عزل مورثة الـ*p39* من سلالة البروسيلا الضأنية المعزولة محلياً

د.صباح يازجي [1] د. أيمن المريري [2] دانية عواطة [3]

1-الملخص:

البروسيلا جراثيم ممرضة مشتركة بين الانسان والحيوانات الأهلية، حيث تسبب مرض الحمى المالطية لدى البشر، وخسائر اقتصادية فادحة لدى الحيوانات. تستخدم الاختبارات المصلية التقليدية لتشخيص البروسيلا، لكن وللأسف حساسية ونوعية هذه الاختبارات غير كافية للتشخيص النوعي للبروسيلا، مما قد يؤدي إلى أخطاء تشخيصية، قد ينجم عنها تفاقم المشكلة الصحية لدى المريض.وبما أن البروسيلا الضأنية تعد من أشد أنواع البروسيلا شراسة، وتكون حالات النكس مرتفعة نسبياً، فقد هدفت هذه الدراسة لعزل مورثة *p39* المشفرة للبروتين p39 من سلالات البروسيلا الضأنية السورية، ودراسة مدى مطابقتها لمورثة *p39* المعزولة من سلالة البروسيلا الضأنية العيارية *Brucella melitensis* 16M ، وهذا ما أشارت إليه نتائج البحث، من حيث وجود تطابق تام بين مورثة *p39* المعزولة من البروسيلا الضأنية السورية، والضأنية العيارية، وكذلك لوحظ هذا التطابق مع المورثة المعزولة من البروسيلا المجهضة.

كلمات مفتاح: بروسيلا ضأنية، تضخيم مورثي تسلسلي

---

[1] – أستاذ مساعد ، جامعة دمشق ، كلية الزراعة ،قسم علوم الأغذية.

[2] – باحث، هيئة الطاقة الذرية، قسم التقانة الحيوية والبايولوجية، دائرة الميكرو بايولوجيا والمناعيات.

[3] – مساعد باحث أول ، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، قسم تكنولوجيا الأغذية.

1. المقدمة

البروسيلا جراثيم سالبة غرام، تصيب الحيوانات والإنسان؛ تنتمي إلى صف البكتيريا α-proteobacterial والتي توجد في النباتات والحيوانات [Moreno et al., 1990]. يُقسم جنس البروسيلا إلى ستة أنواع: حيث يوجد البروسيلا الضأنية *B. melitensis* ، والبروسيلا المجهضة *B. abortus* ، والبروسيلا الخنزيرية *B. suis* ، والبروسيلا الماعزية *B. ovis*، والبروسيلا الكلبية *B. canis*، وبروسيلا جرذ الصحراء *B. neotomae* [Carmichael and Bruner, 1968]. تُسبِّب البروسيلا مرض الحمى المالطية لدى الانسان، الذي تنتقل إليه العدوى من المجترات، (الأغنام، والأبقار، والماعز، والجمال) [Almuneef and Alalola, 2002; Almuneef et al. 2003; Georgios et al. 2005]. وكما تعد البروسيلا أحد أخطر أمراض الماشية لأنها تُسبب خسارة كبيرة في معدل إنتاج الحيوانات وتربيتها في العالم النامي يتجلى في انخفاض إنتاج الحليب، ونقصان وزن الحيوان، إجهاض أو ولادة حيوانات ضعيفة، وعُقم لدى الذكور [Corbel, 1997]. إلا أنّ سرعةَ انتشاره إلى البشر تجعله أكثر خطورة، حيث حدد التصنيف التقليدي للمرض: بـ 1- المرض الحاد، 2- المرض المزمن. حيث يتظاهر بأعراض مشابهة للإنفلونزا: كالحُمَّى، ورائحة العرق الكريه، والصداع، وآلام الظهر، والضعف الطبيعي، والإصابات الحادّة للنظام العصبي المركزي، أو التهاب شغاف القلب، وألم المفاصل، والأعراض المعوية ، والألم القطني، وسعال، وضيق تنفّس، ونقصان الوزن، والتهاب الأعضاء التناسلية. وتستمر الأعراض في المرض المزمن لمدة طويلة بحمّى متكرّرة، وإعياء مفاصل، مع احتمال حدوث انُتكاس بعد المعالجة.

