ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۹، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۴۰۳(شماره پی در پی ۱۶۳)

مقاله پژوهشی

بررسی میزان شیوع آلودگی شیر و فرآورده‌های لبنی سنتی به باکتری *بروسلا ملی تنسیس* به روش PCR، شهرستان ممسنی، استان فارس، جنوب ایران

محسن کلانتری[۱]، نسرین عسکرپور[۲]، کوروش عزیزی[۳]، مسعود یوسفی[۲]، معصومه امین[۳*]، مظفر واحدی[۳]، علی کشاورز[۴]

[۱]مرکز تحقیقات علوم بهداشتی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران، [۲]گروه بهداشت عمومی، مجتمع آموزش عالی سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، نورآباد ممسنی، ایران، [۳]گروه بیولوژی و کنترل ناقلین بیماری‌ها، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران، [۴]کارشناس توسعه شبکه و ارتقای سلامت، مرکز شهدای والفجر، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

تاریخ وصول: ۱۴۰۲/۰۷/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: سلامت شیر و فرآورده‌های آن به دلیل ارزش بالای غذایی آن از اهمیت بسزایی برخوردار می‌باشد. این میان وعده مغذی، به وسیله عوامل میکروبی آلوده می‌شود. بروسلوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های زئونوز محسوب شده و در کشورهای خاورمیانه به صورت اندومیک شایع بوده و در جمعیت انسانی و دامی نقاط مختلف کشورمان نیز گزارش شده است. بروسلوز، یک بیماری عفونی باکتریایی است که به وسیله میکروارگانیسمی از جنس *بروسلا* ایجاد شده و از طریق شیر و فرآورده های لبنی غیرپاستوریزه انتقال می‌یابد. هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع آلودگی شیر و فرآورده‌های لبنی سنتی به باکتری *بروسلا* ملی تنسیس به روش PCR، شهرستان ممسنی، استان فارس، جنوب ایران می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی- مقطعی که در سال ۱۴۰۰ انجام شد، ۲۰۰ نمونه از فرآورده‌های لبنی سنتی شامل ۵۰ نمونه شیر خام، ۵۰ نمونه ماست، ۵۰ نمونه پنیر و ۵۰ نمونه کره از دامپروری‌های مناطق روستایی و مغازه‌های درون شهری شهرستان ممسنی جمع آوری و به آزمایشگاه میکروب‌شناسی منتقل گردید. جهت تشخیص گونه احتمالی باکتری *بروسلای* موجود در نمونه‌ها، از محیط کشت حاوی ساپلیمنت جهت جلوگیری از رشد سایر پاتوژن‌ها استفاده گردید. DNA نمونه‌ها به وسیله کیت DNp استخراج گردید. جهت بهینه‌سازی تست PCR، نمونهDNA از سوش استاندارد باکتری به روش جوشاندن و DNG (cat:DN 811530) استخراج شد. در هر واکنش، DNA الگو، پرایمرها(Bru و Low Bru Up)، کلرید منیزیوم، dNT و آنزیم Taq DNA پلیمراز مطابق دستورالعمل استفاده شد. واکنش مرحله دوم با همان مقادیر بهینه گردید. در مرحله دوم به جای DNA الگو، از محصول راند اول استفاده شد. پرایمرهای مرحله دوم شامل پرایمرهای Bru Up, Bru In می‌باشد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون آماری کای اسکوئر تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه، به ترتیب ۱/۸۶، ۲/۸، ۰/۳ درصد و صفر درصد از نمونه‌های شیر خام، پنیر، ماست و کره آلوده به باکتری *بروسلا ملی تنسیس* تشخیص داده شد. 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.

نتیجه‌گیری: اگر چه تماس با دام و فرآورده‌های آلوده به باکتری بروسلا به عنوان مهم‌ترین عوامل ابتلا به بروسلوز شناخته شده‌اند، ولی شرایط اقلیمی و نوع دامداری و رفتار غذایی مردم در شیوه استفاده از فرآورده‌های دامی و نیز گونه پاتوژن در هر ناحیه جغرافیایی عواملی هستند که الگوی بروز بیماری را در جوامع مختلف نشان می‌دهد. نتایج به دست آمده نشان می دهد که با وجود اقدامات صورت گرفته جهت پیشگیری از بیماری بروسلوز، هنوز احتمال آلودگی فرآورده‌های لبنی به باکتری *بروسلا* وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: بروسلوز، پی سی آر، شیوع آلودگی

[*]**نویسنده مسئول: معصومه امین**، شیراز، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، گروه بیولوژی و کنترل ناقلین بیماری‌ها

Email: masomeamin@gmail.com

"نشریه علمی پژوهشی ارمغان دانش وابسته به دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یک نشریه با دسترسی آزاد است و تمامی مقالات منتشر شده در این نشریه به صورت دسترسی آزاد منتشر می شوند."

مقدمه

شیر و فرآورده‌های آن از جمله مهم‌ترین مواد غذایی به شمار می‌آیند و مصرف این ماده غذایی به اندازه‌ای دارای اهمیت است که میزان مصرف سرانه آن به عنوان یکی از شاخص‌های توسعه یافتگی کشورها می‌باشد. سرانه مصرف شیر و فراورده های آن در ایران با استانداردهای جهانی فاصله زیادی دارد، به گونه‌ای که ایران با مصرف سرانه حدود ۱۲ لیتر شیر در سال، از مصرف سرانه جهان یعنی حدود ۱۲۲ لیتر فاصله بسیار زیادی دارد. مصرف سرانه شیر در کشورهایی مثل فنلاند و سوئد حدود ۳۲۰ لیتر در سال، در کشور آمریکا حدود ۲۲۰ لیتر در سال و در انگلستان حدود ۲۴۰ لیتر در سال و در کشورهایی مثل سنگال، ویتنام و اکثر کشورهای آفریقایی، کمتر از ۳۰ لیتر در سال برآورد شده است. گفتنی است که تولید شیر در ایران در سال ۲۰۱۳ در حدود ۷/۲ میلیون تن برآورد شده است که در همین سال کشور هند با تولید ۱۳۲ میلیون تن و پس از آن آمریکا با تولید حدود ۳۱ میلیون تن شیر، بیشترین تولیدکنندگان این محصول در جهان بوده‌اند(۱).

