بررسی میزان آلودگی به بروسلوزیس در شیر و پنیر به روش Real Time PCR

فاطمه خداوردی پور[1]، نازیلا ارباب سلیمانی[2*]، یاسمن برون[3]

۱. مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران.

۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

***نویسنده مسئول:** *Nazilaarbab@yahoo.co.uk*

چکیده

*بروسلا*ها باکتری های کوچک غیر متحرک، گرم منفی، بدون کپسول و به فرم کوکوباسیل می‌باشند. بروسلوز یک بیماری مشترک بین انسان و دام است و باعث سقط جنین، اختلالات باروری، عفونت های تناسلی، کاهش شیر، اورتریت و اپیدیمیت در میزبان اصلی می‌شود و از این جهت باعث عوارض مزمن و تحمیل هزینه های درمانی فراوان به بیماران و ضررهای اقتصادی زیاد به دامداران می‌گردد. با وجود پیشرفت هایی که در تکنیک های کشت خون و تست های سرولوژیکی که برای کشف آنتی بادی های اختصاصی به دست آمد، هنوز مشکلات مهمی در تشخیص بروسلوزیس وجود دارد، بنابراین نیاز به آزمون های جدید آزمایشگاهی می‌باشد. یکی از جدید ترین روش های سنجش کمی که در حال حاضر مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته روش تشخیص باکتری توسط Real Time PCR می‌باشد. هدف ما هم از این مطالعه شناسایی باکتری های جنس *بروسلا* در نمونه های شیر و پنیر توسط روش Real Time PCR می‌باشد. ۲۵ نمونه شیر گاو (محلی) و ۲۵ نمونه پنیر از مناطق مختلف شهرستان شهرکرد تهیه شد و به منظور تشخیص مولکولی،استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن) انجام و سپس واکنش Real Time PCR با استفاده از دستگاه مدل Rotor-Gene ساخت شرکت Corbett استرالیا بر روی نمونه ها انجام شد. در این تحقیق از ۵۰ نمونه مورد بررسی تنها در ۲ نمونه شیر (۴٪) *بروسلا آبورتوس* تشخیص داده شد. در نمونه های پنیر آلودگی به *بروسلا* گزارش نگردید. این بررسی نشان می دهد روش های مولکولی مثل Real Time PCR باید به عنوان روش هایی مکمل جهت تشخیص *بروسلا* در کنار روش های رایج مورد استفاده قرار گیرند.

واژه های کلیدی: بروسلا، تب مالت، شیر، پنیر، Real Time PCR

مقدمه

خواص، ارزش غذایی و نقش شیر و فرآورده های آن در تغذیه انسان از مدت ها قبل شناخته شده است، اما شیر به علت همین ویژگی ها و صفات ممتاز غذایی که دارد، به سرعت در معرض آلودگی های گوناگون قرار می‌گیرد و به سادگی باعث انتشار عده زیادی از عوامل بیماری زا می‌گردد(۱). بروسلوز بیماری عفونی است که توسط میکروب‌های جنس *بروسلا* در حیوانات و انسان ایجاد بیماری می‌نماید (۲). *بروسلاها* باکتری هایی گرم منفی کوچک، داخل سلولی اختیاری، شدیدا هوازی و سخت رشد هستند، این باکتری ها فاقد تحرک و کپسول بوده و اسپور تولید نمی‌کنند، رشد آن ها کند است ولی در محیط کشت بروسلا براث در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و pH=۷/۶ به نحو مطلوبی رشد می‌نمایند. گونه های *بروسلا* در محیط کشت جامد، معمولا به صورت کلنی های صاف، شفاف و آبی متمایل به سفید تا کهربائی رشد می‌کنند. البته رشد *بروسلا کنیس* و *بروسلا اوویس* به صورت کلنی های خشن و گاهی موکوئیدی می باشد (۳). بیماری در انسان معمولا از طریق انتقال از حیوانات اتفاق می افتد. این بیماری از بیماری های مهم مشترک بین انسان و حیوان است. بروسلوز در حیواناتی از قبیل گاو، گوسفند، بز و خوک ایجاد سقط جنین می‌کند و در انسان با علائم تب، عرق شدید، ضعف، کاهش وزن و درد و ناراحتی عمومی همراه است، اسامی دیگر بروسلوز در حیوانات و انسان تب آبورتوس، سقط جنین واگیر، تب متناوب، بیماری

