



مقاله کوتاه

## بررسی میزان شیوع باکتری بروسلا در نمونه های شیر خام و پنیر محلی گوسفندی عرضه شده در شهرستان فارس از توابع استان چهارمحال بختیاری به روش PCR

مأده سجادیان\*، مجتبی زنگنه، مهدی بهمن دهکردی، عیسی عباسی بیرگانی، عبدالجلیل ریگی، هلن  
حنایی اهواز

دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.



\*نویسنده مسئول: [maedeh.sa5966@gmail.com](mailto:maedeh.sa5966@gmail.com)

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۳۰

### چکیده

سلامت شیر و فرآورده های آن به دلیل ارزش بالای غذایی آن ها در تغذیه انسان از اهمیت بسزایی برخوردار می باشد. این میان وعده مغذی، یکی از مهم ترین منابعی است که توسط عوامل میکروبی آلوده می شود. بروسلا یک کوکوباسیل گرم منفی می باشد که میزبان های آن شامل انسان، گاو، بز و گوسفند می باشد. بروسلا از طریق شیر و فرآورده 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.

در این مطالعه ۲۰ نمونه شیر خام و ۲۰ نمونه پنیر محلی از سطح شهرستان فارس جمع آوری گردید. DNA 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.

از ۲۰ نمونه شیر خام، یک نمونه (معادل ۵ درصد) PCR مثبت و از ۲۰ نمونه پنیر محلی نمونه PCR مثبت مشاهده نشد. از آنجا که شیر به عنوان یک میان وعده بسیار مغذی و مفید مورد استفاده عموم قرار می گیرد، نتایج بدست آمده نشانگر این مطلب می باشد که علیرغم تلاش های صورت گرفته جهت جلوگیری از بیماری بروسلوز، هنوز هم احتمال آلودگی شیرخام، در نواحی مختلف، به باکتری بروسلا وجود دارد.

کلمات کلیدی: بروسلا، شیر، پنیر محلی

## مقدمه

سلامت شیر و فرآورده‌های آن به دلیل ارزش بالای غذایی آن‌ها در تغذیه انسان از اهمیت بسزایی برخوردار می‌باشد. این میان وعده مغذی، یکی از مهم‌ترین منابعی است که توسط عوامل میکروبی آلوده می‌شود. بروسلاها باکتری‌های 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 می‌کنند (۱). بروسلاها بر اساس تفاوت در میزبان اصلی و بیماری‌زایی به شش گونه طبقه بندی می‌شوند. بروسلا آبورتوس (*B. abortus*) عامل تب مالت گاوی می‌باشد که در انسان ایجاد تب مواج (بروسلوز) می‌نماید، البته این بیماری توسط گونه‌های (*B. melitensis*)، بروسلا سویس (*B. suis*) و بروسلا کانیس (*B. canis*) هم ایجاد می‌شود (۲). گونه‌های 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 سانتی‌گراد یا در اثر مجاورت با فنول یک درصد در عرض ۱۵ دقیقه از بین می‌روند ولی در طبیعت می‌توانند تا مدت‌ها زنده باقی بمانند (۳). 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 شده‌اند. از طرف دیگر علی‌رغم کوشش‌های بسیار جهت ریشه کنی بیماری در بسیاری از کشورها تعداد موارد بروسلوز در حیوانات و انسان رو به افزایش است. یکی از راه‌های اصلی انتقال بیماری بروسلوز به انسان از طریق مصرف شیر و فرآورده‌های آن است. در نتیجه این بیماری از نظر بهداشت عمومی بسیار حائز اهمیت است (۴). روش‌های تشخیص بروسلا شامل کشت، روش‌های سرولوژیک بر مبنای واکنش آنتی‌ژن آنتی‌بادی می‌باشد که شامل تست‌های مختلفی مانند SAT<sup>۱</sup>، RBT<sup>۱</sup> گومبس ایمونواسی وابسته به آنزیم و تست پوستی می‌باشد. علی‌رغم توسعه فراوان و دسترسی آسان تست‌های سرولوژیک مشکل مهم این تست‌ها ایجاد نتایج مثبت کاذب به دلیل واکنش متقاطع با، آنتی ژن‌های سایر میکروارگانیسم‌ها مانند *یرسینیا ایتروکولیتا*<sup>۲</sup>، *سالمونلا اورینتالیس*<sup>۳</sup> و *ویبریو کلرا*<sup>۴</sup>، *فرانسیلا تورانسیس*<sup>۵</sup>، *اشریشیاکلی* می‌باشد (۶ و ۵). بنابراین ایمنی در مقابل این عوامل باعث ایجاد نتایج مثبت کاذب می‌شود بعلاوه این روش‌ها قابلیت تشخیص بیماری در هفته‌های اول آلودگی را نداشته، بنابراین استفاده از روش‌های مولکولی به عنوان تست‌های تاییدی ضرورت یافته است. روش‌های مولکولی بسیاری، از جمله PCR و مشتقات آن، تکنیک‌های بر مبنای بر هیبریداسیون، مالتیپلکس PCR<sup>۶</sup>، SNP<sup>۷</sup>، NASBA<sup>۸</sup> مبنای تشخیص اسید نوکلئیک توسعه یافته‌اند (۷). یکی از مشتقات PCR تکنیک PCR Nested می‌باشد که راه حلی برای افزایش حساسیت و دقت PCR است و جداسازی محصول اختصاصی مورد نظر را از بین انبوه محصولات غیر اختصاصی میسر می‌سازد. در این روش از دو جفت پرایمر استفاده می‌شود طوری که جفت دوم در بین جفت اول جای می‌گیرند ابتدا پرایمرهای اول (پرایمر بیرونی) اضافه می‌شوند و باعث تکثیر قطعاتی از DNA می‌شوند که احتمالاً تعدادی از آن‌ها محصولات غیر اختصاصی‌اند. محصول PCR واکنش اول به عنوان DNA الگو برای PCR دوم در حضور پرایمرهای داخلی (پرایمر دوم) که مکمل قسمت داخلی تر قطعه DNA مورد نظر است مورد استفاده قرار می‌گیرد. 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 (۸-۱۰).

