J. Agric. Chemistry and Biotechnology, Mansoura Univ., Vol. (7):401- 408, 2010

EVALUATION OF PCR FOR THE DIAGNOSIS OF BOVINE BRUCELLOSIS IN MILK SAMPLES IN SOME AREAS IN DAMASCUS COUNTRYSIDE

Al-Ashkar, Buthaina [1*], A. Al-Mariri[2] and Ibtissam Hamad[3]

[1] Biology Dept., Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

[2] Department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission, P.O. Box 6091, Damascus, Syria.

[3] Dean, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

مقارنة طرائق مختلفة من الاستنبات الدموي للعزل البكتيري للبروسيلا الضأنية

بثينة الأشقر[١]، أيمن المريري[٢] و ابتسام حمد.[٣]

[١]قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة دمشق.

[٢]قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية السورية، ص.ب. ٦٠٩١، دمشق، سورية.

[٣]عميد كلية العلوم - قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة دمشق.

الملخص

تشير الخصائص الجزيئية والكيموحيوية غالباً ما تشير إلى معطيات تمكننا من تشخيص الميكروبات. يحتوي جنس البروسيلا مجموعة أنواع متماثلة مورثياً فيما بينها، إضافة إلى أن المخابر الطبية التي تعتمد على الاختبارات المصلية والخصائص الشكلية لتمييز البروسيلا تواجه مشاكل تشخيصية عديدة (كانخفاض النوعية والحساسية). لذا تهدف الدراسة الحالية إلى تطوير تقنية (الـ PCR) تفاعل البلمرة المتكرر للتشخيص النوعي والسريع نسبياً لبروسيلا المتواجدة في حليب الأبقار المصابة.

جدير بالذكر أن ناتج تفاعل البلمرة المتكرر يسمح لنا بتمييز البروسيلا عن بكتيريا سالبة غرام أخرى مثل (Yersinia enterocolitica O:9, E. coli O:157, ...).

تم دراسة ١٠٠ عينة من حليب الأبقار للكشف عن إصابتها بالبروسيلا باستخدام الاختبارات المصلية والعزل البكتيري (باستخدام البيئات الانتقائية). كانت حساسية تفاعل البلمرةالمتكرر الـ PCR 95.5% في الكشف عن الحيوانات المصابة بالبروسيلا، بينما كانت نوعية اختبار الحلقة الحليبي 78%. بما أن تقنية الـ PCR لا تستغرق سوى يوم واحد، من الممكن أن تكون طريقة عيارية، كما أنها تقنية تجنب العاملين في مخابر البكتيريا الإصابة بالبروسيلا، لذا يمكن أن نستخدمها في تشخيص بروسيلا الأبقار. ومن توصى الدراسة الحالية لاستخدام هذه التقنية للكشف عن الإصابة بالبروسيلا عند حيوانات أخرى مثل (ألأغنام ، والماعز).

المقدمة

البروسيلا بكتيريا اختيارية داخل خلوية سالبة الغرام، بإمكانها خمج أنواع عديدة من الحيوانات والبشر. تم تمييز ستة أنواع من البروسيلا: البروسيلا المجهضة B . abortus، البروسيلا الضأنية B. melitensis، البروسيلا الخنازيرية B. suis، البروسيلا الكلبية B. canis، البروسيلا الماعزية B. ovis، و الـ B. neotomae. يعتمد هذا التصنيف بشكل أساسي على الاختلاف في القدرة الامراضية وعلى المضيف المفضل لهذه الأنواع (Corbel and Brinley-Morgan, 1976; Corbel, 1997). لقد تم تمييز أنواع البروسيلا وتحت أنواعها المختلفة بواسطة اختبارات تمييزية تعتمد على التنميط المصلي Sero-typing، والحساسية للصبغات Dye sensitivity، ومتطلبات الـ CO_2، وإنتاج الـ H_2S ومزايا الإستقلاب. الأنواع الرئيسية الأكثر إمراضية والمنتشرة على نطاق واسع هي: البروسيلا المجهضة المسببة