یانگ و تب مالت می‌باشد(۴). بروسلاها بر اساس تفاوت در میزبان اصلی و بیماری‌زایی به شش گونه طبقه بندی می‌شوند. بروسلا آبورتوس(*B.aburtus*) عامل تب مالت گاوی می‌باشد که در انسان ایجاد تب مواج (بروسلوز) می‌نماید، البته این بیماری توسط گونه های(*B.melitensis*) ، بروسلا سویس(*B.suis*) و بروسلا کانیس(*B.canis*) هم ایجاد می‌شود(۵). گونه-های بروسلا می‌توانند 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 میکروارگانیسم‌ها در حرارت ۶۰ درجه سانتی گراد یا در اثر مجاورت با فنول یک درصد در عرض ۱۵ دقیقه از بین می‌روند ولی در طبیعت تا مدت ها می‌توانند زنده بمانند(۶). به طور کلی می توان نتیجه گرفت که شیر خام، خامه، کره و پنیر های سفید تهیه شده از شیر غیر پاستوریزه و تخمیر نشده، از نظر آلودگی به باکتری *بروسلا* خطرناک ترین محصولات می‌باشند. برعکس، آن دسته از فرآورده های شیر که تهیه آن ها مستلزم ترش شدن و رسیدن طولانی است، نقش مهمی را در آلودگی انسان ندارند(۷و۸). تشخیص بیماری بروسلوز به لحاظ درگیری اندام های مختلف، اشکال بالینی متنوع و وجود علایم بالینی غیراختصاصی مشکل است و تشخیص دقیق آن به روش های پاراکلینیکی نیاز دارد کشت و سرولوژی از جمله روش های تشخیصی آن است. مطمئن ترین راه تشخیص بیماری جداسازی باکتری از نمونه های بالینی است(۹). با توجه به مشکلات تکنیکی کشت و نیاز به محیط کشت اختصاصی و طولانی بودن زمان مثبت شدن کشت، با وجود حساس بودن به عنوان روش تشخیصی مرسوم استفاده نمی شود، به همین دلیل آزمایشات سرولوژی در تشخیص بروسلوز نقش بسیار مهمی دارند. در حال حاضر، روش های سرولوژی آگلوتیناسیون و الایزا مهم ترین آزمایش های پاراکلینیکی هستند که از آن ها برای تشخیص بروسلوز استفاده میشود.آزمون های سرولوژی مرسوم، آگلوتیناسیون لوله ای استاندارد، تست رایت، آگلوتیناسیون لامی رزِبنگال،۲-مرکاپتو اتانول (2ME) و الایزا هستند(۱۰و۱۱). 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 ، سالمونلا اورینتالیس، ویبروکلرا ، فرانسیلا تورانسیس، می‌باشد(۶). بنابر این ایمنی در مقابل اشریشیا کلی 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، SNP، NASBAبر مبنای تشخیص اسید نوکلئیک توسعه یافته اند (۹ مقاله). مفهوم Real time PCR مشاهده لحظه به لحظه یک فرآیند می باشد. در این روش نمونه ای که میزان هدف مورد نظر اولیه بیشتری دارد نسبت به نمونه‌ای که میزان هدف اولیه‌ی کمتری دارد در سیکل‌های پایین تری باعث ایجاد فلورسنت قابل تشخیص می‌شود(۱۳).

مواد و روش کار

در این مطالعه ۲۵ نمونه شیر گاو و ۲۵ نمونه پنیر از مناطق مختلف شهرستان شهرکرد تهیه و در شرایط استریل به مرکز تحقیقات بهداشت مواد غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، منتقل گردید.

