي (Total)	30 µL

التحليل الاحصائي

حللت النتائج احصائياً لمعرفة النسب المئوية للحساسية (Sensitivity) والخصوصية (Specificity) للاختبارات المستخدمة بتطبيق المعادلتين التاليتين: (14)

.

الخصوصية (%) = b+d/ d 100 X

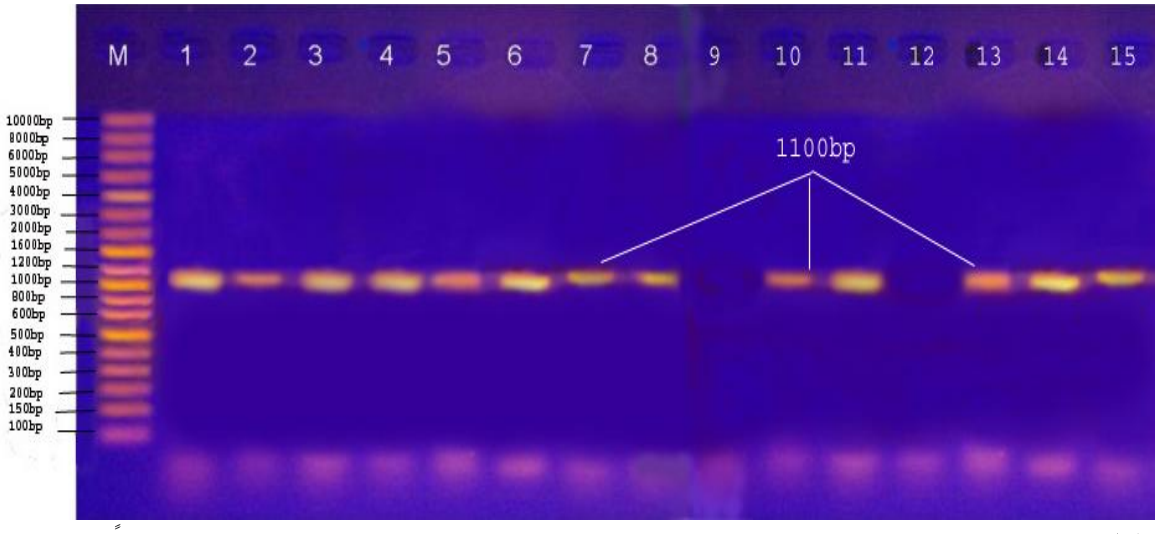
الحساسية (%) = c+a/ a 100 X

النتائج والمناقشة

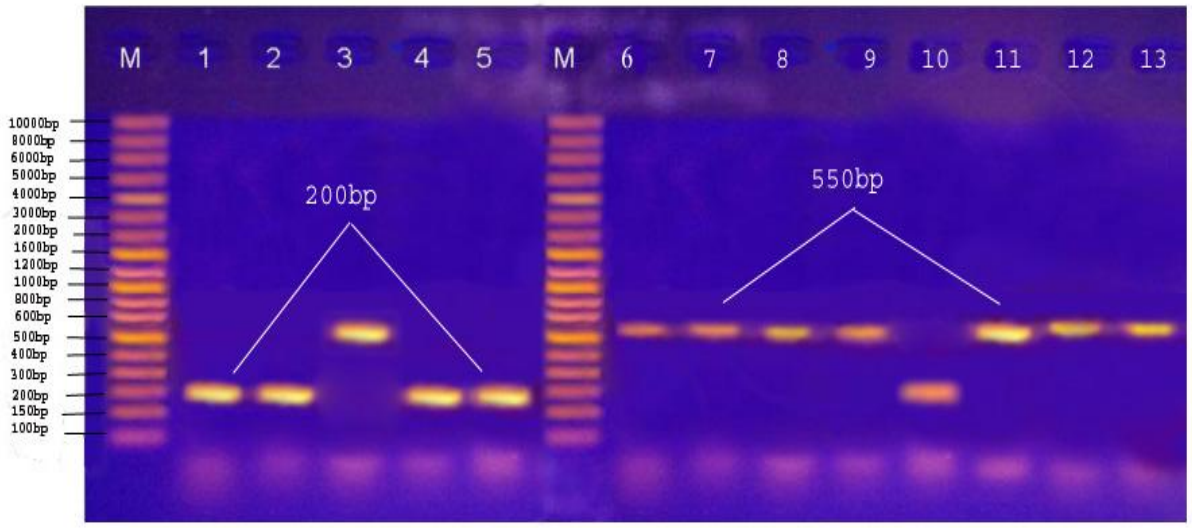
اشارت نتائج العزل الجرثومي لجرثومة البروسيلا الى ان نسبة العزل في الابقار للنماذج المفحوصة كانت عالية (83.3%) مقارنةً بالدراسات الاخرى , إذ اشارت (15)الى ان نسبة انتشار المرض في الابقار في مدينة بغداد كانت (6.85 %) , في حين اشار(16)الى ان نسبة العزل الجرثومي للجرثومة (12.25 %) . وقد أعزى سبب هذا الاختلاف في نسبة العزل الى انعدام الخطط للسيطرة على المرض و استئصاله وبالتالي ارتفاع نسبة الاصابات في المناطق الموبوءة وانتقاله الى المناطق المجاورة السليمة والمناطق الاخرى بسبب اختلاط القطعان المجاورة اثناء مدة التلقيحات او لبيع الذكور المصابة

