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

Negin Eiji[1], Ebrahim Rahimi[2*]

1- Graduated in Food Hygiene, Department of Food Hygiene, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

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

Corresponding Author : ebrahimrahimi55@yahoo.com

UNCORRECTED ROOF

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

بررسی شیوع و حساسیت آنتی‌بیوتیکی *بروسلا ملی‌تنسیس* در لبنیات عرضه‌شده در شهرستان گرمسار

نگین ایجی[۱]، ابراهیم رحیمی*[۲]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بهداشت مواد غذایی، گروه بهداشت مواد غذایی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

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

نویسنده مسئول: ebrahimrahimi55@yahoo.com

UNCORRECTED ROOF

خلاصه

شیر خام آلوده به انواع بروسلا از مهم‌ترین راه‌های انتقال بروسلوز به انسان است. هدف اصلی از مطالعه حاضر بررسی شیوع و حساسیت آنتی‌بیوتیکی *بروسلا ملی‌تنسیس* در لبنیات عرضه‌شده در شهرستان گرمسار است. در این پژوهش ۱۸۰ نمونه لبنیات شامل شیر خام گاو، گوسفند، بز، گاومیش، پنیر سنتی و ماست سنتی عرضه‌شده در شهرستان گرمسار نمونه‌گیری و در شرایط سرما به آزمایشگاه انتقال داده شد. نمونه‌ها توسط تست MRT، کشت‌خطی و Multiplex PCR ردیابی شده و به روش انتشار دیسک کربی–بائر مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها تعیین شد. نتایج نشان داد روش MRT میزان آلودگی *بروسلا ملی‌تنسیس* ۱۱/۱۱ درصد، کشت خطی ۲۲/۲۲ درصد و PCR ۷/۷۸ درصد تعیین شد. فراوانی ژن‌های حدت bvfA ۹ نمونه (۶۴/۲۵ درصد)، virfB ۵ نمونه (۳۵/۷۴ درصد)، ure ۳ نمونه (۲۱/۴۲) بود. مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد بیشترین مقاومت مربوط به تتراسایکلین (۹۲/۵ درصد) و آمپی‌سیلین (۸۲/۵ درصد) و کمترین مقاومت برای ریفامپین و ایمی‌پنم (۰ درصد) بود. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه‌گرفت مصرف لبنیات خام و سنتی می‌تواند منبع انتقال بروسلوز به انسان باشد و باید استفاده از لبنیات سنتی و غیرپاستوریزه ممنوع گردد و حساسیت‌ها نسبت به وضع قوانین سختگیرانه نسبت به مراکز عرضه بیشتر شود.

واژه‌های کلیدی: تب مالت، *بروسلا ملی‌تنسیس*، ژن حدت، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، لبنیات

مقدمه

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 مصرف‌کنندگانِ این قبیل مواد غذایی به همراه خواهد داشت (Bibi et al., 2024). آلودگی شیر خام و فرآورده‌های 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 فرآورده‌های آن از حیوانات مختلف (گاو، بز، گوسفند، الاغ، گاومیش، گاومیش 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 (Mpatswenumugabo 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 فرآورده‌های 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 مواج 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 مهم ترین خطرات شغلی نادیده گرفته شده در سراسر جهان توسط دفتر بین المللی بیماری های همه گیر (OIE)، سازمان بهداشت جهانی (WHO) و سازمان غذا و کشاورزی سازمان ملل متحد (FAO) طبقه بندی 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 عمدتا 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 فرآورده‌های دامی آلوده و در صورت امکان پیشگیری از بروز بیماری دامی از طریق واکسیناسیون دام صورت می‌گیرد (Norouzinezhad et al., 2020).

UNCORRECTED PROOF

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 ملیتنسیس 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 جبل الطارق، تب ناپایدار، تب مدیترانه‌ای یا معده روان‌شناختی شناخته شده است (Qiangsheng et al., 2023).

در میان عناصر مختلف ژنی مسئول حدت در بروسلا، bvfA، ure و VirB رایج‌ترین عوامل هستند. فاکتور حدت بروسلا A (bvfA) به عنوان مسئول بقای بروسلا در سلول های 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 سال ها طول بکشد که پروسه درمانی پرهزینه و طولانی دارد. عوامل خطر اصلی بروسلوز انسانی قرار گرفتن در معرض حیوانات آلوده یا مصرف فرآورده های خام آنها به عنوان شیر و پنیر است. نکته مهم این است که این عوامل خطر از منطقه ای 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 ملی‌تنسیس* در لبنیات عرضه‌شده در شهرستان گرمسار می‌باشد.