<sup>۱</sup> Serum Agglutination Test<sup>۲</sup> Rose Bengal Test<sup>۳</sup> Yersina enterocolitica<sup>۴</sup> Salmonella Orientalis<sup>۵</sup> Vibrio cholera<sup>۶</sup> Francisella tularensis<sup>۷</sup> Escherichia coli<sup>۸</sup> Multiplex PCR<sup>۹</sup> Single-nucleotide polymorphism<sup>۱۰</sup> Nucleic acid sequence based amplification



## مجله بیماری‌های قابل انتقال بین انسان و حیوان

### مواد و روش‌ها

تهیه نمونه‌ها: در این بررسی ۲۰ نمونه شیر خام و ۲۰ نمونه پنیر محلی گوسفندی از سطح شهرستان فارس 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 پنج میکرولیتر الگو (DNA استخراجی از نمونه) ۲/۵ میکرولیتر از 10X PCR Buffer، یک میکرولیتر از هر یک از دو پرایمر (Bru Up Low, Bru) ۱۰ mM، ۰/۷۵ میکرولیتر از ۵۰ mM MgCl<sub>2</sub>، ۰/۵ میکرولیتر از ۱۰ mM dNTP، ۰/۴ میکرولیتر 5 u/μl Taq DNA Polymerase در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر می‌باشد. 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 Bru Up, Bru In می‌باشد. توالی پرایمرها به قرار ذیل می‌باشد.

پرایمر	توالی پرایمر
Bru Low	5' GGG CAA GGG TCG GTG TTT 3'
Bru In	5' GGG ACG GGC AGG CGA GAG 3'
Bru up	5' GGG CAA GGT GGA AGA TTT 3'

چرخه دمایی واکنش PCR: در مرحله اول واکنش به صورت دمایی دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت سه دقیقه، دناتوراسیون در دمایی ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، چسبیدن در دمایی 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 به صورت دناتوراسیون در دمایی 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 (۱۱).

