مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره سوم، شماره یازدهم، تابستان ۱۳۹۲

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

مطالعه و شناسایی مولکولی Brucella spp در محصولات لبنی توسط تکنیک Nested PCR

امیر ایزدی[1*] ، الهام مسلمی[2]

[1] کارشناس زیست شناسی. دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد تهران شرق ، باشگاه پژوهشگران جوان
[2] استادیار گروه زیست سلولی مولکولی. دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد تهران شرق ، گروه زیست شناسی

چکیده

سابقه و هدف: بروسلا یک کوکوباسیل گرم منفی است که میزبان های آن شامل انسان، گاو، بز، گوسفند و اسب می باشند. بروسلا از طریق شیر و فرآورده های لبنی انتقال یافته و در انسان سبب ایجاد تب مالت می شود. روش های سرولوژیک تشخیص آن از حساسیت و دقت کافی برخوردار نبوده، علاوه بر آن، دارای نتایج مثبت و منفی کاذب فراوانی می باشند. هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع بروسلا در برخی از محصولات لبنی توسط تکنیک Nested PCR و تعیین حساسیت و دقت این تکنیک می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه ۲۰۸ نمونه از محصولات لبنی شامل: ۵۷ نمونه شیر خام گاو ، ۳۴ نمونه شیر پاستوریزه ، ۲۸ نمونه پنیر پاستوریزه ، ۲۳ نمونه پنیر سنتی، ۳۳ نمونه شیر خام بز و ۳۳ نمونه شیر خام گوسفند، از سطح استان تهران جمع آوری گردید. DNA نمونه ها به وسیله کیت DNP (Cinna gene, Iran) استخراج شد. سپس تست Nested PCR با کمک پرایمرهای اختصاصی بهینه گردید، حساسیت و اختصاصیت تکنیک مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: بررسی ها نشان داد از ۵۷ نمونه شیر خام گاو، ۱۹ نمونه ، ۳۴ نمونه شیر پاستوریزه، ۱۰ نمونه، همچنین ۲۸ نمونه پنیر پاستوریزه فقط ۸ نمونه، ۲۳ نمونه پنیر سنتی، ۱۴ نمونه ۳۳ نمونه شیر خام بز، ۲۱ نمونه و در آخر از ۳۳ نمونه شیر خام گوسفند ، ۱۹ نمونه PCR مثبت شدند.

نتیجه گیری: نتایج نشان می دهد، تکنیک Nested PCR مورد بررسی در این مطالعه از حساسیت و دقت بالایی برخوردار است. از این رو، به نظر می رسد ضرورت استفاده از روش های مولکولی به عنوان یک روش تاییدی جهت تشخیص بروسلا در کنار روش های متداول غربال گری امری ضروری می باشد.

کلمات کلیدی: بروسلا، محصولات لبنی، Nested PCR

مقدمه

بروسلا انگل اجباری حیوانات و انسان بوده و از مشخصات آن، زیستن درون سلولی می باشد. بروسلا، هوازی و گرم منفی است. این ارگانیسم بدون اسپور بوده و کپسول در کلنی صاف یا مخاطی آن مشاهده می شود (۹). گرچه برای هر یک از انواع بروسلا، یک میزبان منتخب وجود دارد، با این وصف همگی آن ها قادر به آلوده کردن انواع حیوانات و انسان ها می باشند (۴). شروع بیماری تدریجی بوده و با بیحالی عمومی، تب، ضعف، درد و تعریق همراه است. تب معمولاً در عصرها بالا رفته و هنگام شب کاهش می یابد که این امر با تعرق شدید همراه است. علائم گوارشی و عصبی هم ممکن است وجود داشته باشد. شایع ترین روش آلودگی، از راه دستگاه گوارشی (خوردن شیر آلوده و فرآورده های لبنی آلوده)، از راه مخاط (قطرات) و پوست (تماس با بافت های حیوانات آلوده) می باشد. در اوایل بیماری، آزمون های سرولوژیک می تواند منفی باشد و در نتیجه، تست های آزمایشگاهی باید پس از ۱-۲ هفته در موارد مشکوک تکرار شود (۱۵، ۱۴). از یک طرف، تشخیص آنتی بادی های ضد بروسلا به تنهایی شاخصی برای حضور پاتوژن نمی باشد. از سوی دیگر، تیتر بالای آنتی بادی بعد از درمان، که اغلب به فاز اولیه بیماری مربوط می باشد همیشه نشانه ای از شکست درمان اولیه، بیماری مزمن و یا حاد

