مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره دوم، شماره هفتم، تابستان ۱۳۹۱

Research Article
مقاله تحقیقی

شناسایی *Brucella.spp* در نمونه های شیر خام و پنیر به وسیله تکنیک Hemi Nested PCR

امیر ایزدی*[۱]، الهام مسلمی[۲]، علی حسین یزدی[۳]

[۱] کارشناس، باشگاه پژوهشگران جوان ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق، تهران، ایران
[۲] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق ، تهران، ایران
[۳] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: *بروسلا* یک کوکوباسیل گرم منفی می باشد که میزبان های آن شامل انسان، گاو، بز و گوسفند می باشد. *بروسلا* از طریق شیر و فراورده های لبنی انتقال یافته و در انسان سبب ایجاد تب مالت می شود. روش های سرولوژیک تشخیص *بروسلا* از حساسیت و دقت کافی برخوردار نبوده و دارای نتایج مثبت و منفی کاذب فراوانی می باشند. هدف از این مطالعه بررسی کارایی تکنیک همی نستد PCR جهت تشخیص *بروسلا* در نمونه های شیر و پنیر می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه ۱۵ نمونه شیر خام، ۱۵ نمونه پنیر پاستوریزه و ۱۵ نمونه پنیر سنتی از سطح استان تهران جمع آوری گردید. DNAی نمونه ها به وسیله کیت DNP استخراج گردید. پس از بهینه نمودن راند اول و دوم تست PCR، حساسیت و اختصاصیت آن مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس تمامی نمونه ها به وسیله تست PCR بهینه شده مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: محصول آمپلیکون تکثیر یافته در محصول اول PCR،۴۴۳ جفت باز و در محصول دوم ۲۲۵ جفت باز بود. حساسیت تست PCR بهینه شده تا ۱۰۰ پارتیکل تعیین گردید. از ۱۵ نمونه شیر خام،۱۰ نمونه PCR مثبت، از ۱۵ نمونه پنیر پاستوریزه ۶ نمونه و از ۱۵ نمونه پنیر سنتی ۸ نمونه PCR مثبت شدند.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج بدست آمده، تست PCR مورد بررسی در این مطالعه از حساسیت و دقت بسیار بالایی نسبت به روش های متواتر برخوردار بوده، همچنین به نظر می رسد ضرورت استفاده از روش های مولکولی به عنوان یک روش تاییدی جهت تشخیص *بروسلا* در کنار روش های متداول غربالگری اجتناب ناپذیر می باشد.

کلمات کلیدی: *بروسلا* ، شیر، پنیر، Hemi Nested PCR

مقدمه

بروسلاها باکتری های گرم منفی کوچک، داخل سلولی اختیاری، شدیداً هوازی و سخت رشدی هستند که در گاو، گوسفند، بز و انسان ایجاد بروسلوز، بیماری مشترک بین انسان و دام می کنند (۷). بروسلاها بر اساس تفاوت در میزبان اصلی و بیماری زایی به شش گونه طبقه بندی می شوند. *بروسلا آبورتوس* عامل تب مالت گاوی می باشد که در انسان ایجاد تب مواج (بروسلوز) می نماید، البته این بیماری توسط گونه های *بروسلا ملی تنسیس، بروسلا سویس و بروسلا کانیس* هم ایجاد می شود (۱۴). گونه های *بروسلا* می توانند در گوشت یخ زده، به مدت سه هفته، در شیر خام به مدت ۱۰ روز، در پنیر تازه تا سه ماه و در بستنی و خامه نیز تا مدتی زنده بمانند. این میکروارگانیسم ها در حرارت ۶۰ درجه سانتی گراد یا در اثر مجاورت با فنول ۱٪ در عرض ۱۵ دقیقه از بین می روند ولی در طبیعت می توانند تا مدت ها زنده باقی بمانند (۴).