مواد وروش 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 بروســلوز 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 ملی‌تنسیس* و به لوله دیگر۳۰ میکرولیتر آنتی‌ژن *بروسلا آبورتوس* اضافه گردید. محتویات لوله پس از افزودن آنتی‌ژن به مدت یک دقیقه به آرامی مخلوط و لوله‌ها به مدت ۱ ســاعت در انکوباتور۳۷ درجه سلسیسوس 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 آبگوشت 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

UNCORRECTED PROOF

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 به‌عنوان پلیت‌های مثبت احتمالی برای آزمایش‌های بیوشیمیایی در نظر گرفته‌شدند. برای شناسایی دقیق *بروسلا ملی‌تنسیس*، آزمایش‌های رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز، تولید اندول، تولید سولفیدهیدروژن، اوره‌آز و رشد در حضور ۱۰ درصد دی‌اکسیدکربن تست شد (ISIRI, 2020).

استخراج مستقیم DNA

برای انجام PCR بر روی هر نمونه با روش ذیل DNA از نمونه‌ها استخراج گردید؛ ابتدا ۵۰۰µl از نمونه‌های شیر و ۳ گرم از نمونه های پنیر و ماست در میکروتیوب ۱/۵ سی سی ریخته شد. سپس بافر NET (Nacl, EDTA, Tris) 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 ۳-۲ ساعت در حرارت ۵۰ درجه سانتی گراد 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 مجددا 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 سانتی گراد نگه‌داری شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ انجام گرفت. نهایتا 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 الیگونوکلئوتیدی اختصاصی تکثیر شد. PCR در یک مخلوط واکنش ۲۰ میکرولیتری متشکل از ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس ۲X (AMPLIQON, Denmark)، 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).

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

Species	Primer sequences (5-3)	Product (bp)	TM (°C)	Refrences
Br.melitensis 16srRNA	F:AAATCGCGTCCTTGCT GGTCTGA R:TGCCGATCACTTAAG GGCCTTCAT	731	58	(Aman et al., 2020)

UNCORRECTED PROOF

bvfA	F: ACCCTTCGTCGATGTGCTGA	1282	60
	R: CCGCGCTGATTTCATCGCTG		
VirB	F: CGCTGATCTATAATTAAGGCTA	881	59
	R: TGCGACTGCCTCCTATCGTC		
Ure	F:GCTTGCCCTTGAATTCCTTTGTGG	2100	62
	R:ATCTGCGAATTTGCCGGACTCTAT		

تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی

حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های بروسلا با روش انتشار دیسک کربی بائر انجام گرفت (CLSI, 2018). ابتدا جدایه‌ها در آگار خوندار کشت‌داده 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 مولرهینتون انجام شده و به صورت خطی و یکنواخت کشت داده شد. آنتی‌بیوتیک‌ها شامل سیپروفلوکساسین (CP)، جنتامایسین (GM)، آمپی‌سیلین (AM)، ریفامپین (RMN)، تتراسایکلین (TE) و ایمی‌پنم (IM) بود (Heidarzadi et al., 2021).

آنالیز آماری

داده‌های حاصل از آزمایش‌های انجام شده در نرم افزار Microsoft Office Excel گردآوری شده و توسط نرم‌افزار SPSS آنالیز شدند. روش آماری تجزیه و تحلیل داده‌ها، آزمون مربع‌کای و تست دقیق فیشر بود.

نتایج

بنا به نتایج به دست‌آمده با استفاده از روش MRT (Milk Ring Test) میزان آلودگی به *بروسلا ملی‌تنسیس* در لبنیات عرضه‌شده در شهرستان گرمسار از مجموع ۱۸۰ نمونه، ۲۰ نمونه (۱۱/۱۱ درصد) بود. به این ترتیب آلودگی به *بروسلا ملی‌تنسیس* در شیر خام گاو ۷ نمونه (۲۳/۳۳ درصد)، گوسفند ۸ نمونه (۲۶/۶۶ درصد)، بز ۲ نمونه (۶/۶۶ درصد) و گاومیش ۳ نمونه (۱۰ درصد) بود. همچنین با توجه به نتایج به دست‌آمده از کشت خطی آلودگی به *بروسلا ملی‌تنسیس* 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 ملی‌تنسیس* در لبنیات نمونه‌گیری شده به روش MRT و کشت ارتباط آماری معنی‌داری وجود نداشت ($p<0/05$).