آدرس نویسنده مسئول :گروه زیست شناسی- باشگاه پژوهشگران جوان -دانشگاه آزاد اسلامی ، واحد تهران شرق
Email : amir_izad@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۱۲/۰۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۲/۹

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-04-13]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.11.11.3]

نمی باشد. از آنجایی که اپی توپ پلی ساکارید O بروسلا با اپی توپ های بسیاری از باکتری ها، مانند: O9 *یرسینیا انتروکولیتیکا*، گروه N *سالمونلا اوربانا*، *ویبرو کلرا*، *فرانسیسلا تولارنسیس*، *اشرشیاکلی*O157، تشابه دارد، احتمال وقوع واکنش های متقاطع زیادی وجود دارد. بنابراین تست های بر مبنای تشخیص LPA[1] از اختصاصیت بسیار کمی برخوردار هستند (۱۶). روش های مولکولی بسیاری، از جمله PCR و مشتقات آن، تکنیک های بر مبنای هیبریداسیون، مالتیپلکس PCR[2] ، SNP[3]، NASBA[4] بر مبنای تشخیص اسید نوکلئیک توسعه یافته اند (۲۲). ثابت شده که PCR در تشخیص آزمایشگاهی بروسلوز انسانی حاد و مزمن بسیار حساس تر از کشت خون عمل کرده است و به علاوه نسبت به تست های سرولوژیک بسیار اختصاصی تر می باشد. علاوه بر این، کار بر روی DNA، باعث کاهش خطر ابتلا به عفونت آزمایشگاهی ناشی از کشت عامل زنده می شود (۸). تکنیک Nested PCR یکی از مشتقات PCR است که راه حلی برای افزایش حساسیت و دقت PCR بوده و جداسازی محصول اختصاصی مورد نظر را از بین انبوه محصولات غیر اختصاصی میسر می سازد (۶،۷،۲۰). سالانه حدود ۲۳ هزار مورد جدید بیماری تب مالت در کشور گزارش شده است که اگرچه با گذشت زمان انتظار کاهش آن وجود دارد اما همچنان در کشور ما، بروسلوز به عنوان یکی از بیماری های مهم و خطرناک مشترک بین انسان و دام مطرح است (۲۰) و ضرورت بررسی میزان آلودگی محصولات لبنی امری مهم در پیشگیری و کاهش ابتلا به بروسلا به حساب می آید(۲۵). هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع گونه های باکتری بروسلا در برخی محصولات لبنی جمع آوری شده از سطح تهران توسط تکنیک Nested PCR می باشد.

مواد و روش ها

نام پرایمرها	توالی
Outer Primer F	5`AAGGG CAAGG TGGAA GATTT 3`
Outer Primer R	5`CCTCG TTCCA GAGAA CCTTG 3`
Inner primer F	5`GCGTA AGGAT GCAAA CATCA 3`
Inner primer R	5`AGATC GGAAC GAGCG AAATA 3`

جدول ۱- توالی پرایمرهای Nested PCR

تهیه نمونه ها: در این بررسی ۵۷ نمونه شیر خام گاو، ۳۴ نمونه شیر پاستوریزه، ۲۸ نمونه پنیر پاستوریزه، ۲۳ نمونه ی پنیر سنتی، ۳۳ نمونه شیر خام بز و ۳۳ نمونه شیر خام گوسفند 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(Cinna gene, Iran) DNG استخراج شد.