* **Correspondance: buthaina@tigerproduction.net, Fax:11 6115433, Damascus P.O.Box :31044**

لداء البروسيلات البقرية Bovine brucellosis والبروسيلا الضأنية، التي تمثل الوسيط الرئيسي المسبب لداء البروسيلات عند الأغنام والماعز، والبروسيلا الخنازيرية المسببة لداء البروسيلات عند الخنزير Swine (Boschiroli *et al.*, 2001). كما أن هذه الأنواع الثلاثة هي المسببة لمرض الحمى المالطية عند البشر. إن هذه الأنواع الثلاثة هي سلالات ملساء حاملة لمتعدد السكاريد الليبيدي الأملس Smooth-Lipopolysaccharide كمستضد سطحي رئيسي، بينما تعتبر البروسيلا الماعزية والكلبية سلالات خشنة طبيعياً Rough-Lipopolysaccharide ووحدها البروسيلا الكلبية ممرضة للإنسان (Challoner *et al.*,1990; Nicoletti, 1980). وهناك سلالات أخرى لم يتم تُصنَّفها حتى الآن تم عزلها من الثدييات البحرية (Boschiroli *et al.*, 2001).

من المعروف إن الأعراض السريرية للحمى المالطية غير نوعية وتتضمن الحمى fever، والتعرق sweat، وقلة الشهية anorexia، والوهن fatigue، والتوعك malaise، ونقص (فقدان) الوزن weight loss، وأحياناً الكآبة depression (Smith and Ficht, 1990). وقد تتطور متلازمة داء البروسيلات لدى بعض المرضى في حال عدم وجود معالجة مناسبة لتصيب الجهاز الكبدي الصفراوي Localized hepatobiliary، أو الجهاز الحركي (العظمي المفصلي) steoarticular، أو الجهاز التنفسي أو العصبي pulmonary and nervous systems؛ وقد يصاب المريض بما يسمى بمتلازمة التعب المزمن chronic fatigue syndrome (Young, 1995; Challoner *et al.*, 1990).

يتضمن علاج مرض الحمى المالطية استخدام مضادات حيوية قادرة على اختراق البالعات الضخمة وعلى تحمل البيئة الحامضية ضمن الخلوية. ومن الضروري إتباع أسلوب العلاج المشترك، حيث يشهد العلاج بدواء واحد حالات نكس مرتفعة عادةً (Zvizdic *et al.*, 2006). ويجب أن يحدد الطبيب قبل البدء بالمعالجة مايلي: الفترة القصوى للعلاج، تكلفة المعالجة، الحميات الغذائية المنظمة التي يجب إتباعها، أفضل أنواع التوعية الطبية والحركية، مع الانتباه إلى التأثيرات السمية الخاصة باستخدام كل دواء (Bayindir *et al.*, 2003).

حددت منظمة الصحة العالمية في العام ١٩٨٦ الخطط العلاجية لأدواء الحمى المالطية عند الإنسان والتي تعتمد على استخدام الدوكسي سكلين doxycycline لمدة ستة أسابيع مع إما الستربتومايسين streptomycin لمدة أسبوعين أو ثلاثة أسابيع، أو الريفامبيسين rifampin لمدة ستة أسابيع (Solera *et al.*, 1995; Ariza *et al.*, 1992; Yunik and Dundar, 2005). ولأن الريفامبيسين يملك القدرة على تنظيم مستويات الدوكسي سكلين المصلية فإنه يملك فعالية أكبر من الستربتومايسين في الحماية من حدوث النكس. يتطلب الحقن العضلي للستربتومايسين الدخول للمشفى لضرورة وجود رعاية صحية كافية، والتي غالباً ما تكون مفقودة في أماكن استيطان المرض (في بلدان العالم الثالث) (Ersoy *et al.*, 2005). ومن جهة أخرى، فإن استخدام الريفامبيسين في مناطق استيطان الحمى المالطية والسل يؤدي لظهور سلالات بكتيرية مقاومة لهذا الصاد الحيوي (Kwassi *et al.*, 2005). لذلك يفضل البعض استخدم نظام علاجي بديل يتمثل بمشاركة الجنتاميسين مع الدوكسي سكلين (Solera *et al.*, 1997; Hasanjani *et al.*, 2006). كما ويعتبر اشراك الـ Trimethoprim-sulfamethoxazol فيما يسمى نظام العلاج الثلاثي ضرورياً للقضاء على البروسيلا ولا سيما عند الأطفال والنساء الحوامل (Giannakopoulos *et al.*, 2006; Roushan *et al.*, 2004; Ozbay and Inanmis, 2006). أعطى استخدام الكينولونات مثل الـ ciprofloxacin and ofloxacin نتائج مشجعة في القضاء على البروسيلا (Karabay *et al.*, 2004; Alp *et al.*, 2006; Akova *et al.*, 1993).