جدول شماره ۲، نتایج شیوع آلودگی به *بروسلا ملی‌تنسیس* در لبنیات سنتی نمونه‌گیری شده شهرستان گرمسار به روش MRT و کشت خطی

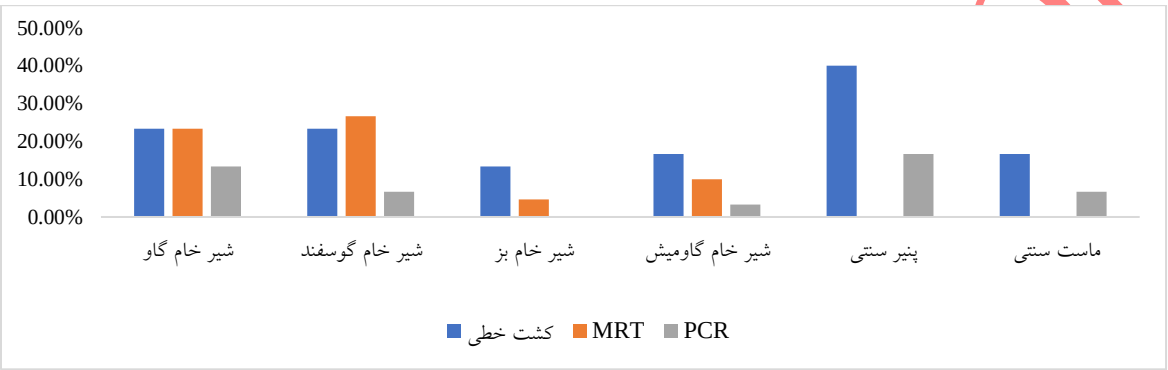
ماده غذایی	تعداد نمونه	MRT	کشت خطی	تست PCR
شیر خام گاو	۳۰	۷^{b} نمونه (۲۳/۳۳ درصد)	۷^{b} نمونه (۲۳/۳۳ درصد)	۴^{c} نمونه (۱۳/۳۳ درصد)
شیر خام گوسفند	۳۰	۸^{b} نمونه (۲۶/۶۶ درصد)	۷^{b} نمونه (۲۳/۳۳ درصد)	۲^{cd} نمونه (۶/۶۶ درصد)
شیر خام بز	۳۰	۲^{cd} نمونه (۶/۶۶ درصد)	۴^{c} نمونه (۱۳/۳۳ درصد)	-
شیر خام گاومیش	۳۰	۳^{cd} نمونه (۱۰ درصد)	۵^{c} نمونه (۱۶/۶۷ درصد)	۱^{dc} (۳/۳۳ درصد)
پنیر سنتی	۳۰	-	۱۲^{a} نمونه (۴۰ درصد)	۵^{c} نمونه (۱۶/۶۷ درصد)

UNCORRECTED PROOF

ماست سنتی	۳۰	-	۵[c] نمونه (۱۶/۶۷ درصد)	۲[cd] 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 Pvalue < ۰/۰۱ با هم تفاوت معنی‌دار آماری دارند.

نتایج به دست‌آمده از میزان شیوع آلودگی به *بروسلا ملی‌تنسیس به روش* PCR نشان داد از مجموع ۱۸۰ نمونه لبنیات سنتی نمونه‌گیری شده در شهرستان گرمسار، ۱۴ نمونه (۷/۷۸ درصد) بود. به این ترتیب آلودگی به شیر خام 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 ملی‌تنسیس* آلوده بودند.



نمودار شماره ۱، مقایسه وضعیت آلودگی به *بروسلا ملی‌تنسیس* در لبنیات عرضه‌شده در شهرستان گرمسار به روش‌های خطی، MRT و PCR