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

بررسی حساسیت تست PCR: برای برآورد میزان بروسلا در یک حجم معین، از رقت‌های متوالی کشت بروسلا (از یک 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 میکروارگانیزم از جمله ویروس هرپس سیمپلکس (HSV)، سائتومگالوویروس (CMV)، واریسلا زوستر (VZV)، هپاتیت B (HBV)، هپاتیت C (HCV)، ساکارومیسیس سرویزیه (*Saccharpmices*)، DNA انسانی، DNA موش به همراه کنترل منفی مورد مطالعه قرار گرفت.

انجام تست PCR برای شناسایی بروسلا در نمونه‌ها: در این مطالعه ۴۰ نمونه DNA محصول لبنی (شامل ۲۰ نمونه شیر خام، ۲۰ نمونه پنیر سنتی) جمع آوری گردید. DNAی نمونه‌های هر جمعیت به عنوان الگو در تست PCR مورد ارزیابی قرار داده شد.

## نتایج

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

نتیجه بهینه سازی محصول مرحله دوم تست PCR: DNA الگوی مورد استفاده در این واکنش، محصول واکنش مرحله اول می‌باشد. محصول تکثیر شده را در کنار نمونه کنترل منفی و سایز مارکر بر روی ژل الکتروفورز مورد ارزیابی قرار داده شد. باند حاصل از محصول PCR در مرحله دوم واکنش ۲۲۵ جفت باز طول داشت. نتایج مربوط به آزمون‌های PCR انجام شده بر روی نمونه‌های شیر خام: از ۲۰ نمونه شیر غیر پاستوریزه (خام) در یک نمونه در دور اول تست PCR مثبت ارزیابی گردید. نتایج مربوط به آزمون‌های PCR انجام شده بر روی نمونه‌های پنیر محلی گوسفندی از ۲۰ نمونه پنیر سنتی در هیچکدام تست PCR مثبت ارزیابی نگردید.

نتیجه تعیین اختصاصیت آزمون PCR بهینه شده: برای تعیین اختصاصیت تست PCR بهینه شده تا ۱۰۰ پاریتیکل محاسبه گردید. تست PCR بهینه شده از اختصاصیت بسیار بالایی برخوردار بود به طوری که به جز DNA بروسلا با هیچ کدام از DNAهای مورد مطالعه واکنشی صورت نگرفت.

شیر و فراورده‌های لبنی به لحاظ دارا بودن ارزش غذایی بالا، در تغذیه انسان دارای نقش به‌سزایی هستند. از سوی دیگر به علت دارا بودن اکثر عناصر و ترکیبات غذایی، محیط بسیار خوبی جهت رشد و فعالیت بسیاری از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌باشند. بنابراین عدم رعایت اصول بهداشتی در تهیه و نگهداری فراورده‌های لبنی، عوارض و خطرات بهداشتی عدیده‌ای را در مصرف کنندگان این قبیل مواد غذایی به همراه خواهد داشت. بروسلوز یکی از خطرناک‌ترین بیماری‌های عفونی است که از طریق مصرف شیر و فراورده‌های لبنی آلوده به انسان انتقال می‌یابد. پنیرهای تازه به دلیل آن که از شیر غیر پاستوریزه تهیه و نیز فرایند تخمیری در آن به طور کامل صورت نمی‌گیرد. در صورت آلوده بودن، به راحتی عامل تب مالت را در خود حفظ نموده و به مصرف کنندگان آن منتقل می‌نماید. از آنجایی که عامل بیماری بروسلوز (تب مالت) از طریق ترشحات شیر دام‌های آلوده دفع می‌گردد، مصرف فراورده‌های شیری غیر پاستوریزه در مناطق آلوده به بروسلوز یکی از عمده‌ترین راه‌های انتقال بیماری تب مالت به انسان محسوب می‌شود. عامل بیماری بروسلا یک کوکوباسیل کوچک، غیر متحرک، گرم منفی و بدون اسپور می‌باشد که در محیط هوای رشد می‌نماید. در مقابل خشک شدن نسبتاً مقاوم بوده و مدت طولانی در دمای پایین زنده می‌ماند، مواد ضد عفونی کننده مانند فرمالدئید، هیپوکلریت و فتل میکروارگانیسم را از بین می‌برند. این میکروب با پاستوریزاسیون نیز کشته می‌شود (۱۲-۱۴). مصرف شیر خام و فراورده‌های لبنی آلوده غیر پاستوریزه و یا نجوشیده مانند، خامه، پنیر تازه، بستنی، آغوز، معمول‌ترین و مهم‌ترین راه انتقال بیماری می‌باشد. همچنین مصرف فراورده‌های حیوانی آلوده سبب بروز بیماری در انسان می‌شود. مواد غذایی سنتی، نقش مهمی در انتقال بیماری دارند. با تحقیقات انجام شده توسط محققین، از هفت درصد پنیرهای تازه محلی عرضه شده در مغازه‌های مختلف مواد غذایی 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 (۱۵). گسترش جهانی بروسلوز، این بیماری را هنوز از معضلات جدی سلامتی در انسان و حیوانات اهلی بشمار می‌آورد. اگرچه آمار انتشار یافته از شیوع این بیماری در کشورهای مختلف متفاوت است، شیوع دقیق بروسلوز انسانی مشخص نیست، اما آمار انتشار یافته بین ۰/۱ تا ۲۰۰ مورد و در ایران ۱۳۲/۴ در ۱۰۰۰۰ جمعیت است. لذا کنترل بیماری از اهمیت خاصی برخوردار است (۱۳ و ۲). روش‌های سرولوژیک تشخیص بروسلوز انسانی شامل آزمایش‌های رز بنگال، سروآگلوتیناسیون، رایت، ۲- مرکاپتواتانول، ثبوت عناصر مکمل و آنتی گلوبولین کومبیس