آدرس نویسنده مسئول: باشگاه پژوهشگران جوان. دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق ،تهران،ایران
Email: amir_izad@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۰۳/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۴/۰۷

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.7.8.5]

بروسلوز مشکل بهداشتی در سطح جهان است. این بیماری در تمام نقاط دنیا وجود داشته و فقط ۱۷ کشور جهان به عنوان کشور عاری از بروسلوز شناخته شده اند. از طرف دیگر علی رغم کوشش های بسیار جهت ریشه کنی بیماری در بسیاری از کشورها تعداد موارد بروسلوز در حیوانات و انسان رو به افزایش است. یکی از راه های اصلی انتقال بیماری بروسلوز به انسان از طریق مصرف شیر و فرآورده های آن است. در نتیجه این بیماری از نظر بهداشت عمومی بسیار حائز اهمیت است (۸). روش های تشخیص *بروسلا* شامل کشت، روش های سرولوژیک بر مبنای واکنش آنتی ژن آنتی بادی می باشد که شامل تست های مختلفی مانند RBT[2]، SAT[1] کومبس ایمونواسی وابسته به آنزیم و تست پوستی می باشد. علی رغم توسعه فراوان و دسترسی آسان تست های سرولوژیک مشکل مهم این تست ها ایجاد نتایج مثبت کاذب به دلیل واکنش متقاطع با آنتی ژن های سایر میکروارگانیسم ها مانند *یرسینیا انتروکولیتا*[3]، *سالمونلا اورینتالیس*[4]، *ویبرو کلرا*[5]، *فرانسیلا تورانسیس*[6] ، *اشریشیا کلی*[7] می باشد (۲۱، ۱۵). بنابر این ایمنی در مقابل این عوامل باعث ایجاد نتایج مثبت کاذب می شود بعلاوه این روش ها قابلیت تشخیص بیماری در هفته های اول آلودگی را نداشته، بنابراین استفاده از روش های مولکولی به عنوان تست های تاییدی ضرورت یافته است. روش های مولکولی بسیاری، از جمله PCR و مشتقات آن، تکنیک های بر مبنای هیبریداسیون، مالتیپلکس PCR[8]، SNP[9]، NASBA[10] بر مبنای تشخیص اسید نوکلئیک توسعه یافته اند (۹). یکی از مشتقات PCR تکنیک PCR Nested می باشد که راه حلی برای افزایش حساسیت و دقت PCR است و جداسازی محصول اختصاصی مورد نظر را از بین انبوه محصولات غیر اختصاصی میسر می سازد. در این روش از دو جفت پرایمر استفاده می شود طوری که جفت دوم در بین جفت اول جای می گیرند ابتدا پرایمرهای اول (پرایمر بیرونی) اضافه می شوند و باعث تکثیر قطعاتی از DNA می شوند که احتمالا تعدادی از آن ها محصولات غیر اختصاصی اند. محصول PCR واکنش اول به عنوان DNA الگو برای PCR دوم در حضور پرایمرهای داخلی (پرایمردوم) که مکمل قسمت داخلی تر قطعه DNA مورد نظر است مورد استفاده قرار می گیرد. احتمال بسیار ضعیفی وجود دارد که محصولات غیر اختصاصی برای جفت پرایمر داخلی اختصاصی دیگر نیز دارای محل شناسایی باشند نتیجتاً این امر باعث افزایش نسبت محصول واقعی به محصول غیر اختصاصی خواهد شد (۵، ۱۷، ۱۹). هدف از این مطالعه استفاده از تکنیک Hemi Nested PCR به عنوان یک روش مولکولی دقیق برای تشخیص گونه های باکتری بروسلا در نمونه های شیر خام و پنیر است. حساسیت و ویژگی و اختصاصی بودن این روش با استفاده از ۳ پرایمر ویژه، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

تهیه نمونه ها: در این بررسی ۱۵ نمونه شیر خام و ۱۵ نمونه ی پنیر پاستوریزه و همچنین ۱۵ نمونه ی پنیر سنتی از سطح استان تهران جمع آوری گردید.

استخراج DNA از سوش Brucella .spp: برای بهینه نمودن تست PCR جهت تشخیص بروسلا، DNA از سوش استاندارد این باکتری به روش جوشاندن و DNG (cat:DN811530) استخراج گردید.