استخراج DNA از سوش *Brucella.spp*

برای بهینه نمودن تست PCR جهت تشخیص بروسلا، DNA از سوش استاندارد این باکتری با استفاده از کیت استخراج DNA(شرکت سیناژن) با توجه به پروتکل شرکت استخراج گردید.

استخراج DNA

جهت استخراج DNA از پنیر ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر پروتئاز بافر به ۲۵ گرم از نمونه های مورد نظر اضافه و سپس ۵ میکرولیتر پروتئاز افزوده و در دمای ۵۵ درجه به مدت قرار داده شدند. جهت استخراج DNA از شیر ۵ میکرولیتر پروتئاز به ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه های شیر اضافه می گردد و پس از ورتکس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد نگه داری می شود.

۱۰۰میکرولیتر از نمونه مورد نظر را با ۴۰۰ میکرولیتر lysis solutionمخلوط کرده و ۲۰-۱۵ ثانیه ورتکس می‌کنیم. ۳۰۰ میکرولیتر precipitation solution را به مخلوط اضافه نموده و بعد از ۵-۳ ثانیه ورتکس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- قرار داده و در g ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ می‌کنیم. محلول رویی را دور ریخته و ۱۰۰۰ میکرولیتر Wash buffer را به رسوب اضافه نموده و بعد از ۵-۳ ثانیه ورتکس در g ۱۲۰۰۰دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ می‌کنیم. بعد از خالی کردن محلول رویی، به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه به صورت در باز قرار می‌دهیم. به رسوب باقی‌مانده ۵۰ میکرولیتر solvent buffer اضافه نموده و تکان داده و در ۶۵ درجه به مدت ۵ دقیقه قرار می دهیم. ۳۰ ثانیه در g ۱۲۰۰۰سانتریفیوژ نموده محلول رویی حاوی DNA است. که تا زمان انجام آزمایشات مولکولی در فریزر ۲۰- قرار می‌گیرد.

برای ارزیابی کیفی DNA استخراج شده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز[1]استفاده شده و مقدار 5µl از آن را بر روی ژل آگارز ۱٪ ران می‌کنیم. به منظور کمیت سنجی DNA تخلیص شده از دستگاه بایوفوتومتر استفاده شد و با اندازه گیری میزان DNA در نمونه در طول موج نوری ۲۸۰ نانومتر میزان DNA موجود در نمونه تعیین گردید. نمونه DNA هایی که دارای کیفیت مناسب و کمیتی معادل ۵۰ نانوگرم بوند جهت مراحل بعدی و انجام آزمایش Real time PCR انتخاب گردیدند.

آماده سازی واکنش Taq-Man Real Time PCR

به منظور انجام واکنش Taq-Man Real Time PCR پرایمر مورد استفاده برای تشخیص جنس *بروسلا* و گونه های *آبورتوس* و *ملی تنسیس* و هم چنین توالی پروب مورد استفاده جهت سنتز به شرکت تکاپو زیست سفارش داده شدند. پرایمرهای مخصوص و پروب TaqMan مطابق دستورالعمل کارخانه رقیق سازی گردید. توالی پرایمرهای و پروب‌های مورد استفاده در در این تحقیق در جدول ۱ نشان داده شده است (۱۴).

جدول ۱- توالی آغازگرها و پروب‌ها

توالی هدف	توالی پرایمر (′۳→′۵)	توالی پروب (′۳→′۵)
IS711	GCTTGAAGCTTGCGGACAGT GGCCTACCGCTGCGAAT	**FAM-AAGCCAACACCCGGCCATTATGGT-TAMRA**
BMEII0466	TCGCATCGGCAGTTTCAA/ CCAGCTTTTGGCCTTTTCC	**Cy5-CCTCGGCATGGCCCGCAA-BHQ-2**
3ruAb2_0168	;CACACTCACCTTCCACAACAA/ CCCCGTTCTGCACCAGACT	**FAM-TGGAACGACCTTTGCAGGCGAGATC-BHQ-1**