امروزه موضوع مصرف شیر و فرآورده‌های حاصل از آن یکی از داغ‌ترین مباحث در علم تغذیه و سلامت است. شیر دارای مواد مغذی زیادی از جمله؛ کلسیم، فسفر، پروتئین، ویتامین‌های گروه ب، پتاسیم، ویتامین D و برخی ویتامین‌ها و املاح دیگر است، علاوه بر این شیر یک منبع فوق‌العاده برای تأمین پروتئین بدن است. نوشیدن شیر در پیشگیری از پوکی استخوان و شکستگی‌های استخوانی به انسان کمک می‌کند. علاوه بر این، تأثیر مصرف شیر در جلوگیری از افزایش وزن نیز اثبات گردیده است. ترکیبات شیر جهت تأمین انرژی، رشد و نمو استخوان‌ها و ماهیچه‌ها در نوزاد ضروری بوده و هم‌چنین از شیر و فرآورده‌های آن به عنوان رژیم مغذی برای افراد بالغ استفاده می‌شود.

شیر و سایر فرآورده‌های آن به دلیل دارا بودن اکثر ترکیبات غذایی، محیط خوبی برای رشد میکروب‌ها نیز محسوب می‌شوند. *بروسلا* یک کوکوباسیل کوچک گرم منفی، داخل سلولی اختیاری، شدیداً هوازی و سخت رشدی است که در گاو، گوسفند، بز و انسان ایجاد بروسلوز بین انسان و دام می‌کند(۲). بروسلوز یک بیماری مشترک انسان و دام است که می‌تواند بافت‌ها و ارگان‌های را تحت تأثیر قرار داده و یک سری علایم غیراختصاصی ایجاد نماید(۳). انسان به صورت تصادفی از طریق تماس با دام یا مصرف فرآورده‌های لبنی آلوده به این بیماری مبتلا می‌شود. بروسلاها بر اساس تفاوت در میزبان اصلی و بیماری‌زایی به شش گونه طبقه‌بندی می‌شوند. از شش گونه بروسلا، تنها چهار گونه آن در انسان بیماری‌زا بوده که قادرند در انسان عفونت ایجاد کنند. *بروسلا آبورتوس*(*Brucella abortus*) عامل تب مالت گاوی می‌باشد که در انسان ایجاد تب مواج(بروسلوز) می‌نماید، البته این بیماری به وسیله گونه‌های *بروسلا ملی تنسیس*(*Brucella melitensis*)، *بروسلاسویس*(*Brucella suis*) و *بروسلاکانیس*

(*Brucella canis*) هم ایجاد می‌شود(۴). گونه‌های *بروسلا* می‌توانند در گوشت یخ زده، به مدت سه هفته، در شیر خام به مدت ۱۰ روز، در پنیر تازه تا ۳ ماه و در بستنی و خامه نیز تا مدتی زنده بمانند. این میکروارگانیسم‌ها در حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد یا در اثر مجاورت با فنل ۱ درصد در مدت ۱۵ دقیقه از بین می روند، ولی در طبیعت می‌توانند تا مدت‌ها زنده بمانند(۵). اپیدمیولوژی تب مالت انسانی در دهه‌های اخیر به دلیل عوامل اجتماعی ـ اقتصادی، بهبود سیستم‌های نظارتی، کنترل حیوانات، برنامه‌های گردشگری و مهاجرت بین‌المللی به طور چشمگیری تغییر کرده است. توزیع جغرافیایی تب مالت انسانی ارتباط نزدیکی با بومی بودن عفونت حیوانات، روش‌های دامپروری، عادات غذایی انسان، استانداردهای بهداشت و سایر فعالیت‌های اجتماعی ـ اقتصادی دارد. خطرات شغلی تب مالت به دلیل امکان انتقال مستقیم عفونت از حیوانات آلوده به افراد شاغل در صنعت دامپروری، به ویژه در کشورهای دارای صنعت دام در حال توسعه که گله‌داری حیوانات هنوز عمدتاً سنتی و غیرعلمی است، مهم می‌باشد(۶). در حال حاضر، بروسلوز در کشورهای با درآمد کم و متوسط به عنوان یک نگرانی جدی برای سلامت در نظر گرفته می‌شود. مطالعه‌ها نشان می‌دهد که هر سال حداقل ۱/۶ تا ۲/۱ میلیون مورد جدید بروسلوز انسانی در جهان رخ می‌دهد(۷). بروز عفونت حاد و اغلب ناتوان کننده در انسان ناشی از *بروسلا* ملیتنسیس معمولاً با وقوع عفونت در گوسفند و بز همزمان است. کانون‌های شناخته شده این عفونت در حوضه مدیترانه، آسیای مرکزی و آمریکای لاتین شناسایی شده است. پژوهش‌های اخیر در بخش‌هایی از آفریقا و هند نشان داده‌اند که عفونت بسیار گسترده‌تر از آنچه قبلاً مشکوک بود، می باشد و با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی در پژوهش‌های اپیدمیولوژیک، کانون‌های بیشتری باقی مانده است. آلودگی گاوی دارای پراکندگی وسیع‌تری است و از نظر زیان اقتصادی از آلودگی گوسفند و بز اهمیت بیشتری دارد. اگرچه عفونت با اقدامات کنترلی به سطح پایینی از بروز در برخی از کشورهای اروپا و آمریکای شمالی کاهش یافته است، اما بروز آن در سایر نقاط جهان به دلیل تأکید بر افزایش تولید و تجمع حیوانات در شرایط بهداشتی نامناسب عملاً افزایش یافته است. این امر به ویژه در مورد واحدهای تولید لبنیات که در اطراف مراکز شهری با رشد سریع در بسیاری از کشورهای در حال توسعه، توسعه یافته‌اند، صادق است(۸). بروسلوز تقریباً در تمام مناطق دنیا(به جز چند جزیره) گسترش دارد. در قاره آفریقا، بیماری بروسلوز به عنوان یک معضل بهداشتی مطرح می‌باشد. بروسلوز در ۴۰ کشور(۸۲ درصد) از ۴۹ کشور آفریقایی شناخته شده یا مشکوک است. دراین میان، در ۲۰ کشور از این کشورها (۴۱ درصد)، بروسلوز مشکل بزرگی است، در ۱۰ کشور(۲۰/۴ درصد) یک مشکل متوسط و در ۱۰ کشور دیگر یک مشکل جزیی برای سلامت و اقتصاد انسان است، از ۹ کشور آفریقایی باقی‌مانده

