



Semnan University



Research Article

## Investigation of the prevalence and antibiotic susceptibility of *Brucella melitensis* in dairy products supplied in Garmsar County

Negin Eiji <sup>1</sup>, Ebrahim Rahimi <sup>2\*</sup>

### Abstract

Raw milk contaminated with *Brucella* species is one of the most important ways of transmitting brucellosis to humans. The aim of the present study was to investigate the prevalence and antibiotic susceptibility of *Brucella melitensis* in dairy products sold in Garmsar city. In this study, 180 dairy samples including raw Milk cow, sheep, goat and buffalo, traditional cheese, and traditional yogurt sold in Garmsar city were sampled and transferred to the laboratory under cold conditions. The samples were detected by MRT test, streak culture, and Multiplex PCR, and their antibiotic resistance was determined by the Kirby-Bauer disk diffusion method. The results showed that the MRT method determined the infection rate of *Brucella melitensis* to be 11.11%, streak culture to be 22.22%, and PCR to be 7.78%. The frequency of virulence genes was *bvfA* in 9 samples (64.25%), *virfB* in 5 samples (35.74%), and *ure* in 3 samples (21.42%). Antibiotic resistance showed that the highest resistance was to tetracycline (92.5%) and ampicillin (82.5%) and the lowest resistance was to rifampin and imipenem (0%). According to the results obtained, it can be concluded that the consumption of raw and traditional dairy products can be a source of transmission of malt fever to humans and the use of traditional and unpasteurized dairy products should be prohibited.

**Keywords:** Malt fever, *Brucella melitensis*, virulence gene, antibiotic resistance, dairy products.

1.Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Quality Control Health, Shahrekord Azad University, Shahrekord, Iran.

2.Department of Food Hygiene, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

\*Corresponding author: ebrahimrahimi55@yahoo.com

DOI: [10.22075/jvlr.2025.35717.1134](https://doi.org/10.22075/jvlr.2025.35717.1134)

Received: 23.10.2024

Accepted:19.01.2025

### How to Cite this Article:

Eiji, N., & Rahimi, E. (2025). Investigation of the prevalence and antibiotic susceptibility of *Brucella melitensis* in dairy products supplied in Garmsar County. Journal of Veterinary Medicine & Laboratory,16(2), 131-141. doi:10.22075/jvlr.2025.35717.1134



## بررسی شیوع و حساسیت آنتی بیوتیکی بروسلا ملی تنسیس در لبنیات عرضه شده در شهرستان گرمسار

نگین ایچی<sup>۱</sup> ID، ابراهیم رحیمی<sup>۲\*</sup>

### خلاصه

شیر خام آلوده به انواع بروسلا از مهم ترین راه های انتقال بروسلوز به انسان است. هدف اصلی از مطالعه حاضر بررسی شیوع و حساسیت آنتی بیوتیکی بروسلا ملی تنسیس در لبنیات عرضه شده در شهرستان گرمسار است. در این پژوهش ۱۸۰ نمونه لبنیات شامل شیر خام گاو، گوسفند، بز، گاو میش، پنیر سنتی و ماست سنتی عرضه شده در شهرستان گرمسار نمونه گیری و در شرایط سرما به آزمایشگاه انتقال داده شد. نمونه ها توسط تست MRT، کشت خطی و Multiplex PCR ردیابی شده و به روش انتشار دیسک کربی-بائر مقاومت آنتی بیوتیکی آن ها تعیین شد. نتایج نشان داد روش MRT میزان آلودگی بروسلا ملی تنسیس ۱۱/۱۱ درصد، کشت خطی ۲۲/۲۲ درصد و PCR ۷/۷۸ درصد تعیین شد. فراوانی ژن های حدت bvfA ۹ نمونه (۶۴/۲۵ درصد)، virfB ۵ نمونه (۳۵/۷۴ درصد)، ure ۳ نمونه (۲۱/۴۲) بود. مقاومت آنتی بیوتیکی نشان داد بیشترین مقاومت مربوط به تتراسایکلین (۹۲/۵ درصد) و آمپی سیلین (۸۲/۵ درصد) و کمترین مقاومت برای ریفامپین و ایمی پنم (۰ درصد) بود. با توجه به نتایج به دست آمده می توان نتیجه گرفت مصرف لبنیات خام و سنتی می تواند منبع انتقال بروسلوز به انسان باشد و باید استفاده از لبنیات سنتی و غیرپاستوریزه ممنوع گردد و حساسیت ها نسبت به وضع قوانین سختگیرانه نسبت به مراکز عرضه بیشتر شود.

**واژه های کلیدی:** تب مالت، بروسلا ملی تنسیس، ژن حدت، مقاومت آنتی بیوتیکی، لبنیات.

۱. دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت کنترل کیفی مواد غذایی، دانشگاه آزاد شهرکرد، شهرکرد، ایران.

۲. گروه بهداشت مواد غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

\*نویسنده مسئول: ebrahimrahimi55@yahoo.com

DOI: [10.22075/jvlr.2025.35717.1134](https://doi.org/10.22075/jvlr.2025.35717.1134)

دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۰۲

پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۳۰

شیر و فراورده‌های لبنی به لحاظ دارا بودن ارزش غذایی بالا، در تغذیه انسان دارای نقش بسزایی هستند. از سوی دیگر به علت دارا بودن اکثر عناصر و ترکیبات غذایی، محیط مطلوبی جهت رشد و فعالیت بسیاری از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا هستند؛ بنابراین عدم رعایت اصول بهداشتی در تهیه و نگهداری فراورده‌های لبنی، عوارض و خطرات بهداشتی عدیده‌ای را در مصرف‌کنندگان این قبیل مواد غذایی به همراه خواهد داشت (Bibi et al., 2024). آلودگی شیر خام و فراورده‌های آن از نگرانی‌های مهم برای سلامت عمومی است. کشورهای توسعه یافته مقررات و اقدامات کنترلی سختگیرانه‌ای مانند برنامه‌های آزمایشی و واکسیناسیون اجباری را برای عاری بودن دام‌های شیرده از ابتلا به تب مالت اجرا کرده‌اند. شیر خام و فراورده‌های آن از حیوانات مختلف (گاو، بز، گوسفند، الاغ، گاو میش، گاو میش و شتر) به دلیل مقرون به صرفه بودن، در دسترس بودن، وضعیت فرهنگی و سنتی به طور فزاینده‌ای در کشورهای در حال توسعه محبوبیت دارند. با این حال، این روند نگرانی‌هایی را در مورد بیماری‌های بالقوه ناشی از مواد غذایی مرتبط با محصولات لبنی غیر پاستوریزه ایجاد می‌کند. یکی از بیماری‌هایی مشترک بین انسان و دام، تب مالت است که سالانه ۵ تا ۱۲/۵ میلیون مورد در انسان رخ می‌دهد و این بیماری به عنوان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام در سراسر جهان در نظر گرفته می‌شود (Dadar et al., 2019)، و در کشورهای پیشرفته نیز ۴ تا ۱۰ درصد موارد بروسلوز تشخیص داده شده است (Mpatwenumugabo et al., 2023). محصولات لبنی تازه به دلیل آن که از شیر غیرپاستوریزه تهیه و نیز فرایند تخمیری در آن به‌طور کامل صورت نمی‌گیرد، در صورت آلوده بودن، به راحتی عامل تب مالت را در خود حفظ می‌کنند. از آنجایی که عامل بیماری بروسلوز (تب مالت) از طریق ترشحات شیر دام‌های آلوده دفع می‌گردد، مصرف فراورده‌های شیری غیرپاستوریزه در مناطق آلوده به بروسلوز یکی از عمده‌ترین راه‌های انتقال بیماری تب مالت به انسان محسوب می‌شود (Eltholth et al., 2024). شایع‌ترین گونه‌هایی که مسئول عفونت انسان هستند عبارتند از بروسلا آبورتوس، بروسلا ملی‌تنسیس و بروسلا سوئیس هستند، در حالی که بروسلا کنیس نیز خطر ابتلا به