مواد لازم جهت تست Nested PCR: هر واکنش شامل ۵ میکروگرم DNA الگو (DNA استخراجی از نمونه معادل ۵ نانوگرم) ، 1X PCR Buffer ، ۰/۴ میکرومول پرایمرهای خارجی F^6,R^5 ، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی مولار dNTP[7] (dATP, dCTP, dGT, dTTP)، ۲ واحد Taq DNA Polymerase 5u/µl در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر می باشد. واکنش مرحله دوم با همان مقادیر بهینه گردید. در واکنش مرحله دوم به جای DNA الگو، ۵ میکرولیتر از محصول راند اول استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده در مرحله دوم، شامل پرایمرهای داخلی (Inner F,R) می باشد. توالی پرایمرهای Nested PCR و همچنین جایگاه شماتیک پرایمرها به شرح زیر می باشد (جدول ۱، شکل ۱).

F: Forward, R: Reverse

شکل ۱ - نمایش جایگاه شماتیک پرایمرها در Nested PCR

۱. Outer Primer F، ۲. Outer Primer R، ۳. Inner Primer F، ۴. Inner Primer R

چرخه دمایی واکنش Nested PCR: در مرحله اول واکنش به صورت دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، در ادامه به تعداد ۴۰ سیکل دناتوراسیون در دمای ۹۴

1- Lipoply Sacharide A
2-Multiplex PCR
3-Single-nucleotide polymorphism
4-Nucleic acid sequence based amplification
5-Reverse
6-Forward
7-Deoxynucleoside triphosphate

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-04-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.11.11.3]

درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۶/۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱دقیقه و پلی مریزاسیون در دمایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، بهینه گردید. به علاوه مرحله دوم واکنش به صورت دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و چسبیدن در ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه و پلی مریزاسیون در دمایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه به تعداد ۳۰ سیکل، بهینه شد.

ارزیابی محصول PCR: برای بررسی محصول تکثیر یافته از ژل آگارز ۲٪ استفاده گردید، رنگ آمیزی ژل با استفاده از سایبر گرین ۰/۰۰۰۱(SYBR safe سیناژن) انجام شد و پس از الکتروفورز توسط نور U.V مورد بررسی قرار گرفت.

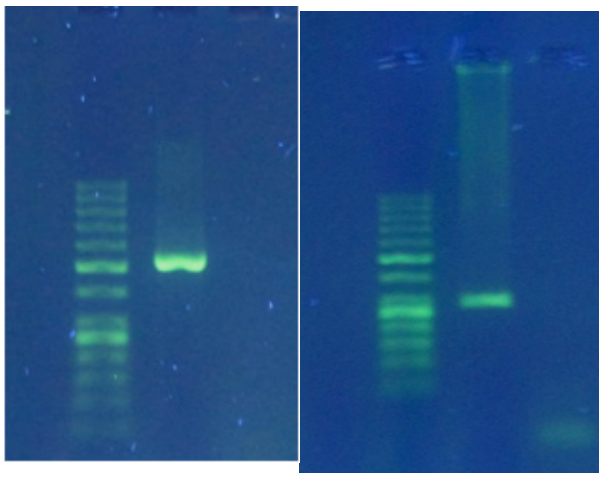
انجام تست PCR برای شناسایی بروسلا در نمونه ها: پس از بهینه شدن تست PCR ،DNAی ۲۰۸ نمونه محصول لبنی شامل ۵۷ نمونه شیر خام گاو، ۳۴ نمونه شیر پاستوریزه، ۲۸ نمونه پنیر پاستوریزه، ۲۳ نمونه پنیر سنتی، ۳۳ نمونه شیر خام بز و ۳۳ نمونه شیر خام گوسفند به وسیله این تست مورد ارزیابی قرار گرفتند.