مواد لازم جهت تست PCR : هر واکنش شامل ۵ میکرولیتر الگو (DNA استخراجی از نمونه)، ۲/۵ میکرولیتر از ۱۰X PCR Buffer ، ۱ میکرولیتر از هر یک از دو پرایمر (Bru Up, Bru Low) ۱۰mM ، ۰/۷۵ میکرولیتر از $MgCl_2$، ۵۰mM، ۰/۵ میکرولیتر از dNTP ۱۰mM، ۰/۴ میکرولیتر Taq DNA Polymerase ۵ u/µl در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر می باشد. واکنش مرحله دوم با همان مقادیر بهینه گردید. در واکنش مرحله دوم به جای DNA الگو از محصول راند اول استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده در مرحله دوم شامل پرایمرهای

1-Serum Agglutination Test
2-Rose Bengal Test
3-Yersina enterocolitica
4-Salmonella Orientalis
5-Vibrio cholera
6-Francisella tularensis
7-Escherichia coli
8-Multiplex PCR
9-Single-nucleotide polymorphism
10-Nucleic acid sequence based amplification

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.7.8.5]

Bru Up, Bru In می باشد. توالی پرایمرها به قرار ذیل می باشد.

Bru Low ۵` GGG CAA GGG TCG GTG TTT۳`

Bru In ۵` GGG ACG GGC AGG CGA GAG۳`

Bru up ۵` GGG CAA GGT GGA AGA TTT ۳`

چرخه دمایی واکنش PCR: در مرحله اول واکنش به صورت دمای دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، چسبیدن در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و پلیمریزاسیون در دمایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه به تعداد ۴۰ سیکل، بهینه گردید. بعلاوه مرحله دوم واکنش به‌صورت دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و چسبیدن در ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و پلیمریزاسیون در دمایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه به تعداد ۴۰ سیکل، بهینه شد (۲۰).

ارزیابی محصول PCR: برای بررسی محصول تکثیر یافته از ژل آگارز ۱/۵٪ استفاده گردید، رنگ آمیزی ژل با استفاده از سایبر گرین ۰/۰۰۰۱ (SYBR safe سیناژن) انجام شد.

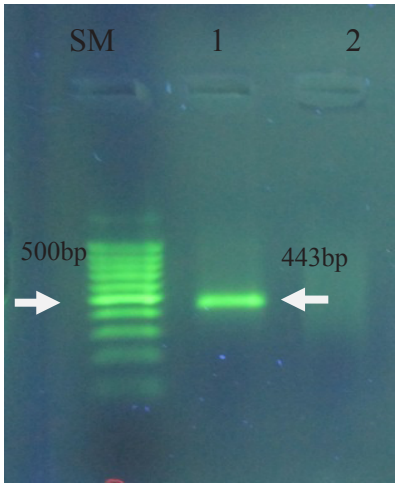
بررسی حساسیت تست PCR: برای برآورد میزان بروسلا در یک حجم معین، از رقت‌های متوالی کشت بروسلا (از ۱ میلیون تا ۱۰ پارتیکل) DNA استخراج و تست PCR با DNAی با تعداد مشخص انجام شد.

بررسی اختصاصیت تست PCR: جهت تأیید تست اختصاصیت، PCR بهینه شده با DNA استخراج شده و چند میکروارگانیسم از جمله ویروس هرپس سیمپلکس *(HSV)*، سایتومگالوویروس *(CMV)*، وارسیلا زوستر *(VZV)*، هپاتیت B *(HBV)*، هپاتیت C *(HCV)*، ساکارومیسس سرویزیه (*Saccharpmices*)،DNA انسانی، DNA موش به همراه کنترل منفی مورد مطالعه قرار گرفت.

انجام تست PCR برای شناسایی بروسلا در نمونه ها: در این مطالعه ۴۵ نمونه DNA محصول لبنی (شامل ۱۵ نمونه شیر خام، ۱۵ نمونه پنیر پاستوریزه، ۱۵ نمونه پنیر سنتی) جمع آوری گردید. DNA ی نمونه های هر جمعیت به عنوان الگو در تست PCR مورد ارزیابی قرار داده شد.