لقد شخّص الجراح البريطاني Jeffery Allen Marston في عام 1863 مرضاً يسبب الحمى في جزيرة مالطة، وأطلق عليها اسم الحمى المالطية [Vassallo, 1996]. أجرى الجراح David Bruce بين عامي 1884 و 1893 أبحاثه على الحمى المالطية، واستطاع عزل الجرثوم المسبب للمرض في عام

1887؛ وأطلق عليها في عام 1893 اسم *Micrococcus melitensis* [Stoenner and Lackman, 1957]. فيما بعد اكتشف فريق بحث بإشراف بروس Bruce، أن العدوى تنتقل عند تناول الحليب الطازج المأخوذ من ماعز مُصاب بالجرثوم، كما وجد هذا الفريق أن الإصابة كانت مرتفعة لدى مربي الماعز في هذه الجزيرة [Vassallo, 1996].

أشار J. Crawford Kennedy عام 1914 إلى احتمال انتقال جرثوم *M. melitensis* إلى الإنسان بواسطة حليب البقر. أطلق عليها البروفسور بانغ Bang Benhard فيما بعد اسم *Bacillus abortus* [Stoenner and Lackman, 1957].

و بين إيفان Evans في عام 1918 أن الـ *M. melitensis* هي عصيات صغيرة coccobacille لها خصائصها الشكلية والكيميائية الحيوية المميزة، ولكن لها استطاعة إمراضية مُشابهة للبروسيلا المجهضة *B. abortus* [Vassallo, 1996]. وفي عام 1920، أوضح العالمان ماير وسو Meyer and Shasw أن كلا النوعين لا ينتسبان لسلالة Bacterium، وإنما يجب تصنيفهما بسلالة منفصلة هي البروسيلا *Brucella* نسبة للطبيب الانكليزي بروس Bruce [Stoenner and Lackman, 1957]. وأضيف إلى هذه السلالة فيما بعد البروسيلا الخنزيرية *B. suis* ; البروسيلا الماعزية *B. ovis* ; *B. neotomae* والبروسيلا الكلبية *B.canis*. تم مؤخراً تحديد الخريطة الوراثية لصبغي البروسيلا الضانية ، ثم البروسيلا المجهضة والبروسيلا الخنزيرية [Sanchez *et al.* 2001, Paulsen *et al.* 2002, DelVecchio *et al.* 2002]. تحوي البروسيلا الضأنية على صبغيين دائريين مع نسبة G/C 57 %، ولا تحتوي على بلازميدات، وتحتوي على 3197 مورثة بما يسمى (Open Reading Frame)، حيث تم تحديد وظيفة 2487 مورثة منهم.

انخفض عدد حالات الإصابة بمرض الحمى المالطية في الولايات المتّحدة، منذ 1980، إذ سُجلت 100 إلى 200 حالة سنوياً فقط، ولكن المرض، مازال منتشراً في بلدان كثيرة من العالم مثل: (سورية، البرتغال، إسبانيا، جنوب فرنسا،

إيطاليا، اليونان، تركيا، شمال أفريقيا). يعد هذا المرض على سبيل المثال أحد أكبر مشاكل صناعة منتجات الأغنام في تركيا حيث يسفر عن خسائر اقتصادية خصوصاً في شرق أنطاليا بسبب استهلاك الأجبان المصنعة من الحليب الخام والمسماة (*Otlu Peynir*) [Ekici *et al.*, 2006]. إلا أن المشكلة الأهم هي أنه في حالة الإصابة البشرية بمرض الحمى المالطية هناك ارتفاع نسب النكاس بعد الشفاء منه حتى بعد مرور مدة طويلة على العلاج بالصادات الحيوية [Vrioni *et al.*, 2008] . ويعود السبب الأساسي لانتشاره هو افتقار هذه البلدان لبرامج صحية متطورة أو لأنها بدأت ببرنامج التلقيح (الذي يستغرق من 10 إلى 15 سنة) متأخرة نسبياً؛ على سبيل المثال انتهت الولايات المتحدة الأمريكية من برنامج التلقيح منذ أواخر الأربعينيات، بينما بدأ البرنامج في سورية منذ التسعينيات. كما أنه بدأ تسجيل عدد الاصابات رسمياً في سورية منذ 2000 فقط، والعدد بازدياد، حيث وصل إلى 23.297 حالة لعام 2003؛ من هنا تبرز أهمية بحثنا عن مستضد نوعي لتشخيص البروسيلا نوعياً لدى مرضى الحمى المالطية.