انجام Real Time PCR جهت تشخیص جنس *بروسلا*

برای انجام واکنش Real Time PCR از دستگاه مدل Rotor-Gene ساخت شرکت Corbett استرالیا و پرایمرهای مخصوص و پروب TaqMan (نشاندار شده با FAM و Cy5) استفاده گردید. کنترل مثبت مورد استفاده در این تحقیق نمونه واکسن *بروسلا* تهیه شده از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و کنترل منفی مورد استفاده آب مقطر می باشد.

[1]. Agarose Gel Electerophoresis

برنامه زمانی گرمایی برای تشخیص جنس *بروسلا* و گونه های *آبورتوس* و *ملی تنسیس*

برنامه زمانی- گرمایی با استفاده از نرم افزار Rotor-Gene 6000 در ۹۵ درجه سانتی گراد ۱۰ دقیقه (Hot Start)، سپس ۴۵ چرخه دمایی به ترتیب ۹۵ درجه سانتی گراد ۲۰ ثانیه، ۶۲ درجه سانتی گراد ۲۰ ثانیه و یک مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد ۲۰ ثانیه دقیقه تنظیم گردید (جدول ۲). علاوه بر ۴۵ سیکل تکثیر، یک سیکل نیز در دامنه دمایی ۶۰ تا ۹۵ درجه سانتی گراد جهت رسم منحنی ذوب، به وسیله قرائت رنگ فلورسانس TaqMan probe برای دستگاه تعریف شد.

واکنش Real Time PCR جهت تشخیص جنس *بروسلا* و گونه های *آبورتوس* و *ملی تنسیس* در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر متشکل از ۱۲/۵ میکرولیتر TaqMan Universal PCR Master Mix (2X) (فرمنتاز)، ۰/۶۲۵ پرایمر F، ۰/۶۲۵ پرایمر R، ۰/۳ میکرولیتر پروب، ۲/۵ میکرولیتر DNA الگو و ۸/۴۳ میکرولیتر آب نوکلئاز Free ، به صورت جداگانه برای هر ژن صورت گرفت. در نهایت نمونه‌ها در دستگاه Light Cycler مخصوص Real Time PCR قرار داده شده اند.

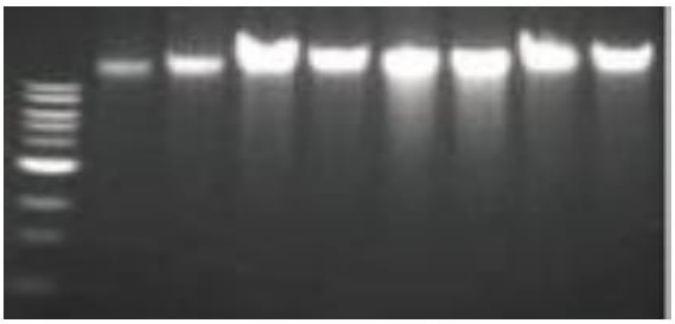
جدول۲- برنامه دمایی جهت انجام واکنش **Real Time PCR**

مراحل واکنش	زمان	دما(درجه سانتی‌گراد)	تکرار
واسرشت ابتدایی	۱۰ دقیقه	۹۵	۱
واسرشت	۲۰ ثانیه	۹۵	۴۵
دمای اتصال پرایمر	۲۰ ثانیه	۶۲	
گسترش	۲۰ ثانیه	۷۲	
ذوب انتهایی	۱۰دقیقه	از ۶۰ درجه تا ۹۵ درجه	۱