بروسلوز را در انسان به همراه دارد (Islam et al., 2023). در میان گونه‌های بروسلا، سویه‌های بروسلا ملی‌تنسیس مسئول اکثر عفونت‌ها در انسان هستند، با این حال، بروسلا کنیس، بروسلا سوئیس و بروسلا آبورتوس در میزان کمتری می‌توانند عفونت‌های باکتریایی را انتقال دهند (Dadar et al., 2024)؛ همچنین بروسلا اویس در انسان بیماری‌زا نیست (JM, 2023).

تب مالت که با نام‌های تب مدیترانه‌ای و تب موج نیز شناخته می‌شود، یکی از عفونت‌های مهم مشترک بین انسان و دام است که می‌تواند توسط چندین گونه باکتری گرم منفی متعلق به جنس بروسلا ایجاد شود. این بیماری از طریق مصرف شیر خام و لبنیات آلوده به انسان منتقل می‌شود. اگرچه تماس مستقیم با حیوانات آلوده و کار در آزمایشگاه‌های پزشکی از دیگر منابع مهم آلودگی است. این بیماری به عنوان یکی از مهم‌ترین خطرات شغلی نادیده گرفته شده در سراسر جهان توسط دفتر بین‌المللی بیماری‌های همه‌گیر (OIE)، سازمان بهداشت جهانی (WHO) و سازمان غذا و کشاورزی سازمان ملل متحد (FAO) طبقه‌بندی شده است (Dadar et al., 2020).

تشخیص دقیق و شناسایی گونه‌های بروسلا جدا شده از منابع انسانی و غیر انسانی برای درمان سریع بسیار مورد نیاز است. از آنجا که میزان شیوع تب مالت ارتباط بسیار نزدیکی با میزان شیوع بروسلوز در دام دارد، نمی‌توان بدون کنترل و یا مبارزه جدی با این بیماری در دام‌ها، آن را در جمعیت انسانی کنترل نمود و از این رو لزوم ارتباط و همکاری بین بخش‌های مختلف کشاورزی و دامپزشکی در ارتباط با این بیماری به طور زیادی احساس می‌شود. این بیماری عمدتاً از راه مصرف محصولات لبنی آلوده و یا خراش پوستی و تماس مستقیم با گوشت یا خون حیوانات آلوده به انسان منتقل می‌شود. پیشگیری بیماری در انسان به دو طریق پیشگیری از تماس با دام آلوده یا عدم مصرف فراورده‌های دامی آلوده و در صورت امکان پیشگیری از بروز بیماری دامی از طریق واکسیناسیون دام صورت می‌گیرد (Norouzzinezhad et al., 2020).

از مهم‌ترین عوارض ابتلاء به بروسلوز می‌توان به تلفات ناشی از سقط جنین، معدوم کردن حیوانات آلوده، از دست رفتن تولید شیر، هزینه‌های بالای جایگزینی حیوانات، هزینه‌های دامپزشکی و بیماری‌های انسانی اشاره کرد که باعث کاهش ظرفیت کاری می‌شود. تاریخچه بروسلوز فراتر

از جداسازی و شناسایی بروسلا ملیتینسیس در سال ۱۸۸۷ است و به تماس اولیه مردم با حیوانات می‌رسد. این بیماری با نام‌های مختلفی از جمله تب مالت، تب کریمه، بیماری بنگ، تب سنگ، تب مالتیز، تب جیل الطارق، تب ناپایدار، تب مدیترانه‌ای یا معده روان‌شناختی شناخته شده است (Qiangsheng et al., 2023).

در میان عناصر مختلف ژنی مسئول حدت در بروسلا، ure، bvfA و VirB رایج‌ترین عوامل هستند. فاکتور حدت بروسلا A (bvfA) به عنوان مسئول بقای بروسلا در سلول‌های میزبان تعریف شده است. پروتئین‌های bvfA که در تکثیر درون سلولی نقش دارد و در حدت، تکثیر و بیماری‌زایی بروسلا نقش دارند، پروتئین‌های VirB در یک کمپلکس از طریق پوشش باکتریایی جمع می‌شوند و امکان انتقال پروتئین‌های مؤثر به خارج از سلول باکتری به سیتوپلاسم سلول میزبان را فراهم می‌کنند (Derakhshandeh et al., 2013).

بروسلوز ممکن است تأثیر جدی بر انسان داشته باشد و به طور بالقوه منجر به ناتوانی یا مرگ و میر در برخی از موارد شود. این بیماری ممکن است سال‌ها طول بکشد که پروسه درمانی پرهزینه و طولانی دارد. عوامل خطر اصلی بروسلوز انسانی قرار گرفتن در معرض حیوانات آلوده یا مصرف فرآورده‌های خام آنها به عنوان شیر و پنیر است. نکته مهم این است که این عوامل خطر از منطقه‌ای به منطقه دیگر در داخل کشورها و بین کشورهای مختلف متفاوت است و به تنوع در شیوع بروسلوز در مناطق مختلف جغرافیایی کمک می‌کند (Abdel-Hamid et al., 2021). با توجه به معضلات ذکر شده در خصوص خطر ابتلا به تب مالت در دام و انسان، هدف از پژوهش حاضر، بررسی شیوع و حساسیت آنتی‌بیوتیکی بروسلا ملیتینسیس در لبنیات عرضه‌شده در شهرستان گرمسار می‌باشد.