هنوز گزارشی از بروسلوز اعلام نشده است(۹). در سال ۲۰۲۰، ۱۳۴ مورد تأیید شده بروسلوز در کشورهای عضو اتحادیه اروپا گزارش شده است. بالاترین موارد مربوط به کشورهای یونان، پرتغال و سوئد بود. همه‌گیری کوید۱۹ به طور قابل توجهی بر تعداد موارد گزارش شده بروسلوز در سال ۲۰۲۰ تأثیر گذاشت و تعداد موارد کاهش یافت. بالاترین میزان در مردان ۴۵ تا ۶۴ ساله(۰/۰۵ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر جمعیت) و در زنان بالای ۶۵ سال(۰/۰۴در هر ۱۰۰۰۰۰ جمعیت) مشاهده شد(۱۱و۱۰). در ایالات متحده آمریکا، ۴۸ مورد بروسلوز انسانی در سال ۲۰۲۲ به CDC گزارش شد، که در مقایسه با گزارش ۶۴۰۰ مورد در سال ۱۹۴۷، کاهش چشمگیری را نشان می دهد. گونه های *بروسلا* که بیشترین ارتباط را با سلامتی مردم در ایالات متحده دارند شامل؛ *بروسلا کانیس* در سگ‌ها، *بروسلا سویس* در خوک و *بروسلا آبورتوس* در گاو و گاومیش می‌باشد. اگر چه *بروسلا ملی تنسیس* در ایالات متحده بومی نیست، اما می‌تواند خطری برای مسافران بین‌المللی باشد. در حالی که بروسلوز از دام‌های اهلی در ایالات متحده ریشه کن شده است، تشخیص آن در حیوانات اهلی مانند سگ و مخازن حیات وحش و حضور آنزوتیک در سطح بین‌المللی تهدیدی برای سلامت انسان و حیوانات است و به همین خاطر در کانون توجه قرار دارد(۱۲). بر اساس مطالعه‌های انجام شده، بیماری بروسلوز در کشورهای حاشیه دریای مدیترانه هم‌چنان یک تهدید قابل توجه است. مصرف شیر و فرآورده‌های شیر غیرپاستوریزه آلوده به *بروسلا ملی تنسیس* بیووار ۳ و *بروسلا آبورتوس* بیووار ۱ عامل خطر اصلی برای عفونت انسان است که اغلب از انسان و دام جداسازی می‌شود. در حالی که *بروسلا سوییس* بیووار ۲ عمدتاً در کشورهای اروپایی اطراف دریای مدیترانه یافت می‌شود و *بروسلا سویس* در کشورهای آفریقایی ـ آسیایی به دلیل ترجیحات مذهبی و اجتماعی کمیاب است. بیووارهای بیشتر به صورت پراکنده در کرواسی و ترکیه جدا شده‌اند. بروسلا کانیس با آزمایش‌های سرولوژیکی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) به صورت پراکنده در میان جمعیت سگ‌های یونان، ایتالیا، مونته‌نگر و ترکیه شناسایی شده است(۱۳). تب مالت هم‌چنان یک مشکل بهداشت عمومی در خاورمیانه مانند؛ ایران، عربستان سعودی، مصر، کویت، قطر، اردن، عمان، عراق، امارات متحده عربی، فلسطین، بحرین، سوریه، لبنان و یمن است. برخی از کشورهای خاورمیانه مانند؛ سوریه، عراق، ایران و عربستان سعودی بالاترین میزان بروز سالانه تب مالت را دارند(۱۴). بروسلوز در ایران به عنوان یک بیماری بومی شناخته شده است، اما بروز آن در همه استان‌ها یکسان نیست و در برخی مناطق بیشتر است. استان‌های زنجان، همدان، مرکزی و آذربایجان شرقی بیشترین و استان‌های جنوبی کمترین میزان ابتلا را دارند(۱۸ـ۱۵). این بیماری نه تنها باعث مشکلات جسمی و سلامتی می‌شود، بلکه بار اقتصادی را بر جامعه و دولت تحمیل می‌کند. بر اساس داده‌های وزارت بهداشت ایران، میانگین ابتلا به تب مالت در

ایران ۲۲ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر بوده است که با روند کاهشی نظارت همراه بوده است. علی‌رغم تلاش سازمان دامپزشکی ایران(IVO) برای کنترل تب مالت، هم‌چنان در دام‌های اهلی شیوع دارد. بروسلوز گاوی در ایران ناشی از باکتری‌های بروسلا آبورتوس و به ندرت به وسیله بروسلا ملی تنسیس شایع است و با توجه به این که گاوها در تماس نزدیک با انسان و یا حیوانتی مانند گوسفند و بز قرار می‌گیرند، امکان سرایت بیماری به آنها وجود دارد(۱۹). با توجه به این که عفونت ناشی از *بروسلا* دارای علایم غیراختصاصی است، تشخیص آنها اغلب بر مبنای یافته‌های آزمایشگاهی انجام می‌شود. روش‌های تشخیص *بروسلا* شامل کشت و روش‌های سرولوژیک بر مبنای واکنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی می باشد. امروزه چندین تست سرولوژیک وجود دارد که از آنها برای تشخیص بروسلوز استفاده می‌شود. البته مشکل مهم تست‌های سرولوژیک ایجاد نتایج مثبت کاذب به دلیل واکنش متقاطع با آنتی‌ژن‌های سایر میکروارگانیسم‌ها مانند؛ *یرسینیا انتروکولیتا*، *سالمونلا اورینتالیس*، *ویبریو کلرا*، *فرانسیسلا تولارنسیس* و *اشریشیاکلی* می‌باشد(۲۰). پیشرفت‌های اخیر در علم بیولوژی مولکولی، کمک‌های شایانی به تشخیص سریع و دقیق بسیاری از عوامل عفونی کرده است. روش PCR ردیابی و تشخیص باکتری‌ها و به خصوص باکتری‌های کندر شد را تسهیل کرده و به کمک آن امکان تمایز میان گونه‌ها نیز فراهم شده است. علاوه بر این، استفاده از روش‌های مولکولی قابلیت تشخیص بیماری در هفته‌های اول آلودگی را دارد. روش Nested-PCR یکی از مشتقات تست PCR است که قدرت جداسازی ترکیبات اختصاصی از بین موارد غیراختصاصی را دارد. در سال‌های اخیر از این روش برای تشخیص جنس *بروسلا* و گونه‌های آن استفاده شده است(۲۳-۲۱). در استان فارس به دلیل این که شغل دامداری و کشاورزی از رونق بسیار بالایی برخوردار است، افرادی که در این مناطق زندگی می‌کنند در معرض خطر برای ابتلا به بروسلوز هستند. با توجه به شیوع بیماری بروسلوز در ایران و مساعد بودن شرایط اقلیمی برای شیوع بروسلوز انسانی در استان فارس(۲۵ و۲۴)، فراوانی دامپروی، استقبال از تولید فرآورده‌های لبنی سنتی و غیرپاستوریزه در شهرستان ممسنی و گزارش مواردی از بیماری به وسیله مرکز بهداشت این شهرستان، این تحقیق طراحی شده است. لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی میزان شیوع آلودگی شیر و فرآورده‌های لبنی سنتی به باکتری *بروسلا ملی تنسیس* به روش PCR، شهرستان ممسنی، استان فارس، جنوب ایران بود.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی- مقطعی که در مناطق روستایی و شهری شهرستان ممسنی واقع در استان فارس در تابستان سال ۱۴۰۰ انجام گرفت. این شهرستان با مرکزیت شهر نورآباد با جمعیتی بالغ بر ۱۴۱۰۰۰ هزار نفر(سرشماری سال ۹۰) با وسعت