من المربين لقلة وعيهم بخطورة المرض وشراءها من الاخرين لاغراض التربية وبالتالي ارتفاع عامل الخطورة لاصابة الاشخاص من خلال تلامس مع الحيوانات المصابة .اظهرت نتائج تفاعل السلسلة المتبلمرة

(PCR) للعزلات الجرثومية المشخصة مظهرياً وزرعياً للبروسيلا *Brucella Spp.* والبالغ عددها (15) عزلة من الابقار وبعد استخلاص ال DNA بأستخدام العدة المستخدمة لهذا الغرض وترحيله كهربائياً في هلام الاكاروز (1.5 %) والكشف عنه باستخدام صبغة الاثيديوم بروماید وفحصه تحت الاشعة فوق البنفسجية (UV) , احتواء جميع العزلات على حزمة واحدة ومفردة لل DNA وهذا يدلل على كفاءة طريقة الاستخلاص المستخدم في هذه الدراسة وعدم حدوث اي تلوث خلال هذه العملية .إذ اظهرت نتائج تضخيم البادئات النوعية (specific primers) والمتمثلة بالجين *(omp2a)* المشفر لبروتينات الغشاء الخارجي لجرثومة البروسيلا *Brucella Spp.* ذو حجم جزيئي(1100) زوجاً قاعدياً (شكل 1) , اذ تم حساب ال DNA المضخم من خلال اجراء الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز) (2 % و مقارنته مع الحجم الجزيئي للسلم القياسي (marker 100–10000) زوجاً قاعدياً.ولقد اشار (17,18,19) ان تقنية PCR تعطي نتيجة موجبة اكثر عند مقارنتها مع الزرع الجرثومي .أظهرت نتائج القطع الانزيمي لنواتج تضخيم PCR للبادئات (Primers) المتمثلة بالجين *(omp2a)* لجرثومة البروسيلا في الابقار بواسطة استخدام انزيم القطع *(PSTI endonuclease)* ظهور حزمتين منفردة ذو حجم جزيئي (550،200) زوجاً قاعدياً لنولت جال PCR في الخطوات السابقة من خلال مقارنته بالحجم الجزيئي للسلم القياسي, اذ تمثل الحزم ذات الحجم الجزيئي 200 زوج قاعدي والتي اظهرت ب5 عزلات تعود للنوع *B.melitensis* ذات الانماط الحيوية 1 و3 , اما الحزم ذات الحجم الجزيئي 550 زوج قاعدي وظهرت ب 8عزلات تعود للنوع *B.abortus* ذات الانماط 3 و 5 و 6 و 9 . اذ ان تحليل خارطة القطع للانزيم *PSTI* للمواقع متعددة الاشكال في الجين *omp2a* في جرثومة البروسيلا يمكن ان يميز بين الانواع والسلالات (20) (الشكل 2)



الشكل(1) نواتج تضخيم الجين *omp2a* النوعي لجرثومة البروسيلا المعزولة من الابقار والمرحلة كهربائياً على هلام الاكاروز (2 %) والمصبوغة بصبغة الاثيديوم بروماید وفحصة تحت الاشعة فوق البنفسجية وفولتية (80) لمدة ساعة, العمود M يمثل (DNA ladder) والاعمدة من (8–1 و 10 و 11 و15–13) العينات الموجبة لفحص (1100) زوجاً قاعديا اما الاعمدة (9 و 12) تمثل العينات السالبة (عدم ظهور حزمة) .