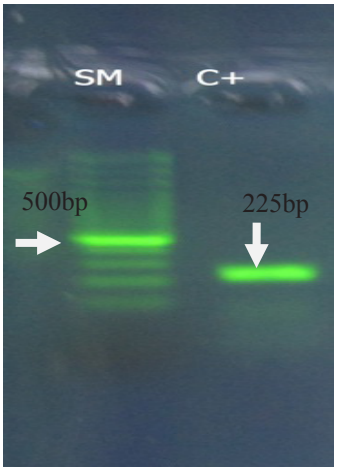
یافته ها

نتیجه بهینه سازی راند اول تست PCR: محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ بارگذاری شد. اندازه قطعه بدست آمده با استفاده از پرایمرهای بیرونی (مرحله اول) bp ۴۴۳ می باشد (شکل ۱).



شکل ۱- SM) مارکر مولکولی bp DNA Ladder ۱۰۰، ۱) قطعه تکثیر شده ،۲) کنترل منفی .

نتیجه بهینه سازی محصول مرحله دوم تست PCR: DNA الگوی مورد استفاده در این واکنش، محصول واکنش مرحله اول می باشد. محصول تکثیر شده را در کنار نمونه کنترل منفی و سایز مارکر بر روی ژل الکتروفورز مورد ارزیابی قرار داده شد. همان طور که در شکل ۲ مشاهده می شود باند حاصل از محصول PCR، در مرحله دوم واکنش ۲۲۵ جفت باز طول داشت.



شکل ۲- SM) مارکر مولکولی bp DNA Ladder ۱۰۰ c،) نمونه کنترل مثبت .

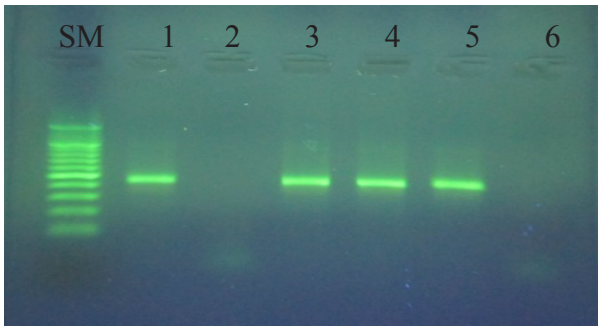
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.7.8.5]

نتایج مربوط به آزمون های PCR انجام شده بر روی نمونه های شیرخام: از ۱۵ نمونه شیر غیر پاستوریزه (خام) در ۵ نمونه (۳۳/۳۳٪) در دور اول تست PCR مثبت ارزیابی گردید. از این نمونه ها، ۱۰ مورد (۶۶/۶۶٪) در راند دوم مثبت شدند.

نتایج مربوط به آزمون های PCR انجام شده بر روی نمونه های پنیر پاستوریزه: از ۱۵ نمونه پنیر پاستوریزه ۱ نمونه (۶/۶٪) در دور اول تست PCR مثبت ارزیابی گردید. از این تعداد ۶ نمونه (۴۰٪) در دور دوم مثبت ارزیابی گردید.

نتایج مربوط به آزمون های PCR انجام شده بر روی نمونه های پنیر سنتی: از ۱۵ نمونه پنیر سنتی در ۴ نمونه (۲۶/۶٪) در دور اول تست PCR مثبت ارزیابی گردید. در تست PCR دور دوم ۸ نمونه (۵۳/۳۳٪) مثبت شدند. در شکل ۳ نتایج چند نمونه PCR مرحله اول نمونه های شیر خام، پنیر سنتی و پاستوریزه نمایش داده شده است .



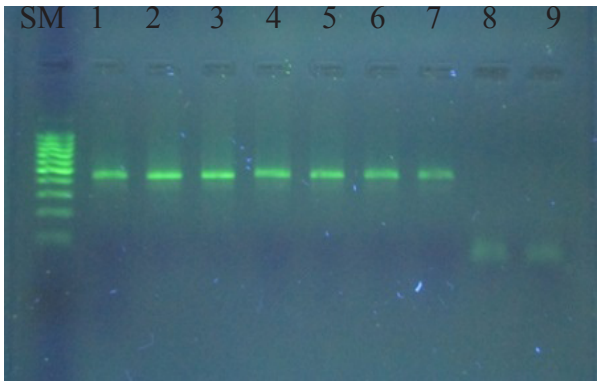
شکل ۳- SM) مارکر مولکولی ۱۰۰bp DNA Ladder، ۱) نمونه کنترل مثبت ،۲) شیر خام (PCR منفی) ، ۳) پنیر سنتی (PCR مثبت)،۴) پنیر پاستوریزه (PCR مثبت)، ۵) شیر خام (PCR مثبت)، ۶) کنترل منفی .