مما ذُكر أعلاه يُلاحظ أهمية استئصال البروسيلا من قطعان الحيوانات الهامة اقتصادياً، لأنها الخطوة الأساسية للقضاء على مرض الحمى المالطية لدى البشر. وبما أن التحري عن البروسيلا لدى الحيوانات يعتمد على الطرائق المصلية واختبار الحلقة الحليبي، ولكن للأسف نوعية وحساسية هذه التفاعلات لا تتجاوز ٨٠-٨٥%، لذا كان الهدف من دراستنا هو اختبار حساسية ونوعية تقنية تفاعل البلمرة المتكرر الـ (PCR) في الكشف عن البروسيلا في عينات الحليب.

الطرائق

١- الاستنبات البكتيري Bacteriological methods:

حصلنا على البروسيلا الضأنية من مخابر الميكروبيولوجيا والمناعيات في هيئة الطاقة الذرية السورية، والتي أستنبتت بدرجة٣٧° مئوية، على وسط الاستنبات الصلب الآتي 2YTA:

آغار (٢٠ g)، ببتون (١٠ g)، كلوريد الصوديوم Nacl (٥ g)، خلاصة الخميرة (٥ g)، ماء مقطر(١ L)؛ مضافاً إليه ٥% من المصل الحصاني hours serum وبدون آغار لوسط الاستنبات السائل 2YT.
تم الحصول على السلالة العيارية المستخدمة من معمل البروفيسور جان جاك لوتسون بلجيكا

٢. الدراسة المورفولوجية للبكتيريا المعزولة:

١.٢ الدراسة العينية للمستعمرات: تكون مستعمرات البروسيلا مرئية بشكل عام بعد ١-٢ يوماً من الحضن، يمكن ملاحظة ذلك بالعين المجردة أو بمساعدة مكبرة بتكبير ضعيف ١٠x 20x بوجود ضوء عاكس.

٢.٢ الدراسة المجهرية المباشرة: أُخذت مستعمرة معزولة ووُضعت على قطرة من موقي الـ PBS الموجود على الصفيحة الزجاجية، ثم دُرس المعلق بفضل المجهر العادي بتكبير x400.

٣. تفاعلات التراص:

تتفاعل كل أنواع البروسيلا الحاوية على مستضدات سطحية ملساء في تفاعلات التراص مع المصل الضدي المُحضَّر ضد مستنبتات البروسيلا الملساء. بينما لا يحدث تراص أنواع البروسيلا الخشنة بواسطة المصل الضدي للبروسيلا الملساء ولكنها تتراص بفعل مصل ضد البروسيلا الخشنة.

٤. اصابة عينات الحليب تجريبياً:

تم مزج ١٠٠ µl من بكتيريا البروسيلا الضأنية المستنبتة طوال الليل في ١٥ مل من بيئة 2YT السائلة وتُركت لتنمو على الدرجة ٣٧ م مدة ثلاث ساعات. ثم استنبتت البكتيريا على أطباق 2YT آغار، وحدد التعداد البكتيري فيها من خلال تحضير سلسلة تمديدات ثمُوزع على كل مخفف ١٠ مل من حليب المبستر ثم نقل الحليب المحقون الى ١٠٠ مل من بيئة 2YT السائلة ويُستنبت على درجة حرارة ٣٧ م لمدة أربع ساعات.