پس از پایان واکنش PCR، نمودار منحنی ذوب بر روی صفحه مانیتور کامپیوتر آشکار شده که قابل آنالیز و ذخیره سازی می‌باشد. پیک‌های مختلف به صورت اتوماتیک توسط نرم افزار آشکار ساز نوری محاسبه می-گردد. در صورت وجود *بروسلا*، در منحنی ذوب پیک-هایی در دمای Tm مورد نظر آشکار می‌شود. در نهایت با توجه به نتایج به دست آمده، مقادیر CT (چرخه ای که مقدار فلورسانس از مقدار زمینه بالاتر می رود) محاسبه شد. نتایج به صورت کمی گزارش شده و CT های کمتر از ۴۰ به عنوان مثبت گزارش می شود و در نهایت منحنی استاندارد با استفاده از استانداردهای مشخص در هر نمونه تعیین می‌گردد (۱۵).

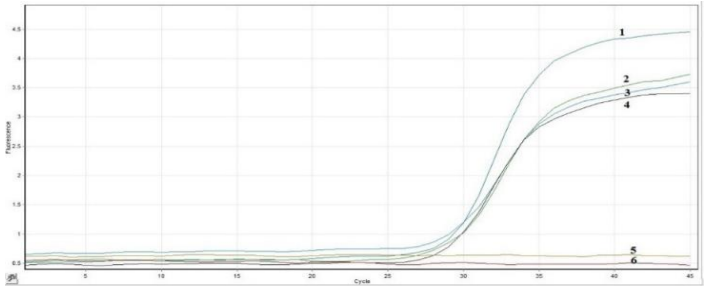
نتایج

در آغاز انجام این تحقیق، استخراج DNA طبق روش شرکت سازنده کیت انجام شد و در شکل ۱ نتایج استخراج DNA نشان داده شده است. شماره‌های ۱ تا ۵ همگی نشان دهنده غلظت بالای DNA است



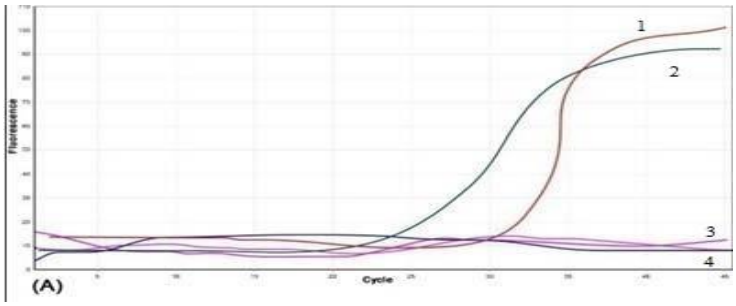
شکل۱- تصویر الکتروفورز DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱ درصد

در این بررسی تعداد ۲۵ نمونه شیر و ۲۵ نمونه پنیر محلی به منظور ردیابی ژنوم باکتری *بروسلا* مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله اول ابتدا از طریق روش Real Time PCR به تشخیص *بروسلا* پرداخته شد. در مرحله بعدی بر اساس آنالیز منحنی ذوب ایجاد شده از واکنش Real Time PCR می‌توان به تشخیص گونه‌های *بروسلا ملی تنسیس* و *بروسلا آبورتوس* پی برد. در گراف های ۲ و ۳ مراحل پروفایل حرارتی برای جنس *بروسلا* و گونه های *بروسلا* در دستگاه Real Time PCR نشان داده شده است. CT کم تر از ۴۰ مثبت در نظر گرفته شد. در این تحقیق از ۵۰ نمونه مورد بررسی تنها در ۲ نمونه شیر (۴٪) *بروسلا آبورتوس* تشخیص داده شد. در نمونه های پنیر آلودگی به *بروسلا* گزارش نگردید.



شکل ۲- آنالیزمنحنی ذوب برای جنس *بروسلا*

خط ۱: کنترل مثبت. خطوط ۲، ۳ و ۴: نمونه‌های مثبت جنس *بروسلا*. خط۵: کنترل منفی. خط۶: نمونه منفی برای واکنش است.



شکل ۳- آنالیز منحنی ذوب برای گونه *بروسلا آبورتوس*.