ينتشر المرض في سورية من خلال إستهلاك منتجات الحليب غير المُبسترة (حليب خام خصوصاً، وجبنة بلدية، وقشطة، وزبدة، وبوظة...، الخ) من الحيوانات المُصابة، أو إتصال المربين وعائلاتهم المباشر بأجزاء الحيوانات المُصابة (مثل المشيمة). وبذلك فإن أكثر الأشخاص عرضة للمرض هم الرعاة، وعمّال المسالخ، والأطباء البيطريون، وعمال صناعة الألبان، والباحثون في مختبرات الأحياء الدقيقة.

اكتشف Bruce الإختبارات المصلية لتشخيص الحمى المالطية والتي تعتمد على تفاعل الأضداد (في مصل المريض) مع البروسيلا الميتة كمستضد. ولكن فيما بعد تم التشخيص غير المباشر لداء البروسيلات من خلال ملاحظة الأضداد في السوائل البيولوجية، أو دراسة الاستجابة المناعية الخلوية الوساطة، ومن خلال العزل المباشر للبروسيلا الحية [Yingst and Hoover, 2003]. وقد تبين أن الكشف عن الأضداد ضد البروسيلا أسهل وأسرع، لكن ليس كل المصابين تنتج

أجسامهم مستويات متساوية من الأضداد يمكن ملاحظتها [Dornand *et al.* 2002; Hamdy *et al.* 2002]. لكن لهذه الاختبارات عدة مساوىء من أهمها التفاعلات المتصالبة بين البروسيلا وجراثيم سالبة الغرام أخرى مثل الأيشريكيا القولونية ذات النمط المصلي O:157 واليريسنيا المعوية ذات النمط المصلي O:9 والسالمونيلا... الخ [Baldi *et al.* 1996].

يتطلب تشخيص الحمى المالطية عزل البكتيريا من عينات الدم أو الأنسجة؛ إلا أن حساسية زراعة الدم تختلف تبعاً لخبرة الشخص المخبرية، وكيفية استخراج المزارع. ويتفاوت مدى الحالات الإيجابية الزراعة بين 15 – 70 % [Memish *et al.* 2000; Yagupsky, 1999]. كما تعد تقنية زراعة نقي العظام من الطرائق النوعية لتشخيص الحمى المالطية، غير أن هذه التقنية مؤلمة ولا تنصح بها منظمة الصحة العالمية [Gotüzzo *et al.* 1986].

تستخدم المقايسة المناعية الأنزيمية غير المباشرة (ELISA) للكشف عن البروسيلا باستخدام البروتينات السيتوبلاسمية كمستضد، حيث يمكّن أن تحدد الصف الضدي IgM, IgG, IgA فيمكّن باستخدام هذه التقنية تحديد فيما إذا كان المرض بطوره الحاد أو المزمن، وهي نوعية أكثر من الاختبارات المصلية الأخرى [Almuneef *et al.* 2003].

الهدف من إجراء هذه الدراسة هو عزل مورثة الـ *p39* من عزلة البروسيلا الضأنية السورية، ودراسة مدى مطابقتها مع البروسيلا الضأنية العيارية، وإيجاد مستضد يسمح بالتشخيص النوعي لداء البروسيلات في الانسان والحيوان.