٤. تحضير الـ DNA من عينات الحليب:

أُخذ ٥ مل من السائل الحليبي ثم ترشيحة باستخدام مرشحات بكتيرية (T.(0.46um ثم تعريض الراشح مع (200ul) من الموقى لدرجة حرارية ٩٥م لمدة ١٠ دقائق ثم اخذ (10ul) من المستحلب ووضعة مباشرة فى خليط تفاعل البلمرة المتكرر.

٥. التنميط باستخدام تقنية الـ PCR:

أُستعملت هذه التقنية لتضخيم مورثة BCSP31 النوعية لجنس البروسيلا مستخدمين بادءات (مرئسات primers) خاصة لها. وُضع في أنبوب التفاعل: x ميكروليتر من الحمض النووي الريبي المنقوص الأكسجين DNA (المحضر من عينات الحليب الملوثة بالبروسيلا) مع ١ ميكروليتر من البادئة اليسرى للمورثة (من ١٠ إلى ١٠٠ بيومول/للتفاعل)؛ و ١ ميكروليتر من البادئة اليمنى للمورثة؛ بالإضافة إلى ١ ميكروليتر من dNTP و ٥ ميكروليتر من وحدة أنزيمية من أنزيم الـ DNA بوليميراز، وتُمم الحجم النهائي للتفاعل إلى ٥٠ ميكروليتر بإضافة الماء المقطر.وكان البرنامج كالتالى:

٣٥ دورة كل دورة اشتملت على
ثانية Denaturation
ثانية Denaturation
ثانية إقتران
ثانية بلمرة
ثانية بلمرة اضافية

استمرت فترة التفاعل ٣٥ دورة على جهاز الـ PCR (Briker, 2002).

٦. اختبار الحلقة الحليبي MRT:

استخدام هذا الاختيار كاختبار مسح لقطعان الحيوانات المنتجة للحليب. حيث يتم تفاعل الأضداد (على الأغلب من الصف IgA) مع متعدد السكاريد الليبيدي LPS يؤدي لتشكيل حلقة بنفسجية اللون في عينة الحليب المدروسة. وُضع ٠.٥ مل من مستضد Ring-test مع ٥ مل من عينة الحليب المدروسة، بوجود البروسيلا، سيتشكل معقد مستضد-ضد الذي يشاهد كحلقة بنفسجية على السطح.

النتائج والمناقشة

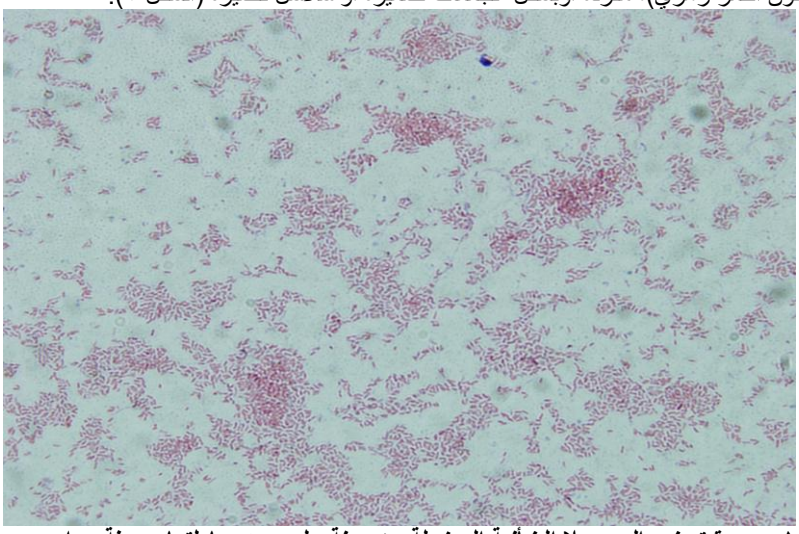
نتائج اختبار تفاعل الحلقة الحليبي:

تم فحص ١٠٠ عينة حليب من أبقار مصابة بالبروسيلا، أعطت ٧٨ عينة حليب بقرية تفاعلاً إيجابياً و ٢٢ عينة تفاعلاً سلبياً أي بنسبة ٧٨%.