نتیجه تعیین اختصاصیت آزمون PCR بهینه شده: برای تعیین اختصاصیت تست PCR بهینه شده تا ۱۰۰ پارتیکل محاسبه گردید (شکل ۴).

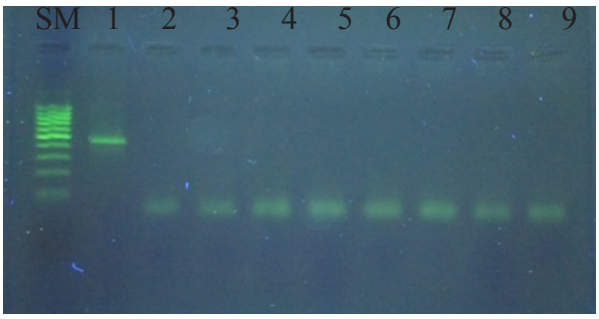
تست PCR بهینه شده از اختصاصیت بسیار بالایی برخوردار بود به طوری که به جز DNA بروسلا با هیچ کدام از DNA های مورد مطالعه واکنشی صورت نگرفت (شکل ۵).

بحث

شیر و فراورده های لبنی به لحاظ دارا بودن ارزش غذایی بالا، در تغذیه انسان دارای نقش به سزایی هستند. از سوی دیگر به علت



شکل ۴- SM) مارکر مولکولی ۱۰۰bp DNA Ladder، ۱) کنترل مثبت،۲) نمونه حاوی۴ میلیون پارتیکل، ۳) ۲میلیون پارتیکل، ۴) ۱ میلیون پارتیکل، ۵) ۱۰۰۰۰ پارتیکل، ۶) ۱۰۰۰ پارتیکل، ۷)۱۰۰ پارتیکل، ۸) ۱۰ پارتیکل، ۹) کنترل منفی .



شکل ۵- SM) مارکر مولکولی ۱۰۰bp DNA Ladder، ۱) کنترل مثبت،۲)DNA موش، ۳) انسان، ۴) *اشرشیا کلی، ۵) ساکارومیسس سرویزیه، ۶) ویروس هپاتیت C، ۷) مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ۸) توکسوپلاسما گوندی*، ۹) کنترل منفی.

دارا بودن اکثر عناصر و ترکیبات غذایی ، محیط بسیار خوبی جهت رشد و فعالیت بسیاری از میکروارگانیسم های بیماری زا می باشند. بنابراین عدم رعایت اصول بهداشتی در تهیه و نگهداری فراورده های لبنی، عوارض و خطرات بهداشتی عدیده ای را در مصرف کنندگان این قبیل مواد غذایی به همراه خواهد داشت. بروسلوز یکی از خطرناک ترین بیماری های عفونی است که از طریق مصرف شیر و فراورده های لبنی آلوده به انسان انتقال می یابد. پنیرهای تازه به دلیل آن که از شیر غیر پاستوریزه تهیه و نیز فرایند تخمیری در آن به طور کامل صورت نمی گیرد. در صورت آلوده بودن، به راحتی عامل تب مالت را در خود حفظ نموده و به مصرف کنندگان آن منتقل می نماید. از آنجایی که عامل بیماری بروسلوز (تب مالت) از طریق ترشحات شیر دام های آلوده دفع می گردد، مصرف

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.7.8.5]