### مواد و روش کار

ابتدا ۱۸۰ نمونه از لبنیات شامل ۳۰ نمونه شیر خام گاو، ۳۰ نمونه شیر خام گوسفند، ۳۰ نمونه شیر خام بز، ۳۰ نمونه شیر خام گاومیش، ۳۰ نمونه پنیر سنتی و ۳۰ نمونه ماست سنتی از مراکز عرضه در شهرستان گرمسار به صورت تصادفی نمونه‌گیری و در سریع‌ترین زمان ممکن به در شرایط سترون و سرما به آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی انتقال داده شد.

### روش ردیابی بروسلا با استفاده از (MRT Milk ) (Ring Test)

نخست روی هر کدام از نمونه‌های شیر خام نمونه‌گیری شده به منظور تشخیص بروسلوز به صورت جداگانه ۲ مورد آزمون حلقه‌ای شیر انجام شد. در همین راستا درون ۲ لوله باریک همولیز به طور جداگانه ۲ میلی‌لیتر از نمونه شیر نمونه‌گیری شده ریخته شد و به لوله دیگر ۳۰ میکرولیتر آنتی‌ژن بروسلا ملیتینسیس و به لوله دیگر ۳۰ میکرولیتر آنتی‌ژن بروسلا آبورتوس اضافه گردید. محتویات لوله پس از افزودن آنتی‌ژن به مدت یک دقیقه به آرامی مخلوط و لوله‌ها به مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند (Saavedra et al., 2019).

### جداسازی و شناسایی بروسلا

با توجه به ماهیت زئونوتیکی بروسلا، آزمایش‌ها با رعایت دستورالعمل‌های ایمنی انجام شد. ابتدا در نمونه‌های جامد مانند ماست و پنیر ۱۰ گرم از هر نمونه با استفاده از قاشق و چاقوی استریل و از نمونه‌های مایع ۱۰ میلی‌لیتر با استفاده از سرنگ استریل جداسازی شد. نمونه‌ها در ۹۰ میلی‌لیتر آبگوشه بروسلا (Qulab, Canada) استومایکر و همگن شدند. سپس نمونه‌های همگن‌شده در بطری‌های سترون ریخته‌شده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه‌های هوازی و بی‌هوازی با غلظت ده درصد دی‌اکسید کربن غنی‌سازی شدند. پس از گذر از گرمخانه‌گذاری، بطری‌های همگن‌شده و بر روی آگار بروسلا (Qulab, Canada)، که با ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند و مکمل انتخابی بروسلا FD005 بود به صورت خطی کشت داده شدند. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شده و پلیت‌های دارای پرگنه‌های سفید تا خاکستری و غیر موکوئیدی به-عنوان پلیت‌های مثبت احتمالی برای آزمایش‌های بیوشیمیایی در نظر گرفته شدند. برای شناسایی دقیق بروسلا ملیتینسیس، آزمایش‌های رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز، تولید اندول، تولید سولفیدهیدروژن، اوره‌آز و رشد در حضور ۱۰ درصد دی‌اکسید کربن تست شد (ISIRI, 2020).

### استخراج مستقیم DNA

برای انجام PCR بر روی هر نمونه با روش ذیل DNA از نمونه‌ها استخراج گردید؛ ابتدا ۵۰۰ µl از نمونه‌های شیر و ۳ گرم از نمونه‌های پنیر و ماست در میکروتیوب ۱/۵ سی سی ریخته شد. سپس بافر Net (NaCl, EDTA, Tris)

از ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس ۲X (Denmark) ، AMPLIQON) پرایمر رفت و برگشت هر کدام ۱ میکرولیتر با غلظت ۱۰ پیکومول، ۳ میکرولیتر DNA الگو و ۵ میکرولیتر آب تزریق تکمیل شد. PCR در دستگاه Thermocycler Bio-Rad (PTC 1148) با برنامه دمایی زیر اجرا شد: مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه و سپس ۳۴ سیکل سه مرحله‌ای شامل: مرحله اول: دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، مرحله دوم: اتصال پرایمر به مدت ۶۰ ثانیه (دمای اتصال برای هر ژن متفاوت است؛ به جدول ۱ مراجعه شود) و مرحله سوم: گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه؛ سپس گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی ۰/۵ pg رنگ اتیدیوم بروماید بارگذاری شدند. الکتروفورز ژل ابتدا به مدت ۵ دقیقه تحت ولتاژ ۱۲۰ قرار گرفت و سپس با ولتاژ ثابت ۸۵ به مدت ۴۵ دقیقه اجرا شد. از ژل با استفاده از سیستم مجهز به اشعه UV (BioRad Gel (XR) عکسبرداری شد و تصویر دریافتی آنالیز شد. با مقایسه موقعیت قطعه تکثیر شده با اندازه باندهای مربوط به مارکر، اندازه محصولات PCR تخمین زده شد (Shafei et al., 2013).

و NaOH ۲/۶ نرمال و سدیم دو دسیل سولفات ۲۴ درصد به ترتیب به مقدار ۱۰۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر اضافه و محتویات توسط ورتکس مخلوط شد. مخلوط حاصل ۱۰ دقیقه در حرارت ۸۰ درجه سانتی‌گراد و سپس ۵ دقیقه در فریزر قرار گرفت. بعد از آن آنزیم پروتئیناز K ۲ درصد به میزان ۱۵ میکرولیتر اضافه و ۲-۳ ساعت در حرارت ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۴۰۰ میکرولیتر فنل/کلروفرم به حجم مساوی افزوده و ورتکس گردید. به مدت ۲۰ دقیقه در سرعت ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. مایع رویی جدا شد و هم حجم آن کلروفرم و ایزوآمیل الکل با هم مخلوط و مجدداً در سرعت ۱۲۰۰۰ دور به مدت ۶ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی و هم حجم آن ایزوپروپانول و معادل ۰/۱ حجم آن استات سدیم ۲/۵ مولار اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ انجام گرفت. نهایتاً رسوب حاصل با ۳۰ میکرولیتر بافر TE حل شده و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Ghosian et al., 2020).