## مجله بیماری‌های قابل انتقال بین انسان و حیوان

صورت می‌گیرد. اکثر بیماران مبتلا به بروسلوز حاد در تمامی آزمایش‌ها واکنش مثبت نشان می‌دهند. معمولاً آزمایش‌های رزبنگال و رایت به جهت آن‌که هر دو ایمونوگلوبولین G و M در آن‌ها دخالت دارند زودتر از دیگر آزمایش‌ها واکنش نشان می‌دهند. در آزمایش‌های ۲- مرکاپتواتانول و ثبوت عناصر مکمل IgG مداخله نموده که از نظر تفکیک وضعیت ایمنی یا عفونت مفید می‌باشد. در مواردی که آنتی‌بادی‌ها وجود داشته باشند آگلوتیناسیون واضح ایجاد نمی‌نمایند آزمایش کومبس از ارزش خاصی برخوردار است. آنتی‌ژن‌های بروسلا، آنتی‌ژن‌های A و M هستند که به لیپو پلی‌ساکارید دیواره سلول باکتری مربوط می‌باشد. ضمناً بروسلا آنتی‌ژن مشترک با ویبره کلرا داشته و واکنش‌های M و A هستند که به لیپو پلی‌ساکارید دیواره سلول باکتری مربوط می‌باشد. بعضی از آنتی‌ژن‌ها ساخته شده بالا می‌برد (۱۸-۱۶). مهم‌ترین شکل استفاده از روش‌های سرولوژیک نتایج مثبت کاذب ناشی از واکنش متقاطع سایر آنتی‌بادی‌های باکتری‌ها با آنتی‌ژن بروسلا می‌باشد. بنابراین به منظور تشخیص دقیق بروسلوز بکارگیری روش‌های مکمل روش‌های سرولوژیک باید بکار گرفته شود (۲۰-۱۸). 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 هفت نمونه به بروسلا ملی تنسیس و ۲۰ نمونه به بروسلا آبورتوس آلوده بودند. روش مورد استفاده در این مطالعه کشت در محیط آگار اکسپاندا بود (۱۲). حسین دوست و همکاران در ۱۳۸۴ دو روش کشت و PCR را برای تشخیص بروسلا آبورتوس مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها ژن ISV11 را هدف قرار دادند. نتایج مطالعات آن‌ها نشان داد که از ۴۲ نمونه سرولوژیک مثبت، تنها شش نمونه کشت مثبت بودند. به علاوه نتایج مطالعات آن‌ها نشان داد که حساسیت کشت ۴۰ درصد و حساسیت PCR ۶۰ درصد دیده شد (۲۱). پیری دوگانه و همکاران در سال ۱۳۸۹ از تکنیک PCR برای تشخیص بروسلوز انسانی در نمونه‌های سرم و خون استفاده نمودند. ژن هدف مورد مطالعه آن‌ها پروتئین ۳۱ KDa آنتی‌ژن بروسلا بود و نتایج مطالعه آن‌ها نشان داد که از ۱۰۲ فرد مشکوک به بروسلوز، ۵۶ نمونه خون و ۶۸ نمونه سرم PCR مثبت بودند. آن‌ها بیان کردند که حساسیت تست PCR تهیه شده در این مطالعه حساسیت بالاتری بر روی سرم نسبت به خون کامل دارد (۲۲).