۵۴۳۸ کیلومتر مربع از شمال به سپیدان و کهگیلویه و بویر احمد، از غرب به بوشهر و کهگیلویه و بویراحمد، از جنوب به کازرون و بوشهر و از شرق به شیراز و سپیدان محدود می گردد. نورآباد در ۵۱ درجه و ۳۱ دقیقه طول جغرافیایی و ۳۰ درجه و ۱۱ دقیقه عرض جغرافیایی و در ارتفاع ۹۲۰ متری از سطح دریا واقع شده است(شکل ۱).

بر اساس مطالعه‌های قبلی انجام شده در استان فارس و دیگر استان‌های کشور(۲۹ـ۲۶) و نیز با استفاده از فرمول تعیین حجم نمونه، در این مطالعه، ۲۰۰ نمونه از فرآورده های لبنی سنتی و غیرپاستوریزه شامل ۵۰ نمونه شیر خام(هر نمونه به میزان ۵۰ سی‌سی)، ۵۰ نمونه ماست محلی(هر نمونه به میزان ۵۰ گرم)، ۵۰ نمونه سرشیر(هر نمونه به میزان ۵۰ گرم) و ۵۰ نمونه پنیر محلی(هر نمونه به میزان ۵۰ گرم) از سطح دامپروری‌های مناطق روستایی شهرستان ممسنی و هم‌چنین مغازه‌های درون شهری آن به صورت تصادفی جمع‌آوری و به صورت جداگانه به ظروف نمونه‌گیری استریل شده که قبلا خریداری شده بودند منتقل گردیدند. سپس نمونه‌ها با رعایت شرایط دمایی مناسب به آزمایشگاه پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز منتقل شده و جهت انجام آزمایشات مورد نیاز آماده شدند.

برای تشخیص باکتری *بروسلا*، جهت بهینه‌سازی تست PCR، نمونهDNA از سوش استاندارد باکتری به روش جوشاندن و (cat:DN 811530) DNG استخراج شد(۷). در هر واکنش PCR، ۵ میکرولیتر DNA الگو(DNA استخراجی از نمونه)، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10x پی سی آر ، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها(Bru و Low Bru Up) ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیوم ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر از dNT ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۴ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA پلیمراز ۵ واحد در میکرولیتر ، 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 می باشد.

Bru Low 5` GGG CAA GGG TCG GTG TTT3
In 5` GGG ACG GGC AGG CGA GAG3` Bru
Bru up 5` GGG CAA GGT GGA AGA TTT 3`

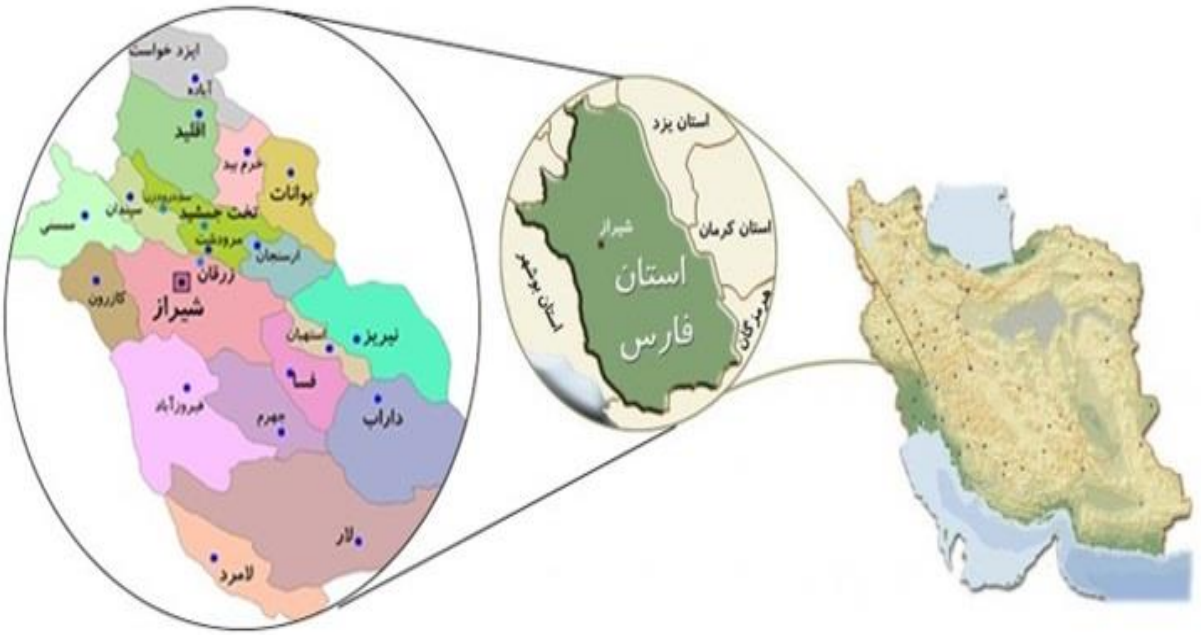
دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، چسبیدن در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه به تعداد ۴۰ سیکل، بهینه گردید. در مرحله دوم، واکنش به صورت دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، چسبیدن در ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه به تعداد ۴۰ سیکل، بهینه شد(۸). در نهایت برای بررسی محصول تکثیر یافته از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شده است. رنگ‌آمیزی

ژل با استفاده از Safe stain (۰/۰۰۰۱ سیناژن) انجام شده است.