تعیین حساسیت و اختصاصیت تست Nested PCR : به منظور تعیین حساسیت تست بهینه شده، رقت های از DNA از ۱ میلیون CFU تا ۴ CFU تهیه گردید. برای تایید اختصاصیت تست، DNA های موش (Mouse) ، انسان (Human)، سوش *سالمونلا (salmonella spp.)*، سوش *شیگلا (shigella spp.)* *ساکارومیسس سرویزیه (Saccharomyces cerevisiae)* و *اشرشیا کلی (Escherichia coli)* و *توکسوپلاسما گوندی (Toxoplasma gondii)* مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته ها

نتیجه بهینه سازی راند اول و دوم تستNested PCR

محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۲٪ بارگذاری شد و اندازه قطعه تکثیر شده با استفاده از پرایمرهای بیرونی (مرحله اول) ۵۲۳ جفت باز بود. محصول تکثیر شده در مرحله دوم با پرایمرهای داخلی (مرحله دوم) ۲۷۵ جفت باز طول داشت. شکل ۲ محصول مرحله اول و دوم واکنش را در کنار نمونه کنترل منفی و مارکر مولکولی نشان می دهد.



شکل ۲- SM. مارکر مولکولیDNA 50bp (Fermentas, USA) Ladder، ۱) قطعه تکثیر شده (سمت چپ محصول تکثیر شده در مرحله اول و سمت راست محصول تکثیر شده در مرحله دوم) ، ۲) کنترل منفی

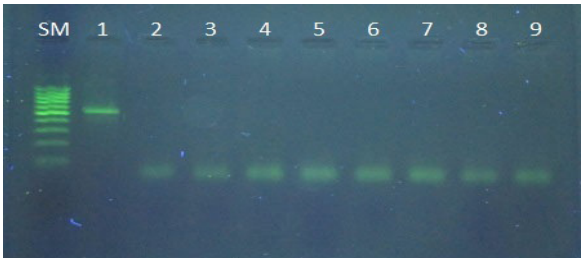
نتیجه مرحله اول و دوم تست Nested PCR بر روی نمونه های مورد آزمایش: نتایج، تعداد و درصد آلودگی نمونه های مختلف محصولات لبنی در جدول ۲ و شکل ۳و۴ نشان داده شده است.

جدول ۲- تعداد نتایج مثبت نمونه های مورد مطالعه در مرحله اول و دوم Nested PCR

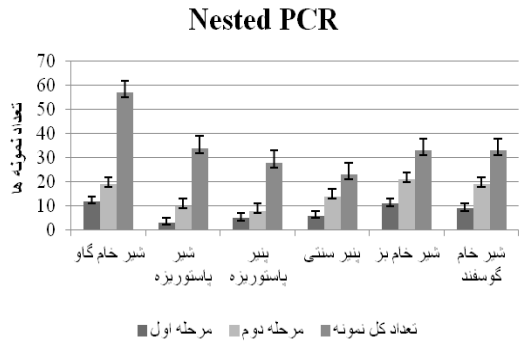
نمونه ها (تعداد)	نتایج مرحله Nested PCR اول و دوم	
	مرحله اول (درصد)	مرحله دوم (درصد)
شیر خام گاو (۵۷)	۱۲(٪۲۱)	۹ (٪۳۳)
شیر پاستوریزه (۳۴)	۳ (٪۹)	۱۰ (٪۲۹)
پنیر پاستوریزه (۲۸)	۵ (٪۱۸)	۸ (٪۲۸)
پنیر سنتی (۲۳)	۶ (٪۲۶)	۱۴ (٪۶۰)
شیر خام بز (۳۳)	۱۱(٪۳۳)	۲۱ (٪۶۳)
شیر خام گوسفند (۳۳)	۹ (٪۲۷)	۱۹ (٪۵۷)

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-04-13]

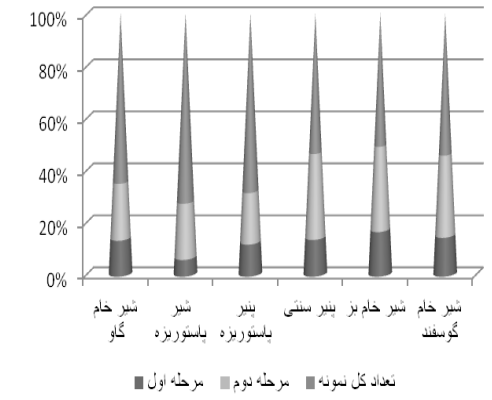
[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.11.11.3]



شکل ۶- SM) سایز مارکر فرمنتاس ۱۰۰bp DNA Ladder ۱) کنترل مثبت ۲) DNA موش ۳) انسان ۴) *اشرشیا کلی* ۵) *ساکارومیسس سرویزیه* ۶)سوش *سالمونلا* ۷)سوش شیگلا ۸) توکسوپلاسما گوندی ۹)کنترل منفی.