2. المواد و الطرائق:

1.2. الاستنبات الجرثومي

تم الحُصول على سلالة البروسيلا الضأنية *B. melitensis* 16M، وسلالة الأيشريكيا القولونية *Echerechia coli* BL21 والتي استخدمت في هذه الدراسة من مخبر البروفسور جان جاك لوتسون J-J Letesson (وحدة البيولوجيا الجزيئية والميكروبيولوجيا – جامعة نامور – نامور – بلجيكا)؛ أما البروسيلا الضأنية السورية فقد نُمطت في مخبر الميكروبيولوجيا والمناعيات في قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية في هيئة الطاقة الذرية السورية.

تم تنمية البروسيلا في وسط استنبات البروسيلا 2 yeast tryptone (2YT) (في كل ليتر: 10غ من خلاصة الخميرة، 10غ تريبتون، 5غ كلور الصوديوم) بدرجة حرارة 37 °م. بينما نُميت الأيشريكيا القولونية على وسط Luria-Broth (LB) (في كل ليتر: 5غ خلاصة الخميرة، 10غ تريبتون، 5غ كلور الصوديوم) بدرجة حرارة 37 °م.

تم إضافة الأمبيسيلين ampicillin بمعدل 50 ميكروغرام/مل عند الضرورة للوسط بتراكيز متناسبة مع الحجم النهائي للمستنبت.

2.2. عزل الـ DNA الجرثومي

تم أخذ 1.5 مل من مستنبت الجرثومي وتم تثفيله باستخدام مثقلة Eppendorf لمدة 15 دقيقة وعلى سرعة دوران 13000 دورة/دقيقة، ثم أضيف إلى الثفالة الجرثومية 500 ميكروليتر من موقي Tris-Hcl+EDTA (TE)، و50 ميكروليتر ليزوزيم (10 ميلغرام/مل)، ترك لمدة ساعتين بحمام مائي بدرجة 37 °م، ثم ترك ليلة كاملة بدرجة 50 °م، في اليوم التالي أُضيف 25 ميكروليتر من بروتيناز K (20 ميلغرام/مل)، وحضّن المزيج على الدرجة 37 °م لمدة ساعة، ثم أُضيف 25 ميكروليتر Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) 25% وحُضن

المزيج لمدة ساعة. بعد مرور الوقت أُضيف 200 ميكروليتر من Nacl 5 مول، ثم أُضيف 750 ميكروليتر مزيج فينول-كلوروفورم مع المزج الجيد، وثقّل المزيج 13000 دورة/د لمدة 5 دقائق. بعد ذلك أُضيف إلى الطافي (الحاوي على المادة الوراثية) 450 ميكروليتر إيزو بربانول، وثقل المزيج 13000 دورة/د لمدة 45 دقيقة، ثم أُضيف للراسب 1 مل من الايتانول 70%. وثقّل 5 دقائق، ثم جفف الراسب، وأُضيف 20 ميكروليتر من موقي TE، وحفظ بالمجمدة على -20 °م لحين الاستخدام.

4.2. الرحلان الكهربائي:

تم إذابة 1غ من الآغاروز بـ 100 مل من الـ TAE (elechtrophoresis buffer)، حضّرت العينات المراد قياسها إلى حجم نهائي 15 ميكروليتر، أُضيف إلى الهلامة السائلة 3 ميكروليتر من إيتيديوم بروميد لإظهار عصائب الترحيل، ثم وضعت أمشاط الرحلان، وصبت الهلامة، ثم بعد جفافها أُضيف موقي الهلامة بشكل يغمر الآبار المتشكلة. تلا ذلك وضع المعلم الجزيئي (Marker) والعينات في الآبار، وشغل الجهاز على شدة 80 فولت لمدة ساعتين تقريباً، ثم فحصت الهلامة بواسطة جهاز gel documentation الذي يُظهر العصائب.