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. جهت تأیید تست اختصاصیت، PCR بهینه شده با DNA استخراج شده و دو میکروارگانیسم شامل هپاتیت B، هپاتیت C، DNA انسانی و موش به همراه کنترل منفی مورد مطالعه قرار گرفت.

در این مطالعه، ۲۰۰ نمونه DNA لبنی(شامل ۵۰ نمونه شیر خام، ۵۰ نمونه ماست، ۵۰ نمونه سرشیر و ۵۰ نمونه پنیر) جمع‌آوری شد. DNA نمونه به عنوان الگو در تست PCR مورد ارزیابی قرارگرفت.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری کای اسکوئر تجزیه و تحلیل شدند.



شکل ۱: منطقه تحت مطالعه، شهرستان ممسنی، استان فارس، جنوب ایران، سال ۱۴۰۰

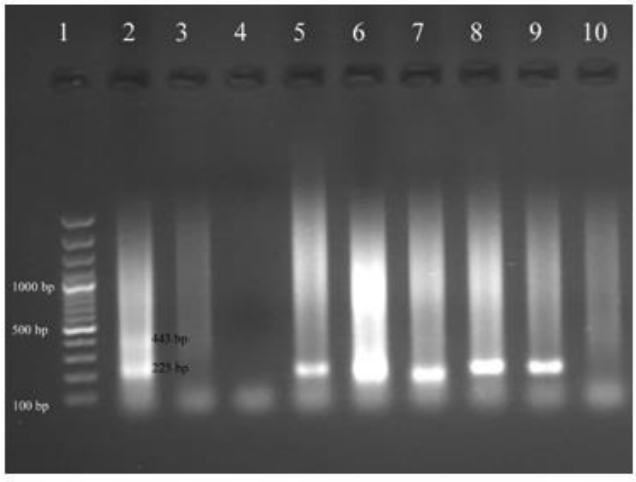
یافته‌ها

محصول PCR بر روی ژل آگارز بارگذاری شد، اندازه قطعه به دست آمده با استفاده از پرایمرهای بیرونی(مرحله اول) 443 bp به دست آمد.

در این واکنش، محصول واکنش مرحله اول، به عنوان DNA الگوی مورد استفاده قرار گرفت و محصول تکثیر شده در کنار نمونه کنترل منفی و سایز مارکر بر روی ژل الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفت. باند حاصل از محصول PCR در مرحله دوم واکنش دارای 225 جفت باز طول داشت.

از ۵۰ نمونه شیر غیرپاستوریزه، ۱ نمونه (۲درصد) در راند دوم به باکتری *بروسلا ملی تنسیس* مثبت شدند.

از ۵۰ نمونه پنیر سنتی، ۳ نمونه(۶ درصد) در راند دوم به باکتری *بروسلا ملی تنسیس* مثبت شدند. از ۵۰ نمونه ماست سنتی، ۱ نمونه(۲ درصد) در راند دوم به باکتری *بروسلا ملی تنسیس* مثبت شدند. از ۵۰ نمونه کره سنتی، هیچ‌کدام در راند دوم مثبت نشدند. برای تعیین اختصاصیت تست PCR بهینه شده تا ۱۰۰ پارتیکل 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(شکل ۲).



شکل ۲: نتایج آزمون های PCR انجام شده بر روی شیر و فرآورده‌های لبنی سنتی به باکتری *بروسلا ملی تنسیس* در شهرستان ممسنی در استان فارس، سال ۱۴۰۰: مارکر(شماره ۱)، نمونه کنترل مثبت *بروسلا ملی تنسیس*(شماره۲)، نمونه کنترل منفی(شماره ۳)، نمونه شیر خام(شماره ۴)، نمونه شیر خام آلوده به *بروسلا ملی تنسیس*(شماره ۵)، نمونه های پنیر سنتی آلوده به *بروسلا ملی تنسیس*(شماره‌های ۸-۶)، نمونه ماست سنتی آلوده به *بروسلا ملی تنسیس*(شماره ۹)، نمونه کره سنتی منفی(شماره ۱۰).

بحث

در این پژوهش از میان ۲۰۰ نمونه فرآورده لبنی سنتی(۵۰ نمونه شیر خام، ۵۰ نمونه ماست، ۵۰ نمونه سرشیر و ۵۰ نمونه پنیر)، به ترتیب؛ ۱/۸۶، ۲/۸ و ۰/۳ درصد از نمونه‌ها آلوده به باکتری *بروسلا ملی‌تنسیس* تشخیص داده شد و هیچ‌کدام از نمونه‌های کره محلی آلوده به باکتری *بروسلا* نبودند. در مطالعه حاضر جهت تعیین آلودگی فرآورده‌های لبنی به باکتری *بروسلا*، از تکنیک Nested-PCR استفاده شد. در این تکنیک از پرایمرهای استفاده شد تا احتمال حصول نتایج غیراختصاصی به مراتب کاهش یابد. به علاوه، با استفاده از دو مرحله PCR پی در پی، حساسیت تست به شدت افزایش یافت. نمونه‌هایی که در مرحله اول به دلیل مقدار کم DNA و واکنش ضعیف منفی گزارش شده بودند، در مرحله دوم واکنش شدت یافته به طوری که در مرحله دوم نتیجه واکنش مثبت شد. تشخیص سریع و دقیق عوامل بیماری‌زا در لبنیات مهم‌ترین عامل برای پیشگیری از بیماری‌های منتقله از راه غذا می‌باشد. با توجه به نتایج می‌توان بیان نمود که تست Nested-PCR مورد بررسی در این مطالعه از حساسیت و دقت بسیار بالایی برخوردار است. هم‌چنین روش‌های مولکولی به عنوان روش‌های مکمل جهت تشخیص بروسلا در کنار روش‌های رایج مورد استفاده قرار گیرند.

در مطالعه سجادیان و همکاران که در شهرستان فارسان انجام شد، از مجموع ۲۰ نمونه شیر خام و ۲۰ نمونه پنیر محلی، یک نمونه از شیر خام (معادل ۵ درصد) با تست PCR مثبت گزارش شد، ولی نمونه‌های پنیر محلی منفی گزارش شدند(۲۷). در مطالعه دیگری که در شهرستان نیشابور انجام شد، از تعداد ۸۲ نمونه شیر فقط یک نمونه(۱/۲۱ درصد) آلوده به *بروسلا* تشخیص داده شد که پس از انجام تست PCR *بروسلا آبورتوس بایوار۲* تشخیص داده شد(۳۰).