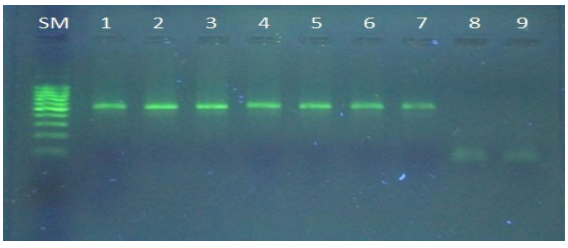
شکل ۳ - نمودار نتایج مثبت مرحله اول و دوم Nested PCR



شکل ۴- نمودار مقایسه درصد آلودگی محصولات لبنی در مرحله اول و دوم Nested PCR

نتایج تعیین حساسیت و اختصاصیت تست Nested PCR :

تست Nested PCR بهینه شده در این مطالعه از ویژگی بسیار بالایی برخوردار می باشند، بطوری که فقط با DNA بروسلا واکنش اختصاصی نشان داده و با DNA سایر میکروارگانیسم های مورد مطالعه هیچ محصولی با اندازه محصول مورد نظر مشاهده نشد (شکل۵ نتیجه تست حساسیت برای مرحله اول). حساسیت تست Nested PCR بهینه شده تا ۴۰ CFU تعیین گردید (شکل ۶).



شکل ۵- SM) مارکر مولکول فرمنتاس 100bp DNA Ladder ۱) کنترل مثبت، ۲) نمونه حاوی۱ میلیون CFU ۳) ۱۰۵ CFU ۴) ۱۰۴ CFU، ۵) ۱۰۳ CFU، ۶) ۱۰۰ CFU ۷) ۴۰ CFU، ۸) ۴ CFU، ۹)کنترل منفی.

بحث

شیر و فراورده های لبنی به لحاظ دارا بودن ارزش غذایی بالا، در تغذیه انسان دارای نقش بسزایی هستند (۱). در سال های اخیر مصرف شیر با توجه به ارزش غذایی آن در کشور ما رو به افزایش بوده و در نتیجه بررسی میزان میکروارگانیسم های پاتوژن و مولد آلودگی، بسیار حائز اهمیت است. از طرفی، کیفیت شیر خام بر کیفیت شیر پاستوریزه تأثیر بسزایی دارد (۳). بروسلا پارازیت داخل سلولی در انسان و حیوانات بوده که باعث بروز عفونت، بخصوص در سیستم رتیکولواندوتلیال و دستگاه تناسلی می گردد. بروسلوز بیماری تب داری است که در فواصل نسبتاً منظم تسکین می یابد (۲۴). به دلیل عدم تشخیص به موقع و صحیح بیماری، ابتلا به بروسلوز همچنان وجود دارد بطوری که در مناطق خاصی بروسلوز به عنوان یک مشکل مهم بهداشت عمومی مطرح می شود. این بیماری در خاورمیانه آندمیک است. تماس شغلی، مصرف شیر خام، فرآورده های لبنی آلوده و غیر پاستوریزه مانند: شیر، خامه، پنیر تازه، بستنی، آغوز، معمول ترین و مهم ترین راه انتقال بیماری می باشد. همچنین مصرف فرآورده های حیوانی آلوده سبب بروز بیماری در انسان می شود (۱۱). با توجه به تحقیقات انجام شده توسط محققین، از ۷٪ پنیرهای تازه محلی عرضه شده در مغازه های مختلف موادغذایی در ایران، باکتری نوع بزی جدا شده است. همچنین امکان جداسازی این باکتری تا ۱۱ هفته پس از تولید پنیر، از این فرآورده وجود داشته است (۱). چندین روش متداول برای شناسایی بروسلوز وجود دارد که از جمله آن ها روش های کشت خون، تست های آگلوتیناسیون الایزا و PCR می باشند. کشت خون، حساسیتی متغیر بین ۵۳ تا ۹۰ درصد دارد که این امر باعث عدم کفایت لازم برای تشخیص می باشد (۵). به علاوه هنگامی که شرایط لازم برای کشت وجود ندارد از روش های