فراورده های شیری غیر پاستوریزه در مناطق آلوده به بروسلوز یکی از عمده ترین راه های انتقال بیماری تب مالت به انسان محسوب می شود. عامل بیماری بروسلا یک کوکوباسیل کوچک، غیر متحرک، گرم منفی و بدون اسپور می باشد که در محیط هوازی رشد می نماید. در مقابل خشک شدن نسبتاً مقاوم بوده و مدت طولانی در دمای پایین زنده می ماند، مواد ضد عفونی کننده مانند فرمالدئید، هیپوکلریت و فنل میکروارگانیسم را از بین می برند. این میکروب با پاستوریزاسیون نیز کشته می شود (۱، ۱۳، ۲۲). مصرف شیر خام و فراورده های لبنی آلوده غیر پاستوریزه و یا نجوشیده مانند، خامه، پنیر تازه، بستنی، آغوز، معمول ترین و مهم ترین راه انتقال بیماری می باشد. همچنین مصرف فراورده های حیوانی آلوده سبب بروز بیماری در انسان می شود. مواد غذایی سنتی، نقش مهمی در انتقال بیماری دارند. با تحقیقات انجام شده توسط محققین، از ۷٪ پنیرهای تازه محلی عرضه شده در مغازه های مختلف موادغذایی در ایران، باکتری نوع بزی جداشده است. همچنین امکان جدا سازی این باکتری تا ۱۱ هفته پس از تولید پنیر، از این فرآورده وجود داشته است (۲). گسترش جهانی بروسلوز، این بیماری را هنوز از معضلات جدی سلامتی در انسان و حیوانات اهلی بشمار می آورد. اگرچه آمار انتشار یافته از شیوع این بیماری در کشورهای مختلف متفاوت است ، شیوع دقیق بروسلوز انسانی مشخص نیست ،اما آمار انتشار یافته بین ۰/۰۱ تا ۲۰۰ مورد و در ایران ۱۳۲/۴ در ۱۰۰۰۰۰ جمعیت است. لذا کنترل بیماری از اهمیت خاصی برخوردار است (۲، ۱۳). روش های سرولوژیک تشخیص بروسلوز انسانی شامل آزمایش های رز بنگال، سروآگلوتیناسیون، رایت، ۲- مرکاپتواتانول، ثبوت عناصر مکمل و آنتی گلوبولین کومبس صورت می گیرد. اکثر بیماران مبتلا به بروسلوز حاد در تمامی آزمایش ها واکنش مثبت نشان می دهند. معمولاً آزمایش های رزبنگال و رایت به جهت آنکه هر دو ایمونوگلوبولین G و M در آن ها دخالت دارند زودتر از دیگر آزمایش ها واکنش نشان می دهند. در آزمایش های ۲- مرکاپتواتانول و ثبوت عناصر مکمل IgG مداخله نموده که از نظر تفکیک وضعیت ایمنی یا عفونت مفید می باشد. در مواردی که آنتی بادی ها وجود داشته باشند آگلوتیناسیون واضح ایجاد نمی نمایند آزمایش کومبس از ارزش خاصی برخوردار است. آنتی ژن های بروسلا، آنتی ژن های A و M هستند که به لیپو پلی ساکارید دیواره سلول باکتری مربوط می باشد. ضمناً بروسلا آنتی ژن مشترک با ویبره کلرا داشته و واکسیناسیون بر علیه و با تیتر آنتی بادی بروسلا را به صورت کاذب با بعضی از آنتی ژن ها ساخته شده بالا می برد (۱۰،۶، ۱۱). مهم ترین شکل استفاده از روش های سرولوژیک نتایج مثبت کاذب ناشی از واکنش متقاطع سایر آنتی بادی های باکتری ها با آنتی ژن بروسلا می باشد. بنابر این به منظور تشخیص دقیق بروسلوز بکارگیری روش های مکمل روش های سرولوژیک باید بکار گرفته شود (۳،۱۱، ۱۶). اکبر مهر در سال ۱۳۸۰، میزان آلودگی پنیرهای محلی تازه شهرستان سراب را به بروسلا مورد بررسی قرار داد. مطالعات وی نشان داد که ۱۰۰۰ نمونه پنیر محلی مورد مطالعه ۳۲ نمونه به بروسلا آلوده بودند که از این تعداد ۷ نمونه به *بروسلا ملی تنسیس* و ۱۵ نمونه به *بروسلا آبورتوس* آلوده بودند. روش مورد استفاده در این مطالعه کشت در محیط آگار اکسپاندا بود (۱). حسین دوست و همکاران در ۱۳۸۴ دو روش کشت و PCR را برای تشخیص *بروسلا آبورتوس* مورد بررسی قرار دادند . آن ها ژن ISV11 را هدف قرار دادند. نتایج مطالعات آن ها نشان داد که از ۴۲ نمونه سرولوژیک مثبت، تنها ۶ نمونه کشت مثبت بودند. به علاوه نتایج مطالعات آن ها نشان داد که حساسیت کشت ۴۰٪ و حساسیت PCR ۶۰٪ دیده شد (۱۲). پیری دوگاهه و همکاران در سال ۱۳۸۹ از تکنیک PCR برای تشخیص بروسلوز انسانی در نمونه های سرم و خون استفاده نمودند. ژن هدف مورد مطالعه آن ها پروتئین ۳۱ KDa آنتی ژن بروسلا بود و نتایج مطالعه آن ها نشان داد که از ۱۰۲ فرد مشکوک به بروسلوز، ۵۶ نمونه خون و ۶۸ نمونه سرم PCR مثبت بودند. آن ها بیان کردند که حساسیت تست PCR تهیه شده در این مطالعه حساسیت بالاتری بر روی سرم نسبت به خون کامل دارد (۱۸). در این مطالعه از تکنیک Nested PCR استفاده شد که نسبت به PCR از حساسیت و اختصاصیت بسیار بالاتری برخوردار بود چرا که از ۳ پرایمر استفاده کرده و احتمال ایجاد نتایج غیر اختصاصی به مراتب کاهش می یابد. بعلاوه با استفاده از دو مرحله PCR پی در پی حساسیت تست به شدت افزایش یافت