أُستنبتت عينات الحليب الملوثة على وسط الاستنبات الانتقائي للبروسيلا؛ ثم حُضنت لمدة ٢٤ – ٤٨ ساعة؛ كما أُجري تفاعل الحلقة للعينات ذاتها كما ورد في المواد والطرق المستخدمة .

مورفولوجيا الخلايا والمستعمرات:

بدت معظم البكتيريا المعزولة تحت المجهر الضوئي بشكل عصيات مكورة صغيرة، سالبة لتفاعل جرام (لون أحمر زهري)، مفردة أوبشكل تجمعات صغيرة أو سلاسل قصيرة (الشكل ١).



الشكل ١. صورة توضح البروسيلا الضأنية المعزولة من عينة حليب بعد معاملتها بصبغة جرام.

كما كانت البروسيلا النامية على الوسط الانتقائي على شكل مستعمرات دائرية محدبة قطرها ١-٣ مم تقريباً، وذات سطح متلألىء أملس، كما لوحظ بعض المستعمرات باهتة وأكثر عتامة ولونها أبيض مصفر ذات سطح خشن (حبيبي). و كانت المستعمرات المتوسطة مشابهة للمستعمرات الملساء ولكنها ذات سطح حبيبي أكثر بصورة طفيفة.

الاختبارات الكيموحيوية:

تم إجراء الاختبارات الكيموحيوية التالية على البكتيريا المعزولة: الحاجة لـ CO_2، تفاعل الكاتالاز والأوكسيداز، اختبار البولة، اطلاق غاز H_2S، النمو بوجود التيونين أو الفوشسين، تفاعلات التراص مع anti-A أو anti-M، أظهرت نتائج الاختبارات الكيموحيوية أن البروسيلا المعزولة كانت إيجابية للكاتالاز والأوكسيداز، كما أنها أنتجت غاز كبريتيد الهيدروجين H_2S. لم تنتج البروسيلا المعزولة أنزيم اليورياز بعد حوالي ٣٠ – ١٢٠ دقيقة من الحضن؛ كما نمت بوجود التيونين والفيوشسين، وكانت موجبة التراص مع anti-A و anti-M. إن نتائج الاختبارات الكيميائية الحيوية مشابهة للبروسيلا الضأنية العيارية، مما يدل على أن البروسيلا المعزولة من عينات الحليب هي من نوع البروسيلا الضأنية.

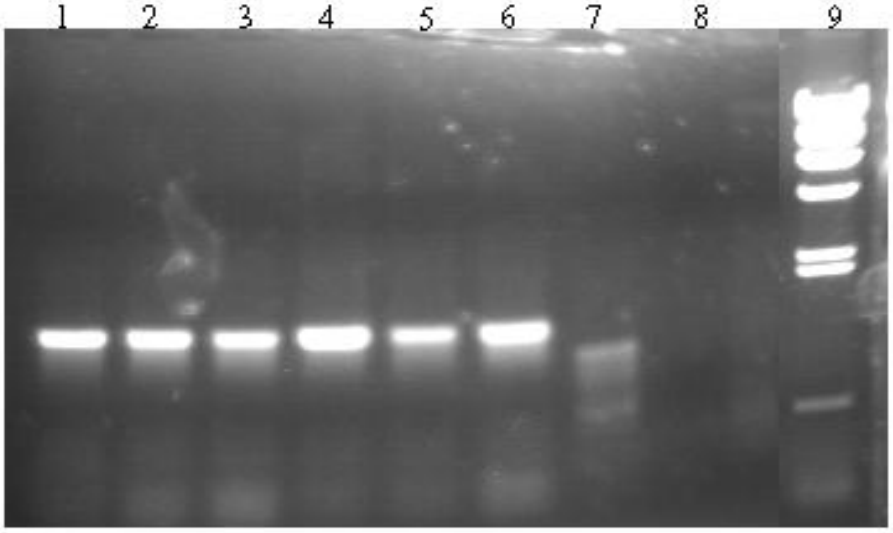
الجدول ١. نتائج الاختبارات الكيميائية الحيوية للبروسيلا الضأنية.