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-04-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.11.11.3]

سرولوژیک، تست های آگلوتیناسیون برای تشخیص استفاده می شود. مهم ترین مشکل استفاده از روش های سرولوژیک، نتایج مثبت کاذب ناشی از واکنش متقاطع آنتی بادی سایر باکتری ها با آنتی ژن بروسلا است. بنابراین به منظور تشخیص دقیق بروسلوز به کارگیری روش های مکمل روش های سرولوژیک باید به کار گرفته شود (۱۷). روش مولکولی PCR از لحاظ حساسیت از روش کشت بهتر عمل می کند. در برخی مطالعات گزارش شده است که حساسیت روش PCR در تشخیص به میزان ۹۸ درصد می باشد (۱۸). رایج ترین روش بررسی برای تشخیص شیر و فرآورده های شیر استفاده از تست MRT است که همانطور که بیان شد از حساسیت و دقت بسیار پایینی برخوردار است. می توان گفت، استفاده از روش های مولکولی به عنوان یک روش تاییدی اجتناب ناپذیر است. کاظمی و همکارانش در سال ۲۰۰۸ سه روش PCR، کشت و روش سرولوژیک را برای تشخیص بروسلا در خون محیطی بیماران مورد مقایسه قرار دادند. آن ها از روش Nested PCR برای شناسایی بروسلا استفاده کردند. با استفاده از پرایمرهای خارجی محصول ۱۱۰۰ جفت بازی تکثیر شده و در نهایت با استفاده از پرایمرهای داخلی محصول ۹۵۸ جفت بازی تکثیر یافت. ژن هدف مورد استفاده در این مطالعه قسمتی از ژن srRNA ۱۶بروسلا بود (۱۲). اکبر مهر و همکارانش در سال ۲۰۱۲ با بررسی ۲۰۰ نمونه پنیر سنتی پاستوریزه نشده اقدام به شناسایی کلی فرم ها و اشرشیا کلی و سالمونلا نمودند. آن ها بیان نمودند که ۴۲٪ از نمونه های پنیر به کلی فرم های مدفوعی آلوده بودند. به علاوه مطالعات نشان داد که کلیه نمونه ها از لحاظ آلودگی به سالمونلا منفی بودند (۲). فلاح و همکارانش در سال ۱۳۹۰ اقدام به شناسایی *باسیلوس سرئوس* در نمونه های شیر نمودند. آن ها از کشت میکروبی استفاده نمودند و نتایج مطالعه آن ها نشان داد که تعداد باسیلوس سرئوس در زمان نگهداری شیر پاستوریزه افزایش می یابد (۱۰). نسبت آلودگی کلی فرم های مدفوعی به انتروکوک ها در بستنی های سنتی عرضه شده در شهر تبریز در سال ۱۳۹۰ توسط صادری و همکارانش مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه آن ها نشان داد که ۲۸/۵۷ درصد نمونه های تحت بررسی آلوده به کلی فرم های مدفوعی و ۱۴/۲۸ درصد نمونه ها نیز آلوده به انتروکوک های مدفوعی بودند (۲۲). Miyashiro و همکارانش در سال ۲۰۰۷ به وسیله تکنیک PCR اقدام به شناسایی *بروسلا آبورتوس* در نمونه های پنیر نمودند. آن ها از پرایمرهای B4,B5 استفاده نمودند و محصول PCR تکثیر یافته به وسیله این پرایمرها ۲۲۳ جفت باز اندازه داشت. از ۱۹۲ نمونه مورد بررسی در این مطالعه کلیه نمونه ها کشت منفی بودند در حالی که ۱۹/۲۷٪ از نمونه ها PCR مثبت بودند (۱۹). در این مطالعه از تکنیک Nested PCR استفاده شد که نسبت به PCR معمولی از حساسیت و اختصاصیت بسیار بالاتری برخوردار بود چرا که در این تکنیک از چهار پرایمر استفاده شده و احتمال ایجاد نتایج غیر اختصاصی به مراتب کاهش می یابد. به علاوه با استفاده از دو مرحله PCR پی در پی حساسیت تست به شدت افزایش یافت بطوری که تعداد نتایج مثبت در مرحله دوم بیشتر از مرحله اول دیده شد. از آنجایی که پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه توسط نویسندگان طراحی شد تاکنون هیچ مطالعه ایی در جهان با استفاده از این پرایمرها صورت نگرفته و از این جهت این بررسی دارای تازگی و نو آوری می باشد. پرایمرها توسط NCBI و Primer Blast بررسی شدند و همچنین با گونه های مختلف نیز تست شدند که مشخص گردید این پرایمرها با هیچ گونه دیگری واکنش نداده و اختصاصا با بروسلا واکنش می دهند. بنابراین، با توجه به نتایج می توان بیان نمود، تکنیک Nested PCR یک روش قابل اطمینان با حساسیت و دقت بالاست بطوری که قادر به شناسایی عامل بیماری زا حتی در نمونه های پنیر پاستوریزه است. از ۵۷ نمونه شیر غیر پاستوریزه (خام) در ۱۲ نمونه (۲۱٪)، در مرحله اول، تست PCR مثبت ارزیابی گردید. از این نمونه ها ۱۹ مورد (۳۳٪) در مرحله دوم مثبت شدند. از ۲۸ نمونه پنیر پاستوریزه ۵ نمونه (۱۸٪) در راند اول تست PCR مثبت ارزیابی گردیدند. از این تعداد، ۸ نمونه (۲۸٪) در مرحله دوم مثبت ارزیابی گردیدند. در بقیه نمونه ها نیز همین افزایش مشاهد شد. در مطالعه ایی که توسط مصطفوی و همکارنش در سال ۱۳۹۱ صورت گرفت روند بیماری بروسلوز (تب مالت) در ایران طی سال‌های ۱۳۸۷-۱۳۷۰مورد بررسی قرار گرفت. آن ها بیان کردند که میانگین بروز گزارش شده بیماری در کشور سالیانه ۴۳/۲۴ در صد هزار نفر بوده است و به طور متوسط در هر سال حدود ۲۷۵۰۰ مورد جدید بیماری در کشور گزارش شده است (۲۰). همچنین می توان بیان نمود نتایج بیانگر آن است که روش های پاستوریزاسیون از دقت کافی برخوردار نبوده و بعد از این فرآیند نیز درصدی از نمونه ها همچنان آلوده باقی می مانند که این امر یک هشدار برای استفاده از روش های موثر جهت از بین بردن عوامل بیماری زا و همچنین یک فاکتور نگران کننده از جهت بهداشت عمومی به حساب می آید. بنابراین فرآیند نظارتی در تولید محصولات لبنی و همچنین استفاده از روش های دقیق پاستوریزاسیون و