5.2. التضخيم المورثي التسلسلي باستخدام تقنية الـ Polymerase (PCR) Chain Reaction:

استعملت هذه التقنية لتضخيم مورثـــة *p39* النوعيـــة لجـــنس البروســـيلا مستخدمين مرئسات خاصة لهذه المورثة. وضع في أنبوب التفاعل: x ميكروليتـــر (1- 0.1 ميكروغرام) من الحمض النووي الريبي المنقـــوص الأكســـجين DNA (المحضر من عينات البروسيلا العيارية وكذلك المعزولـــة فـــي ســـورية) مـــع 1 ميكروليتر من البادئـــة اليســـرى للمورثـــة (10- Biomol/reaction100)؛ و1 ميكروليتر من البادئة اليمنى للمورثة؛ بالإضافة إلى 1 ميكروليتر من dNTP (

0.2 ميلمول) و 2 وحدة أنزيمية من أنزيم الـ DNA بـوليمراز، وتمُـم الحجـم النهائي للتفاعل إلى 50 ميكروليتر بإضافة الماء المقطر المعقـم. اسـتمرت فتـرة التفاعل حوالي 35 دورة على جهاز الـ PCR ضمن البرنامج الآتي (35 دورة):

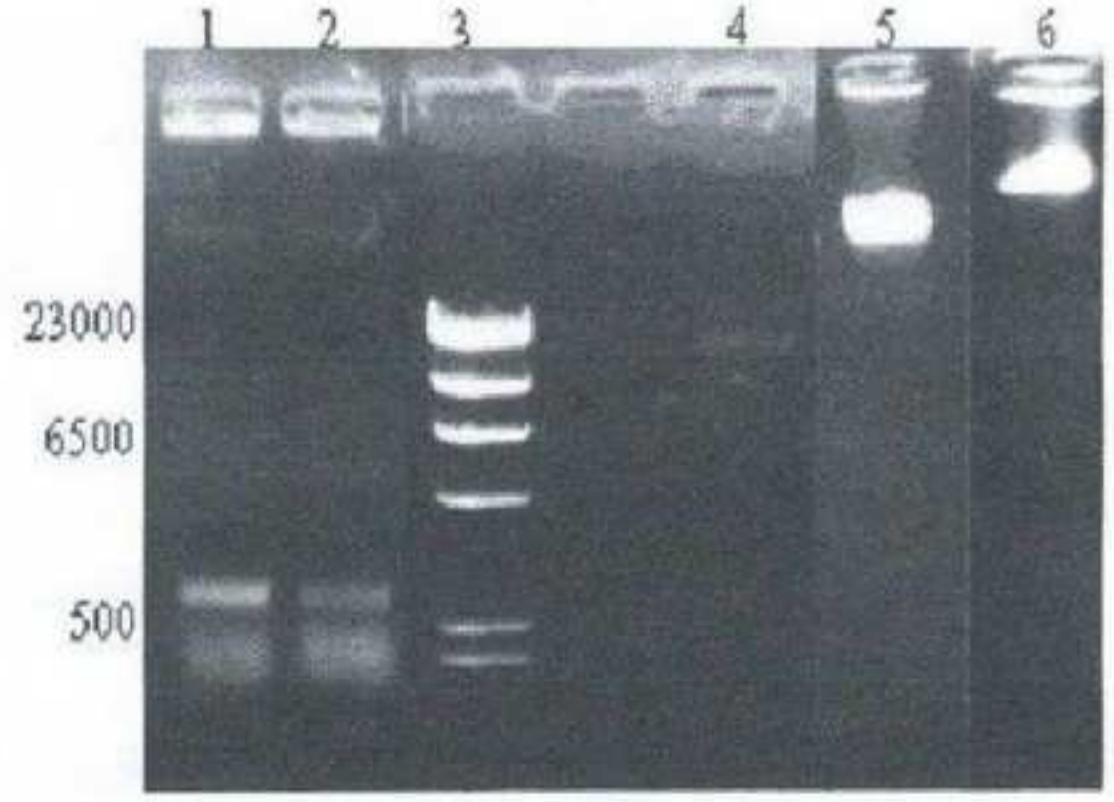
1. مرحلة فك تضاعف خيط الدنا (Denaturation): 95 °م لمدة 5 دقائق.
2. مرحلة التضخيم 35 دورة (Amplification): 95 °م لمدة 30 ثانية، 55 °م لمدة 1 دقيقة، 72 °م لمدة 1 دقيقة.
3. مرحلة الاستطالة (Extention): 72 °م لمدة 10 دقائق.