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.7.8.5]

به طوری که تعداد نتایج مثبت در مرحله دوم بیشتر از مرحله اول دیده شد. نمونه هایی که در مرحله اول به دلیل مقدار کم DNA و واکنش ضعیف منفی گزارش شده بودند در مرحله دوم واکنش شدت یافته بطوری که در مرحله دوم نتیجه واکنش مثبت شد. تاکنون هیچ مطالعه ایی در ایران با استفاده از پرایمرهای مورد بررسی در این مطالعه صورت نگرفته و از این جهت این بررسی دارای تازگی و نو آوری می باشد. با توجه به نتایج می توان بیان کرد تکنیک Nested PCR یک روش قابل اطمینان با حساسیت و دقت بالاست به طوری که قادر به شناسایی عامل بیماری زا حتی در نمونه های پنیر پاستوریزه است. همچنین نتایج نشان می دهد که که درصد زیادی از نمونه های شیر خام در گاوداری ها به بروسلا آلوده هستند که این امر یک هشدار برای استفاده از روش های موثر جهت از بین بردن عوامل بیماری زا به حساب می آید. بعلاوه نتایج تست بر روی پنیرهای سنتی نشان دهنده عدم سلامت قسمت عمده ای از این پنیرها در سطح شهر بوده که باید فرآیند تولید این پنیرها به طور جدی تغییر یابد. متاسفانه در تعداد زیادی از پنیرهای پاستوریزه نیز نتیجه واکنش مثبت شد که یک فاکتور نگران کننده از جهت بهداشت عمومی به حساب می آید. به نظر می رسد فرایند پاستوریزاسیون این پنیرها از کیفیت لازم برخوردار نبوده و باید در روش های پاستوریزاسیون پنیرها تجدید نظر شود اگر چه باید حضور فرم های زنده اما غیر قابل کشت نیز مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج می توان بیان نمود که تست PCR مورد بررسی در این مطالعه از حساسیت و دقت بسیار بالایی برخوردار است همچنین به نظر می رسد روش های مولکولی باید به عنوان روش هایی مکمل جهت تشخیص بروسلا در کنار روش های رایج مورد استفاده قرار گیرند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مسئولین باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق که در انجام این طرح ما را یاری کرده و هزینه های این پروژه را تامین نمودند تشکر و قدردانی می شود.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.7.8.5]