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-04-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.11.11.3]

همچنین تشخیص دقیق عوامل بیماری زا امری مهم و اجتناب ناپذیر است. پرایمرهای Nested PCR که توسط محققان این پژوهش طراحی شده است از حساسیت و دقت بسیار بالایی برخوردار است. بطوری که فقط با *Brucella spp.* واکنش داده و با هیچ DNA دیگری واکنش نمی دهند که این امر در PCR بسیار مهم و حائز است و ابزاری مهم برای اطمینان در صحت تشخیص به شمار می رود.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج می توان بیان نمود، بهداشت محصولات لبنی باید مورد توجه بیشتری قرار گیرد همچنین باید از روش ها و تکنیک های دقیق تری برای شناسایی عوامل بیماری زا استفاده نمود، تکنیک Nested PCR مورد بررسی در این مطالعه از حساسیت و دقت بسیار بالاتری نسبت به PCR برخوردار می باشد. به نظر می رسد، این تکنیک های مولکولی باید به عنوان تکنیک های مکمل برای تشخیص بروسلا در کنار روش های رایج مورد استفاده قرار گیرند تا باعث افزایش سلامت عموم و همچنین بهداشت محصولات لبنی گردد.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-04-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.11.11.3]

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 , African Journal of Microbiology Research;2012: 6(5): 968-971.