6.2. عزل مورثة من هلامة الأغاروز (Wizard^R SV Gel and PCR Clean-Up System):

بعد الرحلان، قطعت عصابة الدنا من الهلامة إلى أنبوب، وأضيف 10 ميكروليتر من محلول ربط الغشاء لكل 10 ميلغرام من قطعة الهلامة، حضنت بدرجة 50- 65 °م حتى تمام انحلال قطعة الهلامة. نقل خليط قطعة الهلامة المنحلة إلى أنبوب تنقية داخل أنبوب جمع، ثم ثقّل على 16000×g لمدة 1 دقيقة، رمي السائل المنقى و أعيد أنبوب التنقية إلى أنبوب التجميع حيث غسل بـ 700 ميكروليتر من محلول غسيل الغشاء (المضاف إليه الإيتانول). ثقّل على 16000×g لمدة 1 دقيقة.ثم أعيد الغسيل و التثقيل، ثم نقل بعدها أنبوب التنقية بحذر إلى أنبوب تثقيل، ليضاف 50 ميكروليتر من الماء الخالي من أنزيم النيوكلياز لأنبوب التنقية، حضن لمدة 1 دقيقة، ثم ثقّل على 16000×g لمدة 1 دقيقة، بعد ذلك تم التخلص من أنبوب التنقية، و حفظ الدنا المستحصل بدرجة 4°م.

.. النتائج و المناقشة:

عُزلت الدنا من كلا سلالتي البروسيلا الضأنية العيارية *B. melitensis* 16M، والسورية، حيث يوضح الشكل (1) عصابتي جينوم البروسيلا السورية، والقياسية على التوالي (الشكل 1)، ومن ثم عُزل من جينوم كلا السلالتين مورثة الـ *p39* بواسطة تقنية التضخيم المورثي (PCR)، مستخدمين مرنسات نوعية لها (الشكل 1).



الشـــــكل (1): يبين هلامة الرحلان الكهربائي للمورثة *p39* للبروسيلا الضأنية السورية(المسار1)، والمورثة *p39* للبروسيلا العيارية (المسار2)، ويظهر الواسم الجزيئي الأوزان الجزيئية (MW) (المسار3). كما يبين عصابتي الدنا للبروسيلا الضأنية السورية و القياسية (المسار5،6) على التوالي.

بعد ترحيل منتج الـ PCR لكل من جينوم البروسيلا العيارية والبروسيلا السورية على هلامة الأغاروز 1% من خلال جهاز الرحلان الكهربائي ، تم الحصول على المورثة *p39* لكلا السلالتين.

لوحظ أثناء الدراسة، تطابق تام بين مورثة *p39* المعزولة من البروسيلا الضأنية العيارية والسورية، وهذا ما يؤكد على أن البروسيلا هي جنس محافظ لا

يتأثر بالتوزع الجغرافي، فهناك تشابه تام للمورثات الوظيفية بين البروسيلا الأمريكية والايطالية والاسبانية...الخ [Michaux-Characho *et al.*1997; Verger *et al.*1997]. وهذا التطابق يؤكد صحة نتائج هذا البحث. ومن الجدير بالذكر فقد لوحظ أيضاً تطابق بين مورثة الـ *p39* المعزولة من البروسيلا الضأنية، وتلك المعزولة من البروسيلا المجيضة، وهذا ما يتطابق مع نتائج علمية سابقة [Denoe"l *et al.* 1997]. إن هذا التطابق التام لمورثة *p39* بين أنواع وتحت أنواع البروسيلا هو الذي يوجه في اختيارها للدراسة في أبحاث لاحقة كمستضد مرشح للتشخيص النوعي للبروسيلات.