خط ۱: کنترل مثبت. خط ۲: نمونه مثبت. خط۳: کنترل منفی. خط۴: نمونه منفی برای واکنش است.

بحث

شیر و فرآورده های لبنی به لحاظ دارا بودن ارزش غذایی بالا، در تغذیه انسان دارای نقش به سزایی هستند. از سوی دیگر به علت 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 نگه داری فرآورده 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 آن جایی که عامل بیماری بروسلوز (تب مالت) از طریق ترشحات شیر دام های آلوده دفع می گردد، مصرف 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.(۱۶-۱۸) هم چنین مصرف فرآورده 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 مواد غذایی در ایران، باکتری نوع بزی جدا شده است. هم چنین امکان جدا سازی این باکتری تا ۱۱ هفته پس از تولید پنیر، از این

فرآورده وجود داشته است (۱۹).گسترش جهانی بروسلوز، این بیماری را هنوز از معضلات جدی سلامتی در انسان و حیوانات اهلی به شمار 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 (۱۶).

در تحقیق حاضر ۲۵ نمونه شیر و ۲۵ نمونه پنیر از مراکز عرضه در شهرستان شهرکرد تهیه و به منظور بررسی آلودگی به *بروسلا* با استفاده از تکنیک Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفتند. آلودگی به *بروسلا آبورتوس* در ۲ نمونه شیر (۴٪) گزارش گردید. خوشبختانه در این تحقیق نمونه های پنیر به *بروسلا* آلودگی نداشتند. تحقیقات انجام شده نشان می دهد امکان جدا سازی این باکتری تا ۱۱ هفته پس از تولید پنیر، از این فرآورده وجود دارد که علت عدم آلودگی پنیر در تحقیق ما ممکن است به این دلیل باشد که پنیرهای مورد استفاده در تحقیق ما بیشتر از ۱۱ هفته از تولید آن ها می گذرد. تحقیقات متعدد در ایران حاکی از آن است که گونه غالب *بروسلا* در ایران *بروسلا آبورتوس* می باشد که در تحقیق حاضر نیز ۲ نمونه مثبت شده متعلق به گونه *بروسلا آبورتوس* بودند (۲۰).

در تحقیق انجام شده توسط ایزدی و مسلمی که بر روی 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 در تهران به روش Nested PCR صورت گرفت، آلودگی به بروسلوز در شیر خام گاو، شیر پاستوریزه، پنیر پاستوریزه و شیر خام گوسفند به ترتیب در ۱۹ نمونه، ۱۰ نمونه، ۸ نمونه، ۱۴ نمونه، ۲۱ نمونه و ۱۹ نمونه تشخیص داده شد. وجود واکنش مثبت در پنیرهای پاستوریزه ممکن است به این دلیل باشد که فرایند پاستوریزاسیون پنیرها از کیفیت لازم برخوردار نبوده است. نتایج حاصل از این تحقیق 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 غربال‌گری امری ضروری می باشد (۶). در تحقیق انجام شده توسط موثق که بر روی ۵۰ نمونه شیر خام در منطقه ایلخچی صورت گرفت، آلودگی به بروسلا در ۱۱ نمونه (۲۲٪) گزارش گردید که نسبت به تحقیق ما بسیار بیشتر می باشد. نتایج این تحقیق نشان می دهد 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 (۲۱). تاکنون هیچ مطالعه ای در ایران با استفاده از روش Real Time PCR صورت نگرفته و از این جهت این بررسی دارای تازگی و نو آوری می‌باشد. می‌توان بیان کرد تکنیک Real Time PCR یک روش قابل اطمینان با حساسیت و دقت بالاست. خوشبختانه شیوع پایین آلودگی به *بروسلا* حاکی از سلامت دام های استان چهارمحال و بختیاری می‌باشد.