السلالة	CO_2Requ.	أوكسيداز	كاتالاز	البولة	H_2S	Fuchisin	تيونين	anti A	anti M
الشواهد العيارية									
B. melitensis 16M	-	+	+	وردي	+	+	+	++	+++
B. abortus 544	-	+	+	برتقالي	++	+	+	+++	++

مستعمرات بكتيرية معزولة من وسط انتقائي للبروسيلا									
عينة حليب١	-	+	+	وردي	+	+	+	++	+++
عينة حليب٢	-	+	+	وردي	+	+	+	++	+++
عينة حليب٣	-	+	+	وردي	+	+	+	++	+++
عينة حليب٤	-	+	+	وردي	+	+	+	++	+++
عينة حليب٥	-	+	+	وردي	+	+	+	++	+++

كشف البروسيلا بتقنية الـ PCR:

يوضح الشكل (٢) نتائج تفاعل البلمرة المتكرر (PCR) والذى يعنى تكثير موروثة BCSP31 والخاصة بجنس البروسيلا معتمدا على عينات الحليب التى تم اعدائها بالخلايا البكتيرية بمستوى (10^5 – 10^9 CFU 1 ml).



الشكل ٢. أجاروز جل (-%) يوضح نواتج تفاعل البلمرة المتكرر والمعتمدة على المادة الوراثية المستخلص من عينات حليب ثم اعداؤها صناعيا، عينة حليب ملقح بـ B. mel (109 cfulre) وهكذا 3: B. melitensis cfu/ml cfu/ml 10^7 في الموقي PBS كشاهد إيجابي.

٤-٦: عينات حليب ملوثة بالبروسيلا.

٧: melitensis cfu/ml cfu/ml 10^5 في الحليب.

٨: عينة حليب خالية من البروسيلا (شاهد سلبي).

٩: واسم جزيئي ΦX174DNA/HaeIII.

نلاحظ من الشكل السابق أنه يمكن تشخيص البروسيلا الضأنية في عينة الحليب بواسطة التضخيم المورثي باستخدام تفاعل البلمرة المتكرر. استخدمنا كشاهد ايجابي البروسيلا الضأنية في موقي الـ PBS (المسار ٣) وكشاهد سلبي حليب خالي من البروسيلا بينما حُقن E. coli و اليرسينيا المعوية ذات النمط المصلى .

لاحظنا أن نوعية الـ PCR كانت 96.5% في الكشف عن العينات الملوثة بالبروسيلا (مقارنة مع العزل البكتيري لنفس العينات)، بينما كانت نوعية اختبار الحلقة الحليبي 78% أي أنه يوجد فارق في نوعية (حساسية) كلتا الطريقتين، علماً بأن الطريقة الأولى لا يوجد تفاعلات متصالبة كاذبة أو موجبة مع بكتيريا أخرى سالبة الغرام حيث كانت النتيجة سلبية في عينة الحليب الملوثة فقط بـ Yersinia O:9 و E. coli

O:157 (المسار ٨). قد يكون سبب عدم كشف البروسيلا في جميع العينات الملوثة هو أن التعداد البكتيري أقل من ١٠^{٥} cfu/ml. إن تقنية الـ PCR لا تستغرق سوى يوم واحد، وهذ يفيد في امكانية استخدامها كطريقة عيارية في الكشف عن البروسيلا، كما أنها تقنية تجنب العاملين في مخابر البكتيريا الإصابة بالبروسيلا، لذا يمكن استخدامها في تشخيص بروسيلا الأبقار. ومن الممكن إجراء أبحاث مستقبلية لاستخدام هذه التقنية للكشف عن الإصابة بالبروسيلا عند حيوانات أخرى مثل (الأغنام ، والماعز).