در مطالعه خداوردی پور و همکاران در شهرکرد، که با هدف تشخیص باکتری *بروسلا* در لبنیات به وسیله Real Time PCR انجام شد، ۲۵ نمونه شیر محلی گاو و ۲۵ نمونه پنیر محلی گاوی از مناطق مختلف شهرستان شهرکرد جمع‌آوری شد. در این تحقیق تنها در۲ نمونه شیر(۴ درصد) *بروسلا آبورتوس* تشخیص داده شد و در نمونه‌های پنیر آلودگی به *بروسلا* گزارش نگردید(۳۱).

در مطالعه‌ای که در سال ۱۳۹۵ در شیراز انجام شد، از مجموع ۲۳۸ نمونه فرآورده لبنی غیر پاستوریزه، ۵/۰۴ درصد از فرآورده ها به روش PCR آلوده به *بروسلا* گزارش شدند که بیشترین میزان آلودگی مربوط به شیر خام (۱۸/۷۵ درصد) و ماست محلی(۶/۲۵ درصد) گزارش شد(۳۲).

در مطالعه مسلمی و همکاران در سال ۲۰۱۸ تعداد ۲۰۸ نمونه شامل؛ شیر خام و پاستوریزه بز، گوسفند، گاو و هم‌چنین پاستوریزه و غیر پنیر پاستوریزه در استان تهران جمع‌آوری شده و پس از استخراج DNA از آنها، با استفاده از تکنیک Real-time PCR جهت بررسی وجود باکتری *بروسلا* مورد

آزمایش قرار گرفتند. در این مطالعه ۴۵/۵ درصد در شیر خام بز، ۳۹/۱ درصد در پنیر غیر پاستوریزه، ۲۷/۳ درصد در شیر خام گوسفند، ۲۶/۳ درصد در شیر خام گاو، ۲۵ درصد در پنیر پاستوریزه و ۱۴/۷ درصد در شیر پاستوریزه آلودگی ثبت گردید(۳۳).

در مطالعه عسگری و همکاران در استان کردستان، که با هدف تعیین آلودگی شیر گاوهای این استان انجام شد، از مجموع ۲۴۰ نمونه شیر جمع‌آوری شده از سطح گاوداری‌های سنتی و صنعتی، به طور کلی ۱۶ نمونه(۶/۶۶ درصد) به گونه‌های *بروسلا* آلوده بودند و در مجموع میزان آلودگی در نمونه‌های شیر سنتی بیشتر از نمونه‌های صنعتی بود(۳۴).

در مطالعه انجام شده در کشور آلمان، بر روی ۲۰۰ نمونه پنیر محلی که ار شیر گاو، گوسفند و بز تهیه شده بود و در بازارهای هفتگی، سوپرمارکت‌ها و اغذیه فروشی‌ها در برلین فروخته می شدند، تست PCR برای تشخیص آلودگی به *بروسلا* انجام شد که تعداد ۴۱ مورد(۲۰/۵ درصد) مثبت بودند. در اروپای غربی سفر و مهاجرت محرک‌های اصلی تب مالت انسانی است. عفونت معمولاً از طریق مصرف شیر یا فرآورده‌های لبنی غیر پاستوریزه در داخل یا از مناطق آندمیک منتقل می‌شود. اگرچه در آلمان و اکثر کشورهای عضو اتحادیه اروپا بیماری از دام‌ها ریشه کن می‌شود، ولیکن سالانه تعداد قابل توجهی از موارد بروسلوز انسانی گزارش شده است که به نظر می‌رسد بروسلا در پنیر و شیر خام وارداتی، هنوز به عنوان یک چالش برای استانداردهای ایمنی مواد غذایی در اتحادیه اروپا مطرح باشد. واردات کنترل نشده فرآورده‌های لبنی از مناطق آندمیک می‌تواند علت عفونت بروسلای انسانی در کشورهای اتحادیه اروپا باشد(۳۵).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۲ در کشور تونس صورت گرفت، ۲۰۰ نمونه شیر خام، پنیر ریکوتا(نوعی پنیر ایتالیایی) و پنیر تازه محلی از چهار منطقه تونس جمع‌آوری شده و از نظر آلودگی به بروسلا به روش Real-time PCR مورد آزمایش قرار گرفتند. DNA گونه‌های *بروسلا* در ۷۵ درصد از نمونه‌ها شناسایی شد و در این میان *بروسلا آبورتوس* در ۳۱/۳ درصد و *بروسلا ملی تنسیس* در ۵/۳ درصد از نمونه‌های مثبت مشاهده شد. در این مطالعه بیشترین آلودگی به ترتیب در پنیر ریکوتا، پنیر محلی و شیر خام گزارش گردید(۳۶).

با توجه به عدم همکاری برخی از مراکز تهیه فرآورده‌های لبنی سنتی به دلیل ترس و نگرانی آنها از تبعات بهداشتی آن، تضمین‌های لازم بایستی به آنها داده شود تا یک همکاری دوجانبه جهت رسیدن به اهداف کارهای این گونه تحقیق‌ها فراهم گردد. با توجه به اهمیت فرآورده‌های لبنی و نقشی که در سلامت جامعه دارند، مطالعه‌ها تکمیلی مولکولی بسیار مفید به نظر می‌رسد. در کنار این مطالعه‌ها، آگاهی بخشی به جامعه مصرف کننده این فرآورده‌ها در مورد خطرات ناشی از مصرف فرآورده‌های آلوده و بیماری‌زا

می‌تواند در بالا بردن سطح سلامت جامعه بسیار مفید باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده نشان‌گر این مطلب می‌باشد که علی‌رغم تلاش‌های انجام شده جهت جلوگیری از بیماری بروسلوز، هنوز هم احتمال آلودگی شیرخام، در نواحی مختلف، به باکتری *بروسلا* وجود دارد. بنابراین لازم است جهت جلوگیری از بروز بیماری بروسلوز و نیز سایر بیماری‌های گوارشی، از مصرف فرآورده‌های لبنی به صورت خام خودداری شده و فرآیند پاستوریزاسیون و یا جوشاندن شیر، جهت نابودی و غیرفعال شدن عوامل میکربی موجود در آن به طور کامل انجام پذیرد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این پژوهش بر خورد لازم دانستند از همکاری معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شیراز که محققین را در این طرح یاری نمودند، صمیمانه تشکر نمایند.

تعارض منافع

بنا بر اظهار نویسندگان، هیچگونه تعارض منافعی وجود ندارد.