(3) Andersne B, Langsrud T, Terde S. Inhibition of bacillus by strain of lactobacillus and lactocococeus in milk. Hnternational gournal of food microbiology, 2003; 205- 212.

(4) Alcina V, Carvalho Neta, Juliana PS, Mariana M, Xavier N, Tatiane A, Andrey P, Renato L, Santos L. Pathogenesis of bovine brucellosis. The Veterinary Journal, 2010; 184: 146–155.

(5) Al Dahouk. Laboratory-based diagnosis of brucellosis--a review of the literature.Part II: serological tests for brucellosis. Clin Lab, 2003; 49(11-12):577-89.

(6) Baddour MM, Alkhalifa DH. Evaluation of three polymerase chain reaction techniques for detection of Brucella DNA in peripheral human blood. Can J Microbiol, 2008; 54:352-7.

(7) 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.

(8) Bricker BJ. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. Veterinary microbiology, 2002; (90) 435-446.

(9) Cutler SJ, Whatmore AM, Commander NJ. Brucellosis new aspects of an old disease. Journal of Applied Microbiology, 2005; 98: 1270-1281.

(10) Fallah S, Chamani M, Aminafshar M, Ezzatpanah H. Genomic study of the cereolysin A and B genes in Bacillus cereus isolated from raw and pasteurized milk. African Journal of Biotechnology, 2011;10 (3):439-441

(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) 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.

(13) Kechagia1 M, Mitka S, Papadogiannakis E, Kontos V, Koutis C. Molecular Detection of Brucella spp. DNA in Patients with Manifestations Compatible with Emotional Disorders. The Open Infectious Diseases Journal, 2011; 5: 8-12.

(14) Murphy SC, Boor KJ. Trouble-shooting sources and causes of high bacteria counts in raw milk. Dairy, Food and Environmental Sanitation, 2000; 20:606-611.

(15) Maria Pia Franco, Maximilian Mulder, Robert H Gilman, Henk L Smits. Human brucellosis. Lancet Infect Dis, 2007; 7: 775-86.

(16) 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.

(17) Mensah G, Kwasi Addo K. Brucella Abortus Antibodies in Raw Cow Milk Collected from Kraals. J Basic Appl Sci Res, 2011; 8: 942-947.

(18) Mitka S, Anetakis C, Souliou E, Diza E, Kansouzidou A. Evaluation of different PCR assays for early detection of acute and relapsing brucellosis in humans in comparison with conventional methods. J Clin Microbiol, 2007; 45: 1211-8.

(19) Miyashiro S, Scarcelli E, Piatti RM, Campos FR, Vialta A, Keid LB, Dias RA, Genovez ME. Detection of Brucella abortus DNA in illegal cheese from SÃ£o Paulo and Minas Gerais and differentiation of B19 vaccinal strain by means of the polymerase chain reaction (PCR). Brazilian Journal of Microbiology. 2007; 38, 17-22.

(20) Mostafavi E, Asmand M. Trend of Brucellosis in Iran from 1991 to 2008. Iranian Journal of Epidemiology, 2012; 8(1): 93-100.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-04-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.11.11.3]

(21) Nielsen K. Diagnosis of brucellosis by serology. Vet. Microbiol, 2002; 90: 447-459.
(22) Saderi oskui H, Tavakkolii A. the ratio of fecal coliform to fecal streptococci traditional ice cream marketed in Tabriz. BMG, 2012; 1(1); 37-42.
(23) Schweitzer B, Kingsmore S. Combining nucleic acid amplification and detection. Current opinion in biotechnology, 2001; 12, 21-27.
(24) Young EJ. An overview of human brucellosis. Clinical Infectious Diseases, 1995; 2: 283-289.
(25) Zowghi E, Ebadi A, Yarahmadi M. Isolation and identification of brucella organisms in Iran, Iranian Journal of Clinical Infectious Disease, 2008; 3 (4), 185-188.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-04-13]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1392.3.11.11.3]