REFERENCES

Akova M, Uzun O, Akalin HE, Hayran M, Unal S, Gur D. (1993). Quinolones in treatment of human brucellosis: comparative trial of ofloxacin-rifampin versus doxycycline-rifampin. Antimicrob Agents Chemother. 37: 1831-4.

Alp E, Koc RK, Durak AC, Yildiz O, Aygen B, Sumerkan B, Doganay M. (2006). Doxycycline plus streptomycin versus ciprofloxacin plus rifampicin in spinal brucellosis [ISRCTN31053647]. BMC Infect Dis. 6: 72.

Alton, G. G., Jones, L. M., Angus, R. D., and Verger, J. M. (1988). Bacteriological Methods, In Techniques for the brucellosis laboratory, Ed. INRA Paris France. Chp 1. 42-47.

Ariza J, Gudiol F, Pallares R, Viladrich PF, Rufi G, Corredoira J, Miravitlles MR. (1992). Treatment of human brucellosis with doxycycline plus rifampin or doxycycline plus streptomycin. A randomized, double-blind study. Ann. Intern. Med., 117: 25-30.

Bayindir Y, Sonmez E, Aladag A, Buyukberber N. (2003). Comparison of five antimicrobial regimens for the treatment of brucellar spondylitis: a prospective, randomized study. J Chemother., 15: 466-71.

Boschiroli, M. L., Foulongne, V., and O'Callaghan, D. (2001). Brucellosis: a worldwide zoonosis. Curr. Opin. Microbiol., 4 : 58-64.

Bricker, B. J. (2002). PCR as a diagnostic tool for brucellosis. Vet. Microbiol., 90:435–446.

Challoner, K. R., Riley, K. B., and Larsen R. A. (1990). Brucella meningitis. Am. J. Emerg. Med., 8: 40-42.

Corbel MJ and Brinley-Morgan WJ. (1976). Genus Brucella. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 1:377-388.

Corbel, M. J. 1997. Recent advances in brucellosis. J. Med. Microbiol., 46:101-103.

Giannakopoulos I, Nikolakopoulou NM, Eliopoulou M, Ellina A, Kolonitsiou F, Papanastasiou DA. (2006). Presentation of childhood brucellosis in Western Greece. Jpn. J. Infect. Dis., 59: 160-3.

Ersoy Y, Sonmez E, Tevfik MR, But AD. (2005). Comparison of three different combination therapies in the treatment of human brucellosis. Trop Doct., 35: 210-2.

Hasanjani Roushan MR, Mohraz M, Hajiahmadi M, Ramzani A, Valayati AA. (2006). Efficacy of gentamicin plus doxycycline versus streptomycin plus doxycycline in the treatment of brucellosis in humans. Clin Infect Dis., 42: 1075-80.

Kwaasi AA, Al-Mohanna FA, Nakeeb SM, Roberts GT, Al-Thawadi S, Hassan AY, Al-Hokail A, Elfaki MG. (2005). Correlation of antigenic expression with progress in antibiotic therapy of acute human brucellosis. J. Med. Microbiol., 54: 533-8.

Karabay O, Sencan I, Kayas D, Sahin I. (2004). Ofloxacin plus rifampicin versus doxycycline plus rifampicin in the treatment of brucellosis: a randomized clinical trial [ISRCTN11871179]. BMC Infect. Dis., 4: 18.

Nicoletti P. (1990). Vaccination against Brucella. Advances in Biotechnology Processes, 13: 147-168.

Nicoletti, P. (1980). The epidemiology of bovine brucellosis. Adv. Vet. Sci. Comp. Med., 24 : 69-98.