### روش PCR معمولی برای تشخیص ژن‌های حدت

ژن‌های حدت بروسلا ملی‌تنسیس *Ure*، *BvfA* و *VirB* با استفاده از پرایمرهای الیگونوکلوئوتیدی اختصاصی تکثیر شد. PCR در یک مخلوط واکنش ۲۰ میکرولیتری متشکل

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی ژن‌های هدف بروسلا ملی‌تنسیس در واکنش PCR

| Species                                | Primer sequences (5'-3')                                 | Product (bp) | TM (°C) | References          |
|--|--|--------------|---------|---------------------|
| <i>Br.melitensis</i><br><i>16srRNA</i> | F:AAATCGCGTCTTGGT GGTCTGA<br>R:TGCCGATCACTTAAG GGCCTTCAT | 731          | 58      | (Aman et al., 2020) |
| <i>bvfA</i>                            | F: ACCCTTCGTCGATGTGCTGA<br>R: CCGCGCTGATTTTCATCGCTG      | 1282         | 60      |                     |
| <i>VirB</i>                            | F: CGCTGATCTATAATTAAGGCTA<br>R: TGCGACTGCCTCCTATCGTC     | 881          | 59      |                     |
| <i>Ure</i>                             | F:GCTTGCCCTTGAATTCCTTTGTGG<br>R:ATCTGCGAATTTGCCGACTCTAT  | 2100         | 62      |                     |

صورت خطی و یکنواخت کشت داده شد. آنتی‌بیوتیک‌ها شامل سیپروفلوکساسین (CP)، جنتامیسین (GM)، آمپی‌سیلین (AM)، ریفامپین (RMN)، تتراسایکلین (TE) و ایمپنم (IM) بود (Heidarzadi et al., 2021).

### آنالیز آماری

داده‌های حاصل از آزمایش‌های انجام شده در نرم افزار Microsoft Office Excel گردآوری شده و توسط

### تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی

حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های بروسلا با روش انتشار دیسک کربی بائر انجام گرفت (CLSI, 2018). ابتدا جدایه‌ها در آگار خوندار کشت داده شدند. سپس یک سوسپانسیون باکتریایی از پرگنه‌ها در سالین سترون تهیه و سپس سوسپانسیون باکتریایی با استفاده از یک سوآب سترون بر روی پلیت‌های آگار مولر هیتتون انجام شده و به

نرم افزار SPSS آنالیز شدند. روش آماری تجزیه و تحلیل داده ها، آزمون مربع کای و تست دقیق فیشر بود.

### نتایج

بنا به نتایج به دست آمده با استفاده از روش (MRT Milk Ring Test) میزان آلودگی به بروسلا ملی تنسیس در لبنیات عرضه شده در شهرستان گرمسار از مجموع ۱۸۰ نمونه، ۲۰ نمونه (۱۱/۱۱ درصد) بود. به این ترتیب آلودگی به بروسلا ملی تنسیس در شیر خام گاو ۷ نمونه (۲۳/۳۳ درصد)، گوسفند ۸ نمونه (۲۶/۶۶ درصد)، بز ۲ نمونه (۶/۶۶ درصد)

درصد) و گاومیش ۳ نمونه (۱۰ درصد) بود. همچنین با توجه به نتایج به دست آمده از کشت خطی آلودگی به بروسلا ملی تنسیس در شیر خام گاو ۷ نمونه (۲۳/۳۳ درصد)، گوسفند ۷ نمونه (۲۳/۳۳ درصد)، بز ۴ نمونه (۱۳/۳۳ درصد)، گاومیش ۵ نمونه (۱۶/۶۷ درصد)، پنیر سنتی ۱۲ نمونه (۴۰ درصد) و ماست سنتی ۵ نمونه (۱۶/۶۷ درصد) بودند. آزمون آماری نشان داد بین آلودگی به بروسلا ملی تنسیس در لبنیات نمونه گیری شده به روش MRT و کشت ارتباط آماری معنی داری وجود نداشت ( $p < 0/05$ ).

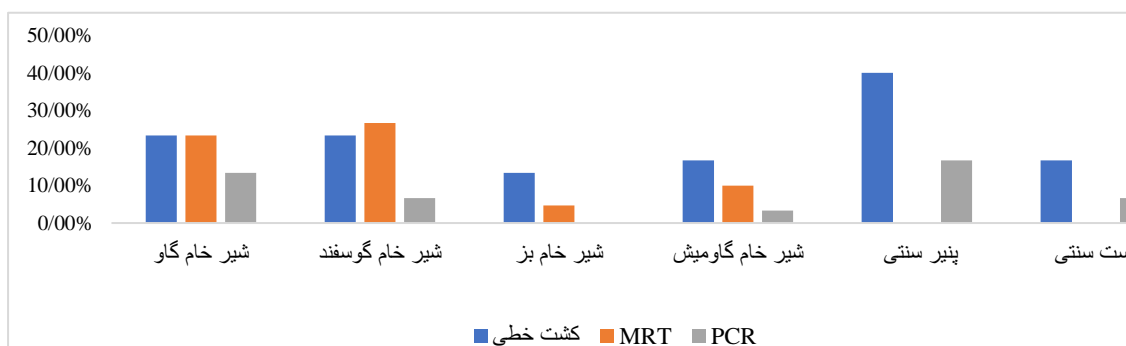
جدول ۲- نتایج شیوع آلودگی به بروسلا ملی تنسیس در لبنیات سنتی نمونه گیری شده شهرستان گرمسار به روش MRT و کشت خطی

| ماده غذایی     | تعداد نمونه | MRT                               | کشت خطی                           | تست PCR                           |
|----------------|-------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| شیر خام گاو    | ۳۰          | ۷ <sup>b</sup> نمونه (۲۳/۳۳ درصد) | ۷ <sup>b</sup> نمونه (۲۳/۳۳ درصد) | ۴ <sup>c</sup> نمونه (۱۳/۳۳ درصد) |
| شیر خام گوسفند | ۳۰          | ۸ <sup>b</sup> نمونه (۲۶/۶۶ درصد) | ۷ <sup>b</sup> نمونه (۲۳/۳۳ درصد) | ۳ <sup>cd</sup> نمونه (۶/۶۶ درصد) |
| شیر خام بز     | ۳۰          | ۲ <sup>cd</sup> نمونه (۶/۶۶ درصد) | ۴ <sup>c</sup> نمونه (۱۳/۳۳ درصد) | -                                 |
| شیر خام گاومیش | ۳۰          | ۳ <sup>cd</sup> نمونه (۱۰ درصد)   | ۵ <sup>c</sup> نمونه (۱۶/۶۷ درصد) | ۱ <sup>dc</sup> (۳/۳۳ درصد)       |
| پنیر سنتی      | ۳۰          | -                                 | ۱۲ <sup>a</sup> نمونه (۴۰ درصد)   | ۵ <sup>c</sup> نمونه (۱۶/۶۷ درصد) |
| ماست سنتی      | ۳۰          | -                                 | ۵ <sup>c</sup> نمونه (۱۶/۶۷ درصد) | ۳ <sup>cd</sup> نمونه (۶/۶۶ درصد) |
| مجموع          | ۱۸۰ نمونه   | ۲۰ نمونه (۱۱/۱۱ درصد)             | ۴۰ نمونه (۲۲/۲۲)                  | ۱۳ (۷/۷۸ درصد)                    |

در هر سطر، اعداد برچسب خورده با حروف انگلیسی متفاوت، با  $P \text{value} < 0/01$  با هم تفاوت معنی دار آماری دارند.