تركز الأبحاث الحالية في تمييز الحمى المالطية على تحديد مستضدات غير متعدد السكاريد الليبيدي لاستخدامها في التشخيص المصلي النوعي للحمى المالطية، حيث يُعتبر استخدام المقايسة المناعية الأنزيمية غير المباشرة ELISA للكشف عن البروسيلا باستخدام البروتينات السيتوبلاسمية كمستضد من أكثر الطرائق نوعية وحساسية للكشف عنها. كما يمكن استخدام هذه المستضدات السيتوبلاسمية كلقاح مستقبلي ضد المرض (لدى الحيوان)، لذا نرى من المفيد جداً البحث عن مستضد سيتوبلاسمي نوعي للبروسيلا، ويمكن استخدامه في الاختبارات المصلية والمقايسة المناعية. وبناءً عليه كان هدف بحثنا عزل المورثة *p39* من البروسيلا السورية لدراسة مدى تطابقها مع المورثة العيارية، ومن ثم دراسة مدى إمكانية استخدام البروتين المترجم منها كمستضد نوعي لتشخيص المرض في أبحاث لاحقة.

المراجع الأجنبية:

1. ALMUNEEF., and ALALOLA , S; 2002. **Brucellosis in children**: clinical observations in 115 cases. *Int. J. Infect. Dis.* (6),182–186.
2. ALMUNEEF, M., MEMISH , Z. A., Al SHAALAN , M., Al BANYAN , E., Al-ALOLA , S., and BALKHY, H. H; 2003. ***Brucella melitensis*** **bacteremia in children**: review of 62 cases. *J. Chemother.* (15),76–80.
3. BALDI , P. C., MIGUEL , S. E., FOSSATI , C. A., and WALLACH , J. C; 1996. **Serological follow-up of human brucellosis by measuring IgG antibodies to lipopolysaccharide and cytoplasmic proteins of *Brucella* species**. *Clin. Infect. Dis.* (22),446-455.
4. CARMICHAEL , L. E., and BRUNER , D. W; 1968. **Characteristics of newly recognized species of Brucella responsible for canine abortions.** *Cornell. Vet.* (48), 579-592.
5. CORBEL, M. J; 1997. **Brucellosis**: an overview. *Emerg. Infect. Dis.* (3),213–221.
6. DELVECCHIO , V. G., KAPATRAL , V., REDKAR , R. J; 2002. **The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis***. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (99),443-448.
7. DENOEL , P. A., Vo, T. K.,. Tibor , A., WEYNANTS , V. E.,. TRUNDE, J. M., DUBRAY , G., IMET , J. N., and LETTESON , J. J; 1997. **Characterization, occurrence, and molecular cloning of a 39-kilodalton *Brucella abortus* cytoplasmic protein immunodominant in cattle**. *Infect. Immun.* (65),495–502.
8. DORNAND , J., Gross , A., Lafont , V., Liautard , J., Oliaro, J., and Liautard , J. P; 2002. **The innate immune response against Brucella in humans**. *Vet. Microbiol.* (90),383–394.
9. EKICI , K., Cosun , H., Z TARAK□□ , E., ONDÜL., SEKEROGLU;2006. **The contribution of herbs to the accumulation of histamine in otlu cheese.** *J Food Biochem.* 30, 362-371.
10. GEORGIOS , P., NIKOLAOS , A., MILE , B., and EPAMEINONDS T; 2005. **Brucellosis**. *The new Eng. J. of Med.* (352),2325-2336.
11. GOTÜZZO , E., Arrillo , C., GUERRA , J., LLOSA , L; 1986. **An evaluation of diagnostic methods for brucellosis- the value of bone marrow culture**. *J Infect Dis.* (153),122-5.
12. HAMDY , M. E. R., EL-GIBALY , S. M., and. MONTASSER , A. M; 2002. **Comparison between immune responses and resistance induced in BALB/c mice vaccinated with RB51 and Rev. 1 vaccines and challenged with *Brucella melitensis* bv. 3.** *Vet. Microbiol.* (88),85–94.
13. MEMISH , Z., MAH , M. W., Al MAHMOUD , S., Al SHAALAN , M., KHAN , M. Y; 2000. ***Brucella*** **bacteraemia: clinical and laboratory observations in 160 patients**. *J Infect.* (40),59-63.
14. MICHAUX-CHARACHON , S., BOURG , G., JUMAS-BILAK , E., GUIGUE-TALET , P., ALLARDET- SERVENT , A., O'CALLAGHAN , D., and RAMUZ , M; 1997. **Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella***. *J. Bacteriol.* (179),3244-3249.