در این مطالعه از تکنیک Nested PCR استفاده شد که نسبت به PCR از حساسیت و اختصاصیت بسیار بالاتری برخوردار بود چرا که از سه پرایمر استفاده کرده و احتمال ایجاد نتایج غیراختصاصی به مراتب کاهش می‌یابد. بعلاوه با استفاده از دو مرحله PCR پی در پی حساسیت تست به شدت افزایش یافت. به طوری که در مرحله اول فاقد نتایج مثبت ولی در مرحله دوم نتایج مثبت دیده شد. نمونه‌هایی 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. با توجه به نتایج می‌توان بیان کرد تکنیک Nested PCR یک روش قابل اطمینان با حساسیت و دقت بالاست به طوری که قادر به شناسایی عامل بیماری‌زا حتی در نمونه‌های پنیر پاستوریزه است.

### نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادها

از آنجا که شیر به عنوان یک میان‌وعده بسیار مغذی و مفید مورد استفاده عموم قرار می‌گیرد، با توجه به نتایج حاصله از این پژوهش و سایر پژوهش‌های صورت گرفته توسط سایر محققین در ایران و سایر کشورها، لازم است که به جهت جلوگیری از بروز بیماری بروسلوز و همچنین بیماری‌های گوارشی، از مصرف آن به صورت خام خودداری شده و فرآیند پاستوریزاسیون و یا جوشاندن شیر، جهت نابودی و غیر فعال شدن عوامل میکربی آن انجام پذیرد.

## تقدیر و تشکر

از تمامی کسانی که در جمع‌آوری نمونه همکاری کردند سپاسگزاریم.

## تعارض منافع

هیچ‌گونه تضاد منفعی بین نویسندگان وجود ندارد و این مقاله با اطلاع و هماهنگی آنها ارسال شده است.

## فهرست منابع

- [1]. Cutler SJ, Whatmore AM, Commander NJ. Brucellosis New Aspects of an Old Disease. *Journal of Applied Microbiology*, 2005; 98: 1270-1281.
- [2]. 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 Forum Infectious Diseases*, 2011; 5: 8-12.
- [3]. 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. *Clinical Laboratory*, 2003; 49(11-12):577-89.
- [4]. Erdenebaatar J. Epidemiological and Serological Survey of Brucellosis in Mongolia by ELISA Using Sarcosine Extracts. *Medical Microbiology and Immunology*, 2004; 48(8):571-7.
- [5]. Wright PF, Tounkara K, Lelenta M, Jeggo MH. International Reference Standards: Antibody Standards for the Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Revue scientifique et technique*, 1997; 3: 824-832.
- [6]. 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. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease*, 2002; 44: 129-132.
- [7]. 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.
- [8]. Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, Stoker NG. Detection of *Brucella* Melitensis and *Brucella* Abortus by DNA Amplification *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1992; 95:271-275.
- [9]. Nielsen K. Diagnosis of Brucellosis by Serology. *Vet. Microbiol*, 2002; 90: 447-459.
- [10]. Shareef JM. A Review of Serological Investigations of Brucellosis among Farm Animals and Humans in Northern Provinces of Iraq (1974– 2004). *Journal of Medicine*, 2006; 53: 38–40.
- [11]. Tantillo G, Di Pinto A, Buonavoglia C. Detection of *Brucella* Spp. in Soft Cheese by Semi-Nested Polymerase Chain Reaction. *Journal of Dairy Research*, 2003; 70: 245-247.
- [12]. Akbarmehr J. Survey on the Contamination of Fresh White Cheese Produced in Sarab and Rural Area with *Brucella* Spp. *Journal of Faculty Veterinary Med Univ Tehran*, 2003; 58:3:203-206.
- [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 Journal of Public Health*, 2008; 37:4:96-102.
- [14]. Xavier M, Paixão T, B. den Hartigh A, Tsolis R, Santos R. Pathogenesis of *Brucella* Spp. *open veterinary science journal*, 2010; 4: 109-118.
- [15]. Akbarmehr J, Khandaghi J. 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.
- [16]. Gulst ST, Khan A. Epidemiology and Epizootology of Brucellosis: A Review. *Pakistan veterinary journal*, 2007; 27(3): 145-151.
- [17]. Bricker BJ. PCR As a Diagnostic Tool for Brucellosis. *Vet. Microbiol*, 2002; 90: 435-446.