گاو ۴ نمونه (۱۳/۳۳ درصد)، گوسفند ۲ نمونه (۶/۶۶ درصد)، بز منفی، گاومیش ۱ نمونه (۳/۳۳ درصد)، پنیر سنتی ۵ نمونه (۱۶/۶۷ درصد) و ماست سنتی ۲ نمونه (۶/۶۶ درصد) به بروسلا ملی تنسیس آلوده بودند.

نتایج به دست آمده از میزان شیوع آلودگی به بروسلا ملی تنسیس به روش PCR نشان داد از مجموع ۱۸۰ نمونه لبنیات سنتی نمونه گیری شده در شهرستان گرمسار، ۱۴ نمونه (۷/۷۸ درصد) بود. به این ترتیب آلودگی به شیر خام



شکل ۱- مقایسه وضعیت آلودگی به بروسلا ملی تنسیس در لبنیات عرضه شده در شهرستان گرمسار به روش های خطی، MRT و PCR

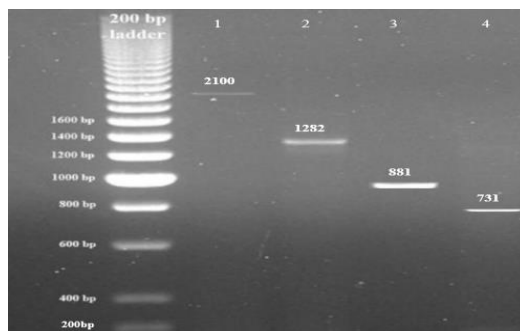
ترتیب شامل bvfa ۹ نمونه (۶۴/۲۵ درصد)، virfB ۵ نمونه (۳۵/۷۴ درصد)، ure ۳ نمونه (۲۱/۴۲) بود.

مطابق تست PCR انجام گرفته روی نمونه های مثبت، برای تعیین فراوانی ژن های bvfa، virfB و ure به صورت زیر بود: فراوانی بیشترین و کمترین ژن حامل به

جدول ۳- وضعیت فراوانی ژن‌های حامل بروسلا ملی‌تنسیس در لبنیات عرضه‌شده در شهرستان گرمسار (درصد)

| نوع نمونه       | تعداد جدایه‌های آلوده | bvfA                        | virB                        | ure                         |
|-----------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| شیر خام گاو     | ۴                     | ۳ <sup>a</sup> (۲۱/۴۲ درصد) | ۳ <sup>a</sup> (۲۱/۴۲ درصد) | ۱ <sup>c</sup> (۷/۱۴ درصد)  |
| شیر خام گوسفند  | ۲                     | ۲ <sup>b</sup> (۱۴/۲۸ درصد) | ۱ <sup>c</sup> (۷/۱۴ درصد)  | -                           |
| شیر خام بز      | -                     | -                           | -                           | -                           |
| شیر خام گاو میش | ۱                     | ۱ <sup>c</sup> (۷/۱۴ درصد)  | -                           | -                           |
| پنیر سنتی       | ۵                     | ۲ <sup>b</sup> (۱۴/۲۸ درصد) | ۱ <sup>c</sup> (۷/۱۴ درصد)  | ۲ <sup>b</sup> (۱۴/۲۸ درصد) |
| ماست سنتی       | ۲                     | ۱ <sup>c</sup> (۷/۱۴ درصد)  | -                           | -                           |
| مجموع           | ۱۴                    | ۹ (۶۴/۲۵)                   | ۵ (۳۵/۷۴)                   | ۳ (۲۱/۴۲)                   |

در هر سطر، اعداد برجسب خورده با حروف انگلیسی متفاوت، با  $Pvalue < 0.01$  با هم تفاوت معنی‌دار آماری دارند.



شکل ۲- تصویر ژل حاصل از PCR ژن‌ها. چاهک اول چپ: مارکر ۲۰۰ جفت بازی، چاهک ۱: ژن *ure* با اندازه ۲۱۰۰ جفت باز، چاهک ۲: ژن *bvfA* با اندازه ۱۲۸۲ جفت باز، چاهک ۳: ژن *virB* با اندازه ۸۸۱ جفت باز و چاهک ۴: ژن *I6srRNA* با اندازه ۷۳۱ جفت باز.

ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد، بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب مربوط به تتراسایکلین (۹۲/۵ درصد) و ایمی‌پنم (۹۷/۵ درصد) بود. و آمپی‌سیلین (۸۲/۵ درصد) بود و بیشترین حساسیت مربوط به ریفامپین (۹۵ درصد) و ایمی‌پنم (۹۷/۵ درصد) بود.

| وضعیت تعداد جدایه‌های بروسلا ملی‌تنسیس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف (درصد) |            |           |                     |
|---|------------|-----------|---------------------|
| مقاوم   | نیم‌حساس   | حساس      | آنتی‌بیوتیک         |
| ۳۳ (۸۲/۵)   | ۳ (۷/۵)    | ۴ (۱۰)    | آمپی‌سیلین (AMP)    |
| ۵ (۱۲/۵)  | ۲۵ (۶۲/۵۰) | ۱۰ (۲۵)   | سیپروفلوکساسین (CP) |
| ۰ (۰)   | ۲ (۵)      | ۳۸ (۹۵)   | ریفامپین (RMP)      |
| ۳۷ (۹۲/۵۰)  | ۱ (۲/۵۰)   | ۲ (۵)     | تتراسایکلین (TE)    |
| ۰ (۰)   | ۱ (۲/۵۰)   | ۳۹ (۹۷/۵) | ایمی‌پنم (IMP)      |
| ۲۷ (۶۷/۵)   | ۵ (۱۲/۵)   | ۸ (۲۰)    | جنتامایسین (GM)     |

جدول ۵- الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های بروسلا ملی‌تنسیس جداشده از لبنیات عرضه‌شده در شهرستان گرمسار

در سلول‌های میزبان تعریف شده است (Rahimi et al., 2023).