15. MORENO , E., STACKEBRANDT , E., DORSCH , M., WOLTERS , J., BUSCH , M., MAYER , H; 1990. ***Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2 subdivision of the class Proteobacteria.** *J Bacteriol.* (172),3569-3576.
16. PAULSEN , IT., SESHADRI , R., NELSON , KE; 2002. **The *Brucella* suis genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts**. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (99),13148-13153.
17. SANCHEZ , DO., ZANDOENI , RO., CRAVERO , S; 2001. **Gene discovery through genomic sequencing of *Brucella abortus***. *Infect Immun.* (69),865-868.
18. STOENNER , H. G., and LACKMAN , D. B; 1957. **A new species of *Brucella* isolated from the desert wood rat, Neotoma lepida Thomas**. *Am. J. Vet. Res.* (69), 947-951.
19. VASSALLO , D. J; 1996. **The saga of brucellosis: controversy over credit for linking Malta fever with goats' milk**. *Lancet.* (348), 804-808.
20. VERGER , J. M., GRIMONT , F., GRIMONT , P., and GRAYON , M., 1997. **Taxonomy of the genus *Brucella*.** *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* (138), 235-238.
21. VRIONI , G., PAPPAS , G., GARTZONIKA , C., and LEVIDIOTOU , S; 2008. **An eternal microbe: *Brucella* DNA load persists for years after clinical cure**. *Clin. Infect. Dis.* (46), e131-e136.
22. YAGUPSKY , P; 1999. **Detection of Brucellae in blood cultures.** *J Clin Microbiol.* (37),3437-3442.
23. YINGST , S., and Hoover , D. L; 2003. **T cell immunity to brucellosis**. *Crit. Rev. Microbiol.* (29),313–331.

Isolation Of *p39* Gene From Local *Brucella melitensis*

Dr.Sabah Yazajy[4] **Dr.Ayman Al-Mariri**[5] **Dania Awata**[6]

Abstract:

Brucellosis, a bacterial zoonosis, is a disease that is caused by the bacterial genus Brucellae. In humans, it's known as undulant fever or Malta fever, and it is a contagious, costly disease of ruminant animals. **Brucellosis** is an occupational disease for shepherds, abattoir workers, veterinaries, dairy industry professionals, and personnel in microbiologic laboratories.

Diagnostic test for brucellosis remains an elusive target. The sensitivity and specificity of serological tests are not enough to diagnose Brucellosis. Adegradaition of patient case may occure due to False-positive reaction. ***B. melitensis*** is the most virulent and causes the most severe and acute cases of brucellosis.

This investigation was aimed to isolate of *p39* gene from syrian *Brucella melitensis* and compare it with *p39* gene of the standered *Brucella melitensis*16M . Among the results, this project demonctrated that there was complete similarity between the two *p39* genes of the standered *Brucella melitensis*16M and the syrian *Brucella melitensis*, furthermore, A complete similarity to the *p39* gene of *Brucella abortus* was also recognized

Key words: *Brucella melitensis*, Polymerase Chain Reaction.

[4] Prof, Damascus University, Faculty of Agriculture, Department of food science.
[5] Researcher, Atomic Energy commission of Syria, Department of Biotechnology.
[6] Proresearcher assistante, General Commission of Scientific Agriculture Researches , Department of Food Technology.