- [18]. 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.
- [19]. Al-Mariri A, H aj-Mahmoud N. Detection of Brucella Abortus in Bovine Milk by Polymerase Chain Reaction. ACTA VETERINARIA BRNO, 2010; 79: 277-280.
- [20]. Mensah G, Kwasi Addo K. Brucella Abortus Antibodies in Raw Cow Milk Collected from Kraals. Journal of Basic and Applied Scientific Research, 2011; 8: 942-947.
- [21]. Hosseini-Doust SR, Ahmadi Z, Ahmadi A, Hajia M, Izadi M, Mohabati Mobarez A. Detection of Brucella Abortus by AlkB and IS711 Based Primers. Journal of Research in Medical Sciences, 2007;12(2): 62-67.
- [22]. Peeri Dogahneh H, Valinejad Z, Pourfarzi F. Evaluation of Three DNA Extraction Methods for Detection of Brucella DNA in Human Serum Samples. Arak Medical University Journal ,2012; 14(6( 3: 40-48.



"This journal is following of Committee on Publication Ethics (COPE) and complies with the highest ethical standards in accordance with ethical laws".



## Investigation of *Brucella* bacteria prevalence in samples of raw milk and local sheep cheese supplied in Farsan , Chaharmahal Bakhtiari province by PCR method

Maedeh Sajadian \*, Mojtaba Zangeneh, Mehdi Bahmandehkordi, Eisa Abbasibirgani, Abdoljalil Rigi, Helen Hanaiehvaz

Phd student of Food Hygiene, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.



\*Corresponding author: [maedeh.sa5966@gmail.com](mailto:maedeh.sa5966@gmail.com)

Received: 2023/02/09

Accepted: 2023/01/20

### Abstract

Milk's healthand products are essential in human nutrition due to its high nutritional value. This nutritious snack is one of the most essential sources that microbial agents contaminate. *Brucella* is a Gram-negative coccobacillus whose hosts include humans, cattle, goats, and sheep. *Brucella* is transmitted through milk and dairy products and causes human malt fever. Serological methods for detecting *Brucella* do not have sufficient sensitivity and accuracy and have many false positive and negative results.

This study collected 20 samples of raw milk and 20 samples of local cheese from Farsan City. Became NA of samples extracted by the DNP kit. After optimizing the first and second rounds of the test, PCR sensitivity and specificity were evaluated. Then all the samples were analyzed by optimized PCR test.

Out of 20 raw milk samples, 1 sample (equivalent to 5%) was PCR positive; no PCR-positive sample was observed out of 20 local cheese samples.

Since milk is widely used as a very nutritious and useful snack, the results indicate that despite the efforts made to prevent brucellosis, there is still a possibility of raw milk contamination in the areas Different, there are *Brucella* bacteria.

**Keywords:** *Brucella*, milk, local cheese

**How to cite this article:** Sajadin M, Zangeneh M, Bahmandehkordi M, Abbasibirgani E, Rigim A, Hanaiehvaz H. Investigation of *Brucella* bacteria prevalence in samples of raw milk and local sheep cheese supplied in Farsan , Chaharmahal Bakhtiari province by PCR method. Journal of Zoonosis. 2023; 2 (4): 34 - 41.