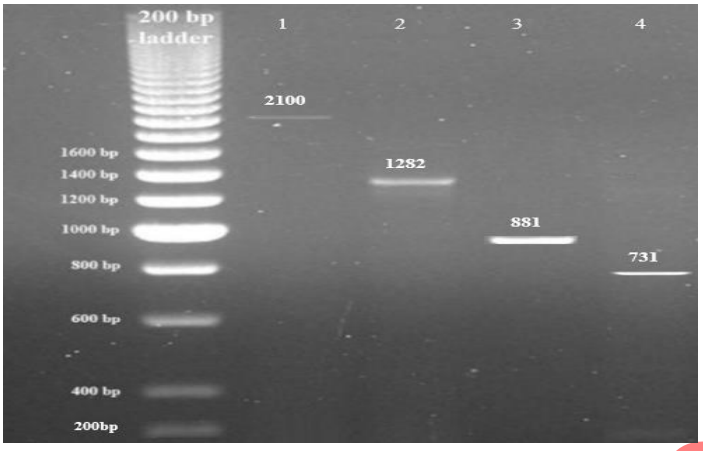
مطابق تست PCR انجام گرفته روی نمونه‌های مثبت، برای تعیین فراوانی ژن‌های bvfA، virfB و ure به صورت زیر بود: فراوانی بیشترین و کمترین ژن حامل به ترتیب شامل bvfA ۹ نمونه (۶۴/۲۵ درصد)، virfB ۵ نمونه (۳۵/۷۴ درصد)، ure ۳ نمونه (۲۱/۴۲) بود.

جدول شماره ۴، 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[a] (۲۱/۴۲ درصد)	۳[a] (۲۱/۴۲ درصد)	۱[c] (۷/۱۴ درصد)
شیر خام گوسفند	۲	۲[b] (۱۴/۲۸ درصد)	۱[c] (۷/۱۴ درصد)	–
شیر خام بز	-		–	–
شیر خام گاومیش	۱	۱[c] (۷/۱۴ درصد)	–	–
پنیر سنتی	۵	۲[b] (۱۴/۲۸ درصد)	۱[c] (۷/۱۴ درصد)	۲[b] (۱۴/۲۸ درصد)
ماست سنتی	۲	۱[c] (۷/۱۴ درصد)	–	–
مجموع	۱۴	۹ (۶۴/۲۵)	۵ (۳۵/۷۴)	۳ (۲۱/۴۲)

در هر سطر، اعداد برچسب خورده با حروف انگلیسی متفاوت، با Pvalue < ۰/۰۱ با هم تفاوت معنی‌دار آماری دارند.

UNCORRECTED PROOF



شکل شماره ۱، 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 *16srRNA* با اندازه ۷۳۱ جفت باز.

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

جدول شماره ۵، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *بروسلا ملی‌تنسیس* جداشده از لبنیات عرضه‌شده در شهرستان گرمسار

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

بحث

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

UNCORRECTED PROOF

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 جمع آوری شده، ۳۸ مورد (۵۲ درصد) از نظر جنس بروسلا مثبت، ۳ مورد (۷/۸ درصد) متعلق به بروسلا آبورتوس 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 هم‌سویی 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 آبورتوس 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 بروسلوز 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 مجموعا 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 میکروبیِ 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 توامان شناسایی می‌گردد که از 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 پنیرهای سنتی عرضه‌شده در آلودگی ۳۹/۱ درصد پنیر سنتی به *بروسلا ملی‌تنسیس* آلوده بوده است (Islam et al., 2023) که با نتایج به دست‌آمده از پژوهش حاضر (۴۰ درصد) مطابقت دارد. در پژوهشی آلودگی به *بروسلا ملی‌تنسیس*

UNCORRECTED PROOF

به روش PCR در برزیل روی پنیر 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 ملی‌تنسیس* در پنیرهای 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 پنیرهای محلی توزیع شده در شهرستان ارومیه به *بروسلا ملی‌تنسیس* به روش PCR و بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌ها انجام شد که گزارش دادند از مجموع ۵۰ نمونه پنیر محلی در نهایت آلودگی ۲ درصدی پنیرهای سنتی را به *بروسلا ملی‌تنسیس* 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 پنیر 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 پنیر سنتی، گزارش دادند که آلودگی ۲۰ درصدی به *بروسلا ملی‌تنسیس* وجود داشته است (Bezerra et al., 2019)، که فراتر از نتایج مطالعه حاضر است. در خصوص آلودگی پنیر عوامل تاثیرگذاری در اختلاف بین مطالعات دخیل هستند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به شیر مورد استفاده در تهیه پنیر، فرآیندهای انجام شده روی رسیدن پنیر، میزان pH و غلظت نمک اشاره کرد.

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

نتیجه‌گیری

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 بروسلوز، برای جلوگیری از گسترش آن‌ها و کنترل شیوع آن ضروری است. ارتقای آگاهی و آموزش عمومی می تواند به کاهش بروز بیماری ها 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.

سپاسگزاری

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 منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

UNCORRECTED PROOF

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., Ogutucu, 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. J. Anim. Health Prod, 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)

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).

UNCORRECTED PROOF

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.
Mpatswenumugabo, 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., Norouzinejad, 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.

UNCORRECTED PROOF