Roushan MR, Gangi SM, Ahmadi SA. (2004). Comparison of the efficacy of two months of treatment with co-trimoxazole plus doxycycline vs. co-trimoxazole plus rifampin in brucellosis. Swiss Med. Wkly., 134: 564-8.

Ozbay K, Inanmis RA. (2006). Successful treatment of brucellosis in a twin pregnancy. Clin. Exp. Obstet. Gynecol., 33: 61-2.

Smith, L. D., and Ficht, T. A. (1990). Pathogenesis of Bucella. Crit. Rev. Microbiol., 17 : 209-230.

Solera J, Rodriguez-Zapata M, Geijo P, Largo J, Paulino J, Saez L, Martinez-Alfaro E, Sanchez L, Sepulveda MA, Ruiz-Ribo MD. (1995). Doxycycline-rifampin versus doxycycline-streptomycin in treatment of human brucellosis due to Brucella melitensis. The GECMEI Group. Grupo de Estudio de Castilla-la Mancha de Enfermedades Infecciosas. Antimicrob Agents Chemother., 39: 2061-7.

Solera J, Espinosa A, Martinez-Alfaro E, Sanchez L, Geijo P, Navarro E, Escribano J, Fernandez JA. (1997). Treatment of human brucellosis with doxycycline and gentamicin. Antimicrob Agents Chemother., 41: 80-4.

Yumuk Z, Dundar V. (2005). The effect of long-term ethanol feeding on efficacy of doxycycline plus rifampicin in the treatment of experimental brucellosis caused by Brucella melitensis in rats. J. Chemother., 17: 509-13.

Young, E. (1995). An overview of human brucellosis. Clin. Infect. Dis., 21 : 283-290.

Zvizdic S, Cengic D, Bratic M, Mehanic S, Pinjo F, Hamzic S. (2006). Brucella melitensis: review of the human infection case. Bosn. J. Basic Med. Sci., 6: 15-8.

EVALUATION OF PCR FOR THE DIAGNOSIS OF BOVINE BRUCELLOSIS IN MILK SAMPLES IN SOME AREAS IN DAMASCUS COUNTRYSIDE

Al-Ashkar, Buthaina [1*], A. Al-Mariri[2] and Ibtissam Hamad[3]

*** Correspondance: buthaina@tigerproduction.net, Fax:11 6115433, Damascus P.O.Box :31044**

[1] Biology Dept., Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.
[2] Department of Molecular Biology and Biotechnology, Atomic Energy Commission, P.O. Box 6091, Damascus, Syria.
[3] Dean, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

ABSTRACT

Molecular and chemical characteristics often provide complementary information in the differentiation of closely related organisms. The genus Brucella consists of a highly conserved group of organisms. Identification of animals' brucellosis is problematic for many clinical laboratories that depend primarily on serology and phenotypic characteristics to differentiate bacteria. In this study, we developed a PCR-based assay for the rapid and specific laboratory diagnosis of cow brucellosis directly from milk. Specific primers for the PCR amplification of a 223-bp of a gene that codes for the synthesis of an immunogenetic membrane protein specific for the Brucella genus (BCSP31) were used. However, this PCR products were unique to brucellae, allowing them to be readily distinguished from other gram-negative bacteria (including Yersinia enterocolitica O:9. and E. coli O:157). In 100 milk samples from animals with acute serologic brucellosis as determined by serologic tests and the bacteria isolation test. The PCR was found to be 94.9% sensitive and 96.5% specific, whereas the specificity of the milk ring test was only 78%. Since the assay can be performed in 1 day, is very reproducible, is easily standardized, and avoids the risk of infection in laboratory workers, this PCR seems to be a practical and reliable tool for the diagnosis of cattle brucellosis. Further studies must be conducted to assess the utility of this test on additional animals (sheep and goat) infected with brucellosis as well as vaccinated animals.

قام بتحكيم البحث

أ.د / عبد الله العوضي سليم — كلية الزراعة – جامعة المنصورة
أ.د / طه إبراهيم زغلول — معهد الدراسات العليا والبحوث – جامعة الإسكندرية