پروتئین‌های *bvfA* که در تکثیر درون سلولی نقش دارد و در حدت، تکثیر و بیماری‌زایی بروسلا نقش دارند،

### بحث

در میان عناصر مختلف ژنی مسئول حدت در بروسلا، *ure*، *bvfA* و *VirB* رایج‌ترین عوامل هستند. فاکتور حدت بروسلا A (*bvfA*) به عنوان مسئول بقای بروسلا

پروتئین‌های VirB در یک کمپلکس از طریق پوشش باکتریایی جمع می‌شوند و امکان انتقال پروتئین‌های مؤثر به خارج از سلول باکتری به سیتوپلاسم سلول میزبان را فراهم می‌کنند (Derakhshandeh et al., 2013). پژوهش حاضر روی آلودگی به بروسلا ملی‌تنسیس در لبنیات سنتی عرضه‌شده در شهرستان گرمسار تمرکز داشت که نتیجه آن، جداسازی ۲۰ نمونه (۱۱/۱۱ درصد) به روش MRT؛ ۴۰ نمونه (۲۲/۲۲ درصد) به روش کشت خطی و در نهایت ۱۳ نمونه (۷/۷۸ درصد) به روش PCR بود. ارزیابی‌ها نشان داد در روش‌های تشخیص PCR و کشت خطی، بیشترین میزان آلودگی در پنیر سنتی بود. هم‌راستا با پژوهش حاضر، مطالعه‌ای (۲۰۱۸) روی شیوع بروسلا در محصولات لبنی در ترکیه انجام گرفت، ۳۵ نمونه از ۲۰۲ نمونه شیر خام گاو (۱۷/۳۲ درصد) به بروسلا ملی‌تنسیس شناسایی شدند (Babaoglu et al., 2018)، که با مطالعه حاضر که با کشت خطی ۲۲/۲۲ درصد آلودگی ردیابی شد، مطابقت دارد. در تاجیکستان (۲۰۱۷) پژوهشی روی آلودگی به بروسلا ملی‌تنسیس در شیر خام گاو به روش PCR انجام شد که آلودگی ۱۰/۳ درصدی گزارش شد (Lindahl-Rajala et al., 2017)، که دارای هم‌خوانی نزدیکی با پژوهش حاضر در خصوص میزان آلودگی شیر گاو به روش PCR (۷/۷۸ درصد) است. پژوهشی با هدف بررسی شیوع گونه‌های بروسلا با استفاده از روش PCR در مناطق شهری زنجان، ایران انجام شد، که نتایج نشان داد از ۷۳ نمونه شیر خام گاو جمع‌آوری شده، ۲۸ مورد (۵۲ درصد) از نظر جنس بروسلا مثبت، ۳ مورد (۷/۸ درصد) متعلق به بروسلا آپورتوس و ۲ مورد (۵/۲ درصد) متعلق به بروسلا ملی‌تنسیس بودند (Satei et al., 2020)، در مطالعه حاضر، شیوع بروسلا ملی‌تنسیس با روش PCR با فراوانی ۷/۷۸ درصد تعیین شد که مهم‌ترین دلیل اختلاف را می‌توان وضعیت بهداشتی و اختلاف جغرافیایی در نظر گرفت. مطالعه‌ای در مصر روی آلودگی به انواع بروسلا در شیر خام گاو انجام شد که میزان آلودگی به بروسلا ملی‌تنسیس ۱۰/۵ درصد بود که دارای ژن‌های Ure ۱۰۰ درصد، bvfA ۸۰ درصد و virB ۱۰۰ درصد بود (Abdelaty, 2018)، که با نتایج این مطالعه در خصوص فراوانی آلودگی به بروسلا مطابقت دارد؛ اما در خصوص فراوانی ژن‌ها هم سویی وجود ندارد. رستمی و همکاران (۲۰۲۳) با مطالعه‌ای روی شیوع گونه‌های بروسلا در استان‌های همدان و

لرستان گزارش دادند، از بین نمونه‌های بروسلا مثبت، ۲۶/۵ درصد و ۷۳/۴ درصد نمونه‌ها به بروسلا آپورتوس و بروسلا ملی‌تنسیس آلوده بودند (Rostami et al., 2023). مطالعه‌ای روی شیوع بروسلا، از مجموع ۵۷۲ نمونه میزان آلودگی به بروسلا در شیر گوسفند و بز به ترتیب ۱۵/۲۲ و ۱۷/۲۹ درصد بود (Marouf et al., 2021). در پژوهش حاضر آلودگی شیر گوسفند ۲۳/۳۳ درصد، شیر بز ۱۳/۳۳ درصد به بروسلا ملی‌تنسیس آلوده بودند که در خصوص آلودگی به شیر گوسفند و بز نتایج مشابهی وجود دارد. مطالعه‌ای با هدف بررسی وقوع بروسلا در نمونه‌های شیر خام گوسفند و بز در استان اربیل عراق به روش MRT انجام داد. نتایج نشان داد آلودگی به بروسلا در شیر خام گوسفند و بز مجموعاً ۱۱/۶ درصد بوده است (Almashhadany, 2021)، که با نتایج به دست‌آمده از تست MRT مطالعه حاضر (۱۱/۱۱ درصد) مطابق است. پژوهشی با هدف کشف ژن‌های رایج مرتبط با بیماری‌زایی در بروسلا ملی‌تنسیس در شیر گوسفند و بز انجام شد. آن‌ها گزارش دادند از مجموع ۲۰۰ نمونه شیر خام بز و گوسفند نمونه‌گیری که ۲۱/۵ درصد به بروسلا ملی‌تنسیس آلودگی وجود داشته که درصد ژن‌های Ure، bvfA و virB به ترتیب ۸۸، ۷۹ و ۷۴ درصد بود (Aman et al., 2020)، مجموع آلودگی شیر بز و گوسفند به روش PCR در مطالعه حاضر ۱/۱۱ درصد و فراوانی ژن‌های به ترتیب ۱۴/۲۸، ۷/۴۱ و منفی بود که مطابقتی بین مطالعات وجود ندارد؛ عدم رعایت بهداشت در گله‌های شیری گوسفند و بز مهم‌ترین عامل عدم مطابقت می‌باشد. پژوهشی در مصر روی آلودگی به انواع بروسلا، آلودگی ۱۳/۶۰ درصدی در شیر گوسفند و ۱۳/۵۰ درصدی در شیر بز به بروسلا ملی‌تنسیس را گزارش دادند و ژن‌های حامل Ure ۳۷ درصد، virB ۷۷ درصد و bvfA ۲۲/۳۵ درصد بودند (Darwish, 2023) که مطابقتی با پژوهش حاضر ندارد. در پژوهش حاضر میزان آلودگی به بروسلا ملی‌تنسیس بین کشت خطی و PCR اختلاف قابل توجهی وجود داشت که این موضوع یک امر بدیهی نیست؛ اگر چه در روش کشت میکروبی باکتری‌ها، فقط باکتری زنده قابل شناسایی هستند؛ اما در پژوهش حاضر دلیل فراوانی کشت خطی نسبت به روش PCR شناسایی پرگنه باکتری بروسلا ملی‌تنسیس توسط روش‌های تائیدی بیوشیمیایی بود. در روش PCR، DNA باکتری‌های زنده و مرده توانا شناسایی می‌گردد که از



پژوهش حاضر (۱۶/۶۷ درصد) مطابقتی ندارند. پژوهشگرانی در شیراز آلودگی ماست سنتی به بروسلا ملی تنسیس را ۶/۲۵ درصد گزارش دادند (Abdali et al., 2020)، که مطابق با نتایج مطالعه حاضر (۶/۶۶ درصد) است.