منابع

(1) Akbarmehr J. Survery on the Contamination of Fresh White Cheese Produced in Sarab and Rural Area with Brucella Spp. J Fac Vel Med Univ Tehran, 2003; 58:3:203-206.
(2) Akbarmehr J, KhandaghiJ. A Survey on the Prevalence of Salmonella and Coliforms in Unpasteurized Iranian Cheese Using Conventional Culture Method. Afr J Microbiol Res, 2012; 6(5): 968-971.
(3) Al-Mariri A, H aj-Mahmoud N. Detection of Brucella Abortusin Bovine Milk by Polymerase Chain Reaction. ACTA VET BRNO, 2010; 79: 277-280.
(4) Al Dahouk S, Tomaso H, Nöckler K, Neubauer H, Frangoulidis D. Laboratory-Based Diagnosis of Brucellosis--A Review of the Literature. Part II: Serological Tests for Brucellosis. Clin Lab, 2003; 49(11-12):577-89.
(5) Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, Stoker NG. Detection of Brucella Melitensis and Brucella Abortus by DNA Amplification. J Trop Med Hygiene, 1992; 95:271-275.
(6) Bricker BJ. PCR As a Diagnostic Tool for Brucellosis. Vet. Microbiol, 2002; 90: 435-446.
(7) Cutler SJ, Whatmore AM, Commander NJ. Brucellosis New Aspects of an Old Disease. J Appl Microbiol, 2005; 98: 1270-1281.
(8) Erdenebaatar J. Epidemiological and Serological Survey of Brucellosis in Mongolia by ELISA Using Sarcosine Extracts. Microbiol Immunol, 2004; 48(8):571-7.
(9) Gopaul KK, Kolass MS, Smith CJ, Whatmore AM. Rapid Identification of Brucella Isolates to the Species Level by Real Time PCR Based Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Analysis. BMC Microbiol, 2008; 8: 86.
(10) Gulst ST, Khan A. Epidemiology and Epizootology of Brucellosis: A Review. Pakistan Vet J, 2007; 27(3): 145-151.
(11) Hosseini-Doust SR , Ahmadi A , Ahmadi Z ,Hajia M, Safiri Z, Golmanesh L . Detection of Brucella Abortus by PCR Assay and Comparison with Culture Assay. Journal of Military Medicine, 2005; (3):239-245.
(12) Hosseini Doust SR, Ahmadi Z, Ahamdi A, Hajia M, Izadi M, Mohabati Mobarez A. Detection of Brucella Abortus by AlkB and IS711 Based Primers. JRMS, 2007;12(2): 62-67.
(13) Kazemi B, Yousefi Namin SA, Dowlatshahi M, Bandepour M, Kafilzadeh F, Gachkar L, Mahmoudinejad F, Samarghandi A, Mardani M. Detection of Brucella by Peripheral Blood PCR and Comparison with Culture and Serological Methods in Suspected Cases. Iranian J Publ Health, 2008; 37:4:96-102.
(14) Kechagia1 M, Mitka S, Papadogiannakis E, Kontos V, Koutis C. Molecular Detection of Brucella spp. DNA in Patients with Manifestations Compatible with Emotional Disorders. Open Infect Dis J, 2011; 5: 8-12.
(15) Memish ZA, Almuneef M, Mah MW, Qassem LA, Osoba AO. Comparison of the Brucella Standard Agglutination Test with the ELISA IgG and IgM in patients with Brucella Bacteremia. Diagn Microbiol Infect Dis, 2002; 44: 129-132.
(16) Mensah G, Kwasi Addo K. Brucella Abortus Antibodies in Raw Cow Milk Collected from Kraals. J Basic Appl Sci Res, 2011; 8: 942-947.
(17) Nielsen K. Diagnosis of Brucellosis by Serology. Vet. Microbiol, 2002; 90: 447-459.
(18) Peeri Dogaheh H, Valinejad Z, Pourfarzi F. Evaluation of Three DNA Extraction Methods for Detection of Brucella DNA in Human Serum Samples. AMUJ ,2012; 14(6) 3: 40-48
(19) Shareef JM. A Review of Serological Investigations of Brucellosis among Farm Animals and Humans in Northern Provinces of Iraq (1974– 2004). J Vet Med, 2006; 53: 38–40.
(20) Tantillo G, Di Pinto A, Buonavoglia C. Detection of Brucella Spp. in Soft Cheese by Semi- Nested Polymerase Chain Reaction. J Dairy Res, 2003; 70: 245-247.
(21) Wright PF, Tounkara K, Lelenta M, Jeggo MH. International Reference Standards: Antibody Standards for the Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Rev Sci Tech, 1997; 3: 824-832.
(22) Xavier M, Paixão T, B. den Hartigh A, Tsolis R, Santos R. Pathogenesis of Brucella Spp. Open Vet Sci J, 2010; 4: 109-118.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.7.8.5]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1391.2.7.8.5] [Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-11-05]