نتیجه گیری کلی

از آنجا که شیر به عنوان یک میان وعده بسیار مغذی و مفید مورد استفاده عموم قرار می‌گیرد، با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش و سایر پژوهش‌های صورت گرفته توسط سایر محققین در ایران و سایر کشورها، برای کنترل بروسلوز در هر کشوری با توجه به سویه و یا سویه های موجود *بروسلا* و مطابق با شرایط فرهنگی، اقتصادی، اجتماعی و بهداشتی جامعه، برنامه ریزی دقیق و متناسبی مورد نیاز است. هم‌چنین لازم است، روش های مولکولی باید به عنوان روش‌هایی مکمل جهت تشخیص *بروسلا* در کنار روش های رایج مورد استفاده قرار گیرند. لازم است که به جهت جلوگیری از بروسلوز و بیماری‌های گوارشی، از مصرف آن به صورت خام خودداری شده و فرآیند پاستوریزاسیون و یا جوشاندن شیر، جهت نابودی و غیر فعال شدن عوامل میکروبی آن انجام پذیرد.

منابع

1. Paktoja J, Reinemann D, Ruegg P. (2009). associations among milk quality indicators in raw bulk milk. Dairy Sci J. 92 :4978-4987.
2. Vizcaino N, Verger JM, Grayon M, Zygmunt MS, Cloeckaert A. (1997). DNA polymorphism at the omp-31 locus of *Brucella spp*. evidence for a large deletion in *Brucella abortus* and other species-specific markers. Microbiology J. 143: 2913-2921.
3. Cloeckaert A, Jacques I, Grilló MJ, Mar´ın CM, Grayon M, Blasco JM, Verger JM. (2004). Development and evaluation as vaccines in mice of *Brucella melitensis* Rev.1 single and double deletion mutants of the bp26 and omp31 genes coding for antigens of diagnostic significance in ovine brucellosis. Vaccine J. 22: 2827-2835.
4. Pappas G, Solera J, Akritidis N, Tsianos E. (2005). New approaches to the antibiotic treatment of brucellosis. Antimicrobial Agents J. 26: 101-105.
5. Cutler SJ, Whatmore AM, Commander NJ. (2005). Brucellosis new aspects of an old disease. Appl Microbiol J. 98: 1270-1281.
۶. ایزدی الف، مسلمی الف. (۱۳۹۲). مطالعه و شناسایی مولکولی *Brucella spp* در محصولات لبنی توسط تکنیک Nested PCR. مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی. ۳ (۱۱): ۹۸-۹۱.
7. Junaidu A, Oboegbulem S, Salihu M. (2008). Seroprevalence of brucellosis in prison farm in Sokato, Nigeria. Asian Journal of Epidemiology. 1: 24-28.
8. Namanda AT, Kakai R, Otsyula M. (2009). The role of unpasteurized “hawked” milk in the transmission of brucellosis in Eldoret municipality, Kenya. Infect Developing Countries J. 3(4): 260-266.
9. Al Dahouk S, Tomaso H, Nockler K, Neubauer H, Frangoulidis D. (2003). Laboratory-based diagnosis of brucellosis-a review of the literature. Part II: serological tests for brucellosis. Clin Lab J. 49(11-12): 577-589.
10. Morales-Garcia MR, Garcia-Méndez N, Regalado-Jacobo SD, Lopez-Merino A, Contreras-Rodriguez A. (2014). [Clinical, serological and polymerase chain reaction follow-up of a family with brucellosis]. Rev Chilena Infectol J. 31(4):425-433.
11. Hekmatimoghaddam S, Sadeh M, Khalili MB, Mollaabedin M, Sazmand A. (2013). Comparison of PCR, Wright agglutination test and blood culture for diagnosis of brucellosis in suspected patients. Pak J Biol Sci. 16(22): 1589-1592.
12. 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.
13. Real-Time PCR Applications Guide. Bio-Rad Laboratories, Inc. All rights reserved (2006).
14. Hinic V, Brodard I, Thomann A, Cvetnic Z, Makaya P.V, Frey J, Abril C. (2008). Novel identification and differentiation of *Brucella melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, and *B. neotomae* suitable for both conventional and real-time PCR systems. J Microbiol Methods. 75: 375-378.
15. Ali Sh, Akhter Sh, Neubauer H, Melzer F, Khan I, Ali Q, Irfan M. (2015). Serological, cultural, and molecular evidence of *Brucella* infection in small ruminants in Pakistan. J Infect Dev Ctries. 9(5):470-475.
16. Akbarmehr J. (2003). Survery on the Contamination of Fresh White Cheese Produced in Sarab and Rural Area with *Brucella Spp*. J Fac Vel Med Univ Tehran. 58(3):203-206.
17. Kazemi B, Yousefi Namin SA, Dowlatshahi M, Bandepour M, Kafilzadeh F, Gachkar L, Mahmoudinejad F, Samarghandi A, Mardani M. (2008). Detection of *Brucella* by Peripheral Blood PCR and Comparison with Culture and Serological Methods in Suspected Cases. Iranian J Publ Health. 37(4): 96-102.
18. Xavier M, Paixao T, B. den Hartigh A, Tsolis R, Santos R. (2010). Pathogenesis of *Brucella Spp*. Open Vet Sci J. 4: 109-118.
19. Akbarmehr J, KhandaghiJ. (2012). A Survey on the Prevalence of *Salmonella* and Coliforms in Unpasteurized Iranian Cheese Using Conventional Culture Method. Afr J Microbiol Res. 6(5): 968-971.