### نتیجه گیری

تب مالت انسانی ناشی از مصرف شیر خام و فرآورده‌های آن همچنان به عنوان یک مسئله جدی بهداشت عمومی مطرح است. آگاهی عمومی از بیماری‌های مشترک بین انسان و دام، مانند بروسلا، برای جلوگیری از گسترش آن‌ها و کنترل شیوع آن ضروری است. ارتقای آگاهی و آموزش عمومی می‌تواند به کاهش بروز بیماری‌ها و ارتقای تشخیص و درمان به موقع کمک کند. برنامه‌های پیشگیری، کنترل و ریشه‌کنی در درجه اول شامل پاستوریزه کردن شیر و فرآورده‌های شیری، کاهش جمعیت، واکسیناسیون و آزمایش و کاهش مخازن عامل عفونت است. واکسیناسیون گاو و دام‌های شیرده به ویژه در جلوگیری از انتشار گونه‌های مختلف بروسلا موثر است. همه ذینفعان، از جمله تولیدکنندگان دام، دامپزشکان، کارگران مزرعه، جامعه محلی در مناطق بومی، و مقامات نظارتی، باید این اقدامات را به طور جامع درک کنند.

### تشکر و قدر دانی

بدین وسیله از کلیه همکاران گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد که نهایت همکاری را در انجام این پروژه را داشتند تشکر به عمل می‌آید.

### تعارض منافع

نویسندگان تعارض منافی برای اعلام ندارند.

### مشارکت‌های نویسندگان

نمونه‌گیری، انجام آزمایش‌ها و گردآوری دیتاها با نویسنده‌ی اول، آنالیز آماری و نگارش مقاله با همکاری استاد راهنما انجام شد.

### منابع مالی

پژوهش حاضر با استفاده از هزینه‌ی شخصی دانشجو انجام شد.

مهم‌ترین دلیل این اختلاف می‌توان به ذکر این حقیقت اشاره کرد که میزان اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده پائین بوده است که این اختلاف به دلیل وجود این امر بود. پژوهشگران (۲۰۲۳) در مصر گزارش دادند که در پنی‌های سنتی عرضه‌شده در آلودگی ۳۹/۱ درصد پنی‌های سنتی به بروسلا ملی تنسیس آلوده بوده است (Islam et al., 2023) که با نتایج به دست‌آمده از پژوهش حاضر (۴۰ درصد) مطابقت دارد. در پژوهشی آلودگی به بروسلا ملی تنسیس به روش PCR در برزیل روی پنی‌های سنتی را ۱۳/۹ درصدی گزارش دادند (Silva et al., 2022)، که با نتایج این مطالعه (۱۶/۶۷ درصد) هم‌خوانی دارد. پژوهشی در برلین آلمان روی آلودگی به بروسلا ملی تنسیس در پنی‌های سنتی عرضه‌شده به روش PCR انجام شد که گزارش دادند ۲۰/۵ درصد نمونه‌ها آلوده بودند (Jansen et al., 2019) که هم‌راستا با پژوهش حاضر است. مطالعه‌ای در ارومیه با هدف بررسی آلودگی پنی‌های محلی توزیع شده در شهرستان ارومیه به بروسلا ملی تنسیس به روش PCR و بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها انجام شد که گزارش دادند از مجموع ۵۰ نمونه پنی‌های محلی در نهایت آلودگی ۲ درصدی پنی‌های سنتی را به بروسلا ملی تنسیس آلودگی وجود داشت و بیشترین مقاومت مربوط به آمپی‌سیلین و تتراسایکلین و بیشترین حساسیت مربوط به ایمی‌پنم و ری‌فامپین بود (Gholamali et al., 2024)؛ که با میزان آلودگی پنی‌های سنتی در مطالعه حاضر (۱۶/۶۷ درصد) مطابقتی ندارد؛ اما در خصوص مقاومت و حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها، هم‌سو با پژوهش حاضر می‌باشد. پژوهش دیگری در برزیل با هدف شناسایی گونه‌های بروسلا در پنی‌های سنتی، گزارش دادند که آلودگی ۲۰ درصدی به بروسلا ملی تنسیس وجود داشته است (Bezerra et al., 2019)، که فراتر از نتایج مطالعه حاضر است. در خصوص آلودگی پنی‌های عوامل تاثیرگذاری در اختلاف بین مطالعات دخیل هستند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به شیر مورد استفاده در تهیه پنی، فرآیندهای انجام شده روی رسیدن پنی، میزان pH و غلظت نمک اشاره کرد.

پژوهشی در مصر روی آلودگی شیر بوفالو به بروسلا ملی تنسیس به روش Nested PCR انجام شد که گزارش دادند ۳۰ درصد نمونه‌ها آلوده بودند (El-Razik et al., 2008). در مطالعه‌ای دیگر در مصر آلودگی ۱۰/۴ درصدی گزارش شد (Wareth et al., 2014)، که با نتایج