شكل (2) نواتج القطع لنواتج PCR المضخم من منطقة (1100bp) لجين *omp2a* لجرثومة البروسيلا , الاعمدة (1,2,4,5,10) تمثل العينات الموجبة لفحص(200) زوجاً قاعدياً العائدة للنوع *B.melitensis* ذات الانماط الحيوية 1 و3 , اما الاعمدة (12,13 ,11 ,6,7,8,9 , 3) تمثل العينات الموجبة لفحص (550) زوجاً قاعدياً تعود للنوع *B.abortus* ذات الانماط الحيوية 3 و 5 و 6 و 9 ،المعزولة من الابقار باستخدام انزيم القطع *PstI* والمرحلة كهربائياً على هلام الاكاروز (2%) وفولتية 80 لمدة ساعة , العمود M يمثل (DNA Ladder).

- **النسب المئوية للحساسية والخصوصية للزرع الجرثومي وتقنية تفاعل السلسلة المتبلمرة**

يوضح الجدول (3) النسب المئوية للحساسية (Sensitivity) والخصوصية (Specificity) لتقنية تفاعل السلسلة المتبلمرة بالمقارنة مع الزرع الجرثومي للبروسيلا ، حيث اعطت 13عينة فقط نتيجة موجبة لتقنية تفاعل السلسلة المتبلمرة وبنسبة (12.3%) ، وإذ اعطت 15 عينة نتيجة موجبة للزرع الجرثومي وبنسبة (14.2%)، وكانت نسبة الحساسية والخصوصية (86.6%) و (100%) على التوالي وهذا يدل على انه هناك عزلتين ظهرت في العزل الجرثومي على انها تعود للبروسيلا بينما لم تظهر عند تشخيصها بـــــــــPCR وكان هذا واضحاً عند قياس الخصوصية إذ كانت 100% مقارنة بالعزل الجرثومي .في حين اشار (21). بان الحساسية والخصوصية ل PCR عند مقارنتها مع الزرع الجرثومي هي (97.4% و100%) على التوالي وهذا جاء متوافق مع نتائج الدراسة الحالية .

الجدول (3) النسب المئوية للحساسية والخصوصية للزرع الجرثومي و تقنية تفاعل السلسلة المتبلمرة

الاختبار		الزرع الجرثومي		المجموع	الحساسية	الخصوصية
		+	−			
(اختبار المقارن PCR)	+	(a) 13	(b) 0	13	86.6%	100%
	−	(c) 2	(d) 90	92		
المجموع		15	90	105		

المصادر

1. OIE Manual (2004). Bovine Brucellosis In: manual of standards for Diagnostic test and vaccine. OIE.
2. Akinci, E.; KamilGol, M. and Balbay, Y. (2001). A case of prostheticMitral valve endocarditis caused by *Brucella abortus*. S.C and J.Infect. Dis., 33:71-72.
3. Foster, G.;Osterman, B.S.;Godfroid, J.; Jacques, I.&Cloeckaert,A. (2007). *Brucella* ceti sp. Nov. and *Brucella* pinnipedialissp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 57: 2688–2693.
4. Renukaradhya, G.J.;Isloor, S .and Rajasekhar, M. (2002). Epidemiology, zoonotic aspects, vaccination and control/eradication of brucellosis in India. Veterinary Microbiology, 90:183–195.
5. Bricker, B.J.;Ewalt, D.R.&Halling, S.M. (2003). *Brucella*'HOOF-Prints': strain typing by multi-locus analysis of variable number tandem repeats (VNTRs). BMC Microbiology, 3- 15.
6. Lucero, N.E.; Ayala, S.M.; Escobar, G.I.; Jacob, N.R. (2008).*Brucella* isolated in humans and animals in Latin Americafrom 1968 to 2006. Epidemiology and Infection 136: 496–503.
7. Ewalt, D.R.;Payeur, J.B.;Rhyan, J.C.&Geer, P.L. (1997). *Brucella* Suis biovar 1 in naturally infected cattle: a bacteriological,serological and histological study. Journal of VeterinaryDiagnostic Investigation, 9: 417–420.
8. Rogers, R.J.; Cook, D.R.;Kettlerer, P.J.;Baldock, F.C.;Blachall, P.J.and Stewart, S.W. (1989). An Evaluation of three serological tests for antibody to *Brucella* suis in pigs.Australian Veterinary Journal, 66: 77–80.
9. Schlafer, D.H.& Miller, R.B. (2007). Female genital system. In: Maxie,M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals, Vol.3. Elsevier, Saunders, Philadelphia,USA, Pp: 429–564.
10. Alton, G. G.; L. M. Jones; R. D. Angus; and J. M. Verger. (1988). Techniquesfor the brucellosis laboratory. Institut National deLa Recherche Agronomique, Paris, France .
11. Quinn, P. J.; M.E. Carter; B. Markey and G.R. Carter(1994).Clinical

Veterinary Microbiology. Pp:261-267, Wolfe publishing,London.