حمایت مالی

این تحقیق با حمایت مالی و معنوی دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام شده است.

ملاحظات اخلاقی

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی با کد اخلاق IR.SUMS.REC.1399.956 از دانشگاه علوم پزشکی شیراز می‌باشد.

مشارکت نویسندگان

نفر اول: طراحی و سرپرستی ایده و ثبت طرح تحقیقاتی و تهیه مقاله اولیه، نفر دوم، مجری دانشجویی طرح و جمع‌آوری نمونه‌ها و ویرایش مقاله، نفر سوم و چهارم ، مشارکت در طراحی ایده و نظارت بر انجام طرح و ویرایش مقاله، نفر پنجم، انجام آزمایشات و مشارکت در تهیه مقاله اولیه و ویرایش آن و ششم و هفتم، تجزیه و تحلیل داده ها و مشارکت در تهیه مقاله اولیه. کلیه نویسندگان مقاله تهیه شده را بازنگری و تأیید کردند.

REFERENCES

1.Górska-Warsewicz H, Rejman K, Laskowski W, Czeczotko M. Milk and dairy products and their nutritional contribution to the average polish diet. Nutrients 2019; 11(8): 1771.
2.Franc KA, Krecek RC, Häsler BN, Arenas-Gamboa AM. Brucellosis remains a neglected disease in the developing world: a call for interdisciplinary action. BMC Public Health 2018;18: 125-33.
3.Al-Mariri A, Haj-Mahmoud N. Detection of *Brucella abortus* in bovine milk by polymerase chain reaction. Acta Vet Brno 2010; 79: 277-80.
4. Maksimović Z, Jamaković A, Semren O, Rifatbegović M. Molecular detection of *Brucella* spp. in clinical samples of seropositive ruminants in Bosnia and Herzegovina. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 2022; 86: 101821.
5.Di Bonaventura G, Angeletti S, Ianni A, Petitti T, Gherardi G. Microbiological laboratory diagnosis of human brucellosis: an overview. Pathogens 2021; 10(12): 1623.
6.Lokamar P, Kutwah M, Atieli H, Gumo S, Ouma C. Socio-economic impacts of brucellosis on livestock production and reproduction performance in Koibatek and Marigat regions, Baringo County, Kenya. BMC Vet Res 2020; 16(1): 61.
7.Laine C, E. Johnson V, Scott M, and Arenas-Gamboa A. Global estimate of human brucellosis incidence. Emerging Infectious Diseases 2023; 29(9): 1789-97.
8.Arockiaraj J, AlDawood M, Al Mufarriji R, Attia WI, N. AlMusrea K. Brucellosis of the spine - A global public health problem - An analysis of 37 patients from a 'high risk' region. Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma 2023; 38: 102-24.
9.Ducrotoy M, Bertu WJ, Matope G, Cadmus S, Conde-Álvarez R, Gusi AM, et al. Brucellosis in Sub-Saharan Africa: Current challenges for management, diagnosis and control. Acta Tropica 2017; 165: 179-93.
10.European Centre for Disease Prevention and Control. Introduction to the Annual Epidemiological Report. In: http://ecdc.europa.eu/annual-epidemiological-reports/methods.
11.Buttigieg SC, Savic S, Cauchi D, Lautier E, Canali M, Aragrande M. Brucellosis control in Malta and Serbia: One Health evaluation. Front Vet Sci 2018; 5: 147.
12.Pinn-Woodcock T, Frye E, Guarino C, Franklin-Guild R, Newman A, Bennett J, et al. A one-health review on brucellosis in the United States. Journal of the American Veterinary Medical Association 2023; 261(4): 451-62.
13.Refai M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. Veterinary Microbiology 2002; 90: 81-11.
14.Abedi A, Hashempour F, Mirza Alizadeh A, Beikzadeh S, Hosseini H, Bashiry M, et al. The prevalence of *Brucella* spp. in dairy products in the middle east region: A systematic review and meta-analysis. Acta Tropica 2020; 202: 105241.
15.Hosseini S, Tanomand A, Rajabzadeh R, Ahmadpour M. Epidemiological aspects of Brucellosis in Bane County during 2011–2012. Journal of North Khorasan University of Medical Sciences 2016; 7(3): 485-94.
16.Pakzad R, Barati M, Moludi J, Barati H, Pakzad I. Epidemiology of brucellosis in the north and north-west Iran. Paramedical Sciences and Military Health 2016; 11(1): 17-23.
17.Akbarmehr J. Survery 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): 203-6.
18.Zeinali M, Doosti S, Amiri B, Gouya MM, Godwin GN. Trends in the epidemiology of brucellosis cases in iran during the last decade. Iran J Public Health 2022; 51(12): 2791-8.
19.Alamian S, Bahreinipour A, Amiry K, Dadar M. The control program of brucellosis by the Iranian veterinary organization in industrial dairy cattle farms. Archives of Razi Institute 2023; 78(3): 1107-14.
19.Xu N, Qu C, Sai L, Wen S, Yang L, Wang S, Yang l, Wang S, et al. Evaluating the efficacy of serological testing of clinical specimens collected from patients with suspected brucellosis. PLoS Negl Trop Dis 2023; 17(2): e0011131.
20.Narayan Sarangi L, Sri Naga Leela K, Kumar Rana S, Naveena T, Prasad A, Muthappa N, et al. Evaluation of commercial ELISA kits for diagnosis of brucellosis in cattle and buffaloes in different epidemiological scenarios. Journal of Microbiological Methods 2022; 195: 106449.
21.Alamian S, Esmaelizad M, Zahraei T, Etemadi A, Mohammadi M, Afshar D, Ghaderi S. A novel pcr assay for detecting brucella abortus and brucella melitensis. Osong Public Health Res Perspect 2017; 8(1): 65-70.