## References

- Abdali, F., Hosseinzadeh, S., Berizi, E., Pourmontaseri, M. (2020). Prevalence of Brucella species in unpasteurized dairy products consumed in Shiraz province using PCR assay. *Molecular Biology Research Communications*, 9(3), 117.
- Abdel-Hamid, N. H., Ghobashy, H. M., Beleta, E. I., Elbauomy, E. M., Ismail, R. I., Nagati, S. F., Elmonir, W. (2021). Risk factors and Molecular genotyping of Brucella melitensis strains recovered from humans and their owned cattle in Upper Egypt. *One Health*, 13, 100281.
- Abdelaty, A. M. E. (2018). Isolation and identification of brucella microorganisms from raw milk using cultural and molecular techniques. Kafrelsheikh University.
- Almashhadany, D. A. (2021). Diagnosis of brucellosis in sheep and goats raw milk by fast and reliable techniques.
- Aman, I., AL-Hawary, I., Helmy, N., EL-Gushi, A. (2020). Detection of Brucella organisms from Egyptian raw milk using cultural and molecular techniques. *Kafrelsheikh Veterinary Medical Journal*, 18(2), 14-19.
- Babaoglu, U., Ogotucu, H., Demir, G., Sanli, D., Babaoglu, A., Oymak, S. (2018). Prevalence of Brucella in raw milk: An example from Turkey. *Nigerian journal of clinical practice*, 21(7), 907-911.
- Bezerra, S. S., Kim, P., Santos, F. D. S., Castro, K. D. C., Lira, N. S. C., Mendes, E. S. (2019). Detection of Brucella spp. in artisan cheese commercialized in Parnaíba, Piauí state, Brazil.
- Bibi, C., Husain, S., Nigar, Z. (2024). Nutritional and Therapeutic Values of Cow Milk: A Comprehensive Review. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 14(5), 180-184.
- CLSI. (2018). (Clinical and Laboratory Standards Institute) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 28 ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA. 20-31.
- Dadar, M., Bahreinipour, A., Alamian, S., Yousefi, A. R., Amiri, K., Abnaroodheleh, F. (2024). Serological, cultural, and molecular analysis of Brucella from Buffalo milk in various regions of Iran. *Veterinary Research Communications*, 48(1), 427-436.
- Dadar, M., Fakhri, Y., Shahali, Y., Khaneghah, A. M. (2020). Contamination of milk and dairy products by Brucella species: A global systematic review and meta-analysis. *Food Research International*, 128, 108775.
- Dadar, M., Shahali, Y., Whatmore, A. M. (2019). Human brucellosis caused by raw dairy products: A review on the occurrence, major risk factors and prevention. *International journal of food microbiology*, 292, 39-47.
- Darwish, A. (2023). Virulence genes and immunological biomarkers for brucellosis in sheep & goat. *Journal of Animal Health Production*, 11(2), 165-175.
- Derakhshandeh, A., Firouzi, R., Goudarztalejerd, A. (2013). Detection of virulence genes (bvfA, virB and ure) in Brucella melitensis isolated from aborted fetuses of sheep and goats. *Iranian Journal of Microbiology*, 5(4), 402.
- El-Razik, K., Ismail, E., Youssef, H., Hashad, M. (2008). Diagnosis of brucellosis in dairy animals using nested polymerase chain reaction.
- Eltholth, M. M., El-Wahab, A., Ekram, W., Salem, M. A., Abdel-Hamid, N. H., El-Diasty, M., Ahmed, E. E. (2024). Prevalence of Brucellosis in Ruminants and The Risk of Human Exposure in Rural Delta of Egypt. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences*, 55(5), 1257-1269.
- Gholamali, S., Neyriz Naghadehi, M., Asgharzadeh, M. R. (2024). The contamination of local crumbled Kope cheeses distributed in Urmia-Iran with Brucella species and evaluation of the antibiotic-resistant pattern of isolates. *Journal of food science and technology (Iran)*, 20(144), 169-182. (In persian).
- Ghosian M.H, kivaniamineh H, Zahrayisalehi T, Khazraeinia P, Fallah N. (2020). A comperation of culture and PCR method wrights test for diagnosis of brucellosis. *Daneshvar medicine*, 15(1), 51\_58.
- Heidarzadi M, Rahnama M, Alipoureskandani M, Saadati D, Afsharimoghadam A. (2021) Salmonella and Escherichia coli contamination in samosas presented in Sistan and Baluchestan province and antibiotic resistance of isolates. *Food Hygiene*, 11(2): 71-82 (In persian).
- ISIRI. (2020). Microbiology of Food Chain Complete Method for Isolation and Identification of Brucella spp. 1st. -, (-), 1-22.(In persian)

- Islam, M. S., Islam, M. A., Rahman, M. M., Islam, K., Islam, M. M., Kamal, M. M., Islam, M. N. (2023). Presence of *Brucella* spp. in milk and dairy products: a comprehensive review and its perspectives. *Journal of Food Quality*, 2023(1), 2932883.
- Jansen, W., Linard, C., Noll, M., Nöckler, K., Al Dahouk, S. (2019). *Brucella*-positive raw milk cheese sold on the inner European market: A public health threat due to illegal import? *Food Control*, 100, 130-137.
- JM, K. (2023). Risk Factors Associated with Prevalence of Brucellosis and Bacteria in Fermented Cow Milk Obtained from Kajiado Central Sub-County in Kenya. *Asian Journal of Research in Animal and Veterinary Sciences*, 6(4), 441-448.
- Lindahl-Rajala, E., Hoffman, T., Fretin, D., Godfroid, J., Sattorov, N., Boqvist, S., Magnusson, U. (2017). Detection and characterization of *Brucella* spp. in bovine milk in small-scale urban and peri-urban farming in Tajikistan. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(3), e0005367.
- Marouf, A. S., Hanifian, S., Shayegh, J. (2021). Prevalence of *Brucella* spp. in raw milk and artisanal cheese tested via real-time qPCR and culture assay. *International journal of food microbiology*, 347, 109192.
- Mpatsumugabo, J. P., Mukasafari, M. A., Ndahetuye, J. B., Wredle, E., Båge, R. (2023). A systematic literature review of milk consumption and associated bacterial zoonoses in East Africa. *Journal of Applied Microbiology*, 134(4), lxad080.
- Norouzinezhad, F., Erfani, H., Norouznejad, A., Kaveh, F., Ghaffari, F. (2020). Epidemiology of human brucellosis (Malta fever) in Lorestan province during 2009-2017. *Quarterly Journal of Caspian Health and Aging*, 5(2), 66-79.
- Rahimi, H., Tukmechi, A., & Rashidian, E. (2023). Genetic diversity of *Brucella melitensis* isolates from sheep and goat milk in Iran. In *Veterinary Research Forum* (Vol. 14, No. 12, p. 649). Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
- Rostami, S., Rashidian, E., Jaydari, A., & Rahimi, H. (2023). Investigation of the Proportion of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in Sheep and Goat Milk. *Veterinary Medicine International*, 2023(1), 6751152.
- Qiangsheng, F., Xiaoqin, H., Tong, L., Wenyun, G., Yuejuan, S. (2023). *Brucella* cultures characteristics, clinical characteristics, and infection biomarkers of human Brucellosis. *Journal of Infection and Public Health*, 16(3), 303-309.
- Saavedra, M. J., Fernandes, C., Queiroga, C. (2019). Laboratory diagnosis of brucellosis. *Brucellosis in Goats and Sheep: an endemic and re-emerging old zoonosis in the 21st century*, 151-180.
- Satei, E., Mirshahabi, H., Zeighami, H., Gholoobi, A., Sadeghi, H. (2020). Molecular survey of BCSP31 and IS711 using PCR assays in detection of *Brucella* spp. in raw milk. *Meta Gene*, 24, 100683.
- Shafei, B., Ahmadi, M., Dastmalchi, S. H. (2013). Diagnosis of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in the milk of cattle and sheep in Kordestan province by polymerase chain reaction.
- Silva, M. R., Duch, A. A. S., Lage, R. T. P. d. A., de Faria, L. S., Menezes, L. D. M., Ribeiro, J. B., Sales, É. B. (2022). Recovery of *Brucella* in raw milk Minas artisanal cheese approved for consumption by official inspection agency in Brazil: assessment of prevalence and risk factors through One Health integrated approaches. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 116(11), 1091-1099.
- Wareth, G., Melzer, F., Elschner, M. C., Neubauer, H., Roesler, U. (2014). Detection of *Brucella melitensis* in bovine milk and milk products from apparently healthy animals in Egypt by real-time PCR.