12. Sambrook, J.; Fritsh, E.F., and Maniatis (1989). Molecular cloning Laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory.
13. Sambrook, J. ;Maniatis,T.and Fritsch, E.F.(2001). Molecular Cloning: a Laboratory Manual . cold Spring Harbor Laboratory press , cold Spring Harbor , NY, 3rd ed .
14. Niazi, A.D. (2000). Statistical Analysis in medical research. Republic of Iraq. Al- Nehrien University. Pp:148.
15. Al-Thwyni, A.; Al-Bayatti, S.;Abass, A. and Abdul–hussin ,T.(2000). A study in the epidemiological of brucellosis in some production animals in the province of Baghdad.The Veterinarian. 10(1) : 168-174.
16. Kanani , A.N.(2007).Serological, cultural and Molecular detection of*Brucella* infection in breeding bulls. Ph .D. Thesis , college of Veterinary medicine , ANAND AGRICULTURAL university, Microbiology.
17. Guarino, A.; Serpe, L.; Fusco, G.; Scaramuzzo, A. and Gallo, P. (2000). Detection of *Brucella* pecies in buffalo whole blood by gene-specific PCR. Veterinary Record. 147: 634-636.
18. Leal-Klevezas, D. S.; Martinez, V. I. O.; Garcia, C. J.; Lopez, M. A. and Martinez, S. J. P.(2000). Use of polymerase chain reaction to detect *Brucella abortus* biovar 1 in Infected goats.Vet. Microbiol.,75: 91-97.
19. Amin, A. S.; Hamdy, M. E. and Ibrahim, A. K. (2001). Detection of *Brucella melitensis* in semen using the polymerase chain reaction assay. Vet. Microbiol.,83: 37-44.
20. Bardenstein, S.,Mandelboim , M., Ficht , T.A.,Baum, M. &Banai, M. (2002). Identification of the Brucella melitensis vaccine strain Rev.1 in animals and humans in Israel by PCR analysis of the *pst1* site polymorphism of its *omp2* gene. J. Clin. Microbiol.40:1475-1480.
21. Leyla, G.; Kadri, G. and Umran, O. (2003). Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. Vet. Microbiol .93: 53-61.

Biovar of *Brucella* isolated from cows by using Restriction fragment Length Polymorphism –Polymerase Chain Reaction in AL-Diwaniya City

*A. N. AL-Naiyli
Coll.of Vet. Med. / Univ.of Al-Qadisiya

A. H. Al-Hamadani
Coll.of Med. / Univ.of Al-Qadisiya

Abstract

The current study was aimed to characterize the *Brucella abortus* in cows at molecular level after isolation and identification morphologically and serology by using the amplification of specific primers of ***omp2a*** gene that encodes to proteins of outer membrane of *Brucella* by using a technique of Restriction Fragment Length Polymorphism – Polymerase Chain Reaction (RFLP- PCR) . A Total of 105 samples were collected from cow blood that clinically suspected with brucellosis for the period of November /2011 to May / 2012 from animal shelters in different areas of AL-Diwaniya city . Blood sera were prepared to conduct the Laboratory tests which included the serological tests (Rose Bengal (RBT) and Tube Agglutination (TAT)) ,then the *Brucella* was isolated on selective media such as *Brucella* agar media which confirmed molecularly by using classical Polymerase Chain Reaction to amplify the primers of ***omp2a*** gene and finlly the technique of RFLP- PCR was used to determine the species and biovars of ***Brucella*** after using the restriction endonuclease ***(PSTI)*** for Amplification products of ***omp2a*** gene . the results of *Brucella* isolation On *Brucella* agar was 15/18(83.3%), Results of classical Polymerase Chain Reaction (PCR) as confirming test for *Brucella* isolates after extraction of DNA and amplification of primers belong to ***omp2a*** gene showed the appearance of single band on agarose gel represented the DNA amplified (amplicon) with molecular size (1100 bp) , and the percent of *Brucella* detection by this technique was 13/15(12.3%) .The results of (RFLP-PCR) for differention among species and biovars of *Brucella* revealed the appearance of two distinct band on agarose gel that had a molecular sizes (200 and 550 bp) which belong to ***B.melitensis*** biovars 1,3 and ***B.abortus*** biovars 3,5,6,9 , respectively .