20. Zowghi E, Ebadi A, Yarahmadi M. (2008). Isolation and identification of *brucella* organisms in iran. Iran J Clin Infect Diseases. 3: 185-188.

21.موثق م ح. (۱۳۹۱). تعیین آلودگی شیر خام گاو با باکتری *بروسلا آبورتوس* در منطقه ایلخچی به روش الایزا. مجله علوم غذایی و تغذیه. ۱۰ (۱): ۹۷-۱۰۱.

Contamination of brucellosis in milk and cheese by Real time PCR

Fatemeh Khodaverdipour[1],Nazila Arbab soleimani[2]*, Yasaman Boroun[3]

1. Research Center of Nutrition and Organic Products (R.C.N.O.P), Islamic Azad University, Shahrekord Branch,Shahrekord ,Iran.
2. Department of Microbiology, Department of Microbiology,Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan,Iran.
3. Department of Microbiology, Faculty of Basic Siences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Nazilaarbab@yahoo.co.uk ***Corresponding author:**

ABSTRACT

are small, immobile, gram-negative bacteria that are lacking capsules and formed *Brucella spp* like cocobacillus. Brucellosis is a zoonosis infection between humans and animals that can lead to miscarriages, fertility disorders, genital infections, reduction in milk production, urethritis, and epididymitis in the original host, resulting in many medical disorders in patients and unnecessary treatment expenses. Moreover, farmers would end up facing significant economic losses. Despite advances in blood culture techniques and serological tests to detect specific antibiotics, there are still significant difficulties in the diagnosis of brucellosis; therefore, a new laboratory test is needed for a better examination. One of the most recent quantitative methods that have already caught the attention of many researchers is the detection of bacteria by Real Time PCR method. The aim of this study is to identify bacteria of the genus Brucella, both in milk and cheese samples, by the method of Real Time PCR. 25 samples of cow's milk and twenty-five samples of cheese were collected from different parts of Shahrekord city. DNA extraction was performed using the DNA extraction kit (Cinnagen company) for the molecular diagnosis. Then, by the use of Real Time PCR reaction (Corbett Rotor-Gene Model, manufactured in Australia), samples were studied. In this study, fifty samples were examined, and only two samples (4%) were diagnosed with Brucella abortus, meanwhile, there were no reports on infections by Brucella in the cheese samples. ***Conclusion:*** This study shows that molecular techniques such as Real Time PCR can be used as a complementary method for the detection of Brucella, alongside all the other common methods.

Keywords*: Brucella,* Brucellosis, milk, cheese, Real Time PCR.