22.Rahbarnia L, Farajnia S, Naghili B, Saeedi N. Comparative evaluation of nested polymerase chain reaction for rapid diagnosis of human brucellosis. Arch Razi Inst 2021; 76(2): 203-11.
23.Zamanian M, Jahani E, Mahmoudi H. Multiplex PCR assay for the simultaneous detection of the brucella genus in human whole blood and serum. The Open Microbiology 2020; 14: 242-6.
24.Dehghan A, Sadeghian M, Jafarnejad A. Epidemiologic survey of brucellosis in fasa during 2009-2017. Medical Journal of Mashhad University of Medical Sciences 2019; 62(2): 0441.
25.Karimi A, karimi B. Epidemiological status of brucellosis in abadeh county, fars province, Iran in 2011-2017. JCHR 2018; 7(3): 183-91.
26.Yezadi A, Moslemi E, Yazdi AH. Identification of Brucella species in raw milk and cheese samples using the Hemi Nested PCR technique. NCMBJ 2012; 2: 83-89.
27.Sajadin M, Zangeneh M, Bahmandehkordi M, Abbasibirgani E, Rigim A, Hanaieahvaz H. Investigation of Brucella bacteria prevalence in samples of raw milk and local sheep cheese supplied in Farsan, Chaharmahal Bakhtiari province province by PCR method. Journal of Zoonosis 2023; 2(4): 34-41.
28.Marouf AS, Hanifian S, Shayegh J. Prevalence of brucella spp. in raw milk and artisanal cheese tested via real-time qPCR and culture assay. Int J Food Microbiol 2021; 347: 109192.
29.Abedi A, Hashempour Baltork F, Alizadeh AM, Beikzadeh S, Hosseini H, Bashiry M, et al. The prevalence of *Brucella* spp. in dairy products in the middle east region: A systematic review and meta-analysis. Acta Tropica 2020; 202: 105241.
30.Zaim A, Tejalipour F, Tairani Kamel MR. Investigating the level of contamination of local (raw) milk with *Brucella* and *Escherichia coli* in the area of Neishabur city. The irst national snack conference. holy Mashhad; 2013; 10-11.
31.Khodavardipour F, Arbab Soleimani N, Bron Y. Contamination of brucellosis in milk and cheese by Real time PCR. New Approaches in Cellular and Molecular Sciences 2023; 1: 1-9.
32.Abdali F, Hosseinzadeh S, Berizi E, Pourmontaseri M. Prevalence of *brucella* species in unpasteurized dairy products consumed in shiraz province using PCR assay. Mol Biol Res Commun 2020; 9(3): 117-21.
33.Moslemi E, Soltandalal MM, Beheshtizadeh Mr, Taghavi A, Kheiri Manjili H, Mahmoudi Lamouki R, et al. Detection of *brucella* spp. in dairy products by Real-Time PCR. Arch Clin Infect Dis 2018; 13(1): e12673.
34.Asgari MH, Ahmadi E. Contamination of bovine milk with *brucella* spp.: a current public health menace in kurdistan province of Iran. Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection 2021; 8(1): 17-22.
35.Jansen W, Linard C, Noll M, Nöckler K, Al Dahouk S. *Brucella*-positive raw milk cheese sold on the inner European market: A public health threat due to illegal import? Food Control 2019; 100: 130-7.
36.Béjaoui A, Ben Abdallah I, Maaroufi A. Brucella spp. Contamination in Artisanal Unpasteurized Dairy Products: An Emerging Foodborne Threat in Tunisia . Foods 2022; 11(15): 2269.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Investigating the Rate of Contamination of Milk and Traditional Dairy Products with *Brucella* Bacteria by PCR Method, Mamasani District, Fars Province, South of Iran

Kalantari M[1], Askarpour N[2], Azizi K[3], Yousefi M[2], Amin M[3*], Vahedi M[3], Keshavarz A[4]

[1]Research Center for Health Sciences, Institute of Health, Department of Vector Biology and Control of Diseases, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran, [2]Department of Public Health, Mamasani School of Allied Medical Sciences, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran, [3]Department of Vector Biology and Control of Diseases, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran, [4]Shohadaye Valfajr Health Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

Received: 12 Oct 2023 Accepted: 04 Feb 2024

Abstract

Background & aim: The health of milk and its products is of great importance due to its high nutritional value. This nutrient medium is contaminated by microbial agents. Brucellosis is considered one of the most important zoonotic diseases and is endemic in the Middle East countries and has been reported in human and livestock populations in different parts of Iran. Brucellosis is an infectious bacterial disease caused by a microorganism of the genus Brucella and transmitted through unpasteurized milk and dairy products. The aim of the present study was to investigate the prevalence of contamination of milk and traditional dairy products with *Brucella* bacteria by PCR method, Mamasani district, Fars province, south of Iran.

Methods: In the present cross-sectional descriptive study conducted in 2021, 200 samples of traditional dairy products including 50 samples of raw milk, 50 samples of yogurt, 50 samples of cheese and 50 samples of butter from livestock farms in rural areas and inner-city shops of Mamasani district were collected and transferred to the microbiology laboratory. In order to identify the possible type of Brucella bacteria in the samples, the culture medium containing the supplement was used to prevent the growth of other pathogens. DNA of samples was extracted by DNp kit. In order to optimize the PCR test, the DNA sample was extracted from the standard strain of bacteria by boiling method and (cat: DN 811530) DNG. In each reaction, template DNA, primers (Bru and Low Bru Up), magnesium chloride, dNT and Taq DNA polymerase enzyme were used according to the instructions. The second step reaction was optimized with the same values. In the second step, instead of template DNA, the product of the first round was used. Second stage primers include Bru Up, Bru In primers. The collected data were analyzed using SPSS software and chi-square statistical test.

Results: The results of the present study indicated that 1.86%, 2.8%, 0.3% and 0% of raw milk, cheese, yogurt and butter samples were infected with *Brucella melitensis* bacteria, respectively. The optimized PCR test had a very high specificity, as a result it did not react with any of the studied DNAs except Brucella DNA.

Conclusion: Although contact with animals and products infected with *Brucella* bacteria are known as the most important factors of brucellosis, but then again the climatic conditions and the type of animal farming and the eating behavior of the people in the way of using animal products as well as the pathogen species in each geographical area are the factors that determine the pattern of the disease. It displays the incidence of disease in different societies. The obtained results indicated that despite the measures taken to prevent Brucellosis disease, there was still a possibility of contamination of dairy products with *Brucella* bacteria.

Keywords: Brucellosis, PCR, Fars, Iran

***Corresponding author: Amin M,** Department of Vector Biology and Control of Diseases, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
Email: masomeamin@gmail.com

Please cite this article as follows: Kalantari M, Askarpour N, Azizi K, Yousefi M, Amin M, Vahedi M, Keshavarz A. Investigating the Rate of Contamination of Milk and Traditional Dairy Products with *Brucella* Bacteria by PCR Method, Mamasani District, Fars Province, South of Iran. Armaghane-danesh 2024; 29(2): 231-244.

The scientific research journal Armaghan Danesh, affiliated with Yasuj University of Medical Sciences, is an open-access publication. All articles published in this journal are freely available to the public.