Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 11, Number 4 (September - October)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Molecular Detection of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in Raw and Unpasteurized Bulk Cow Milk Tanks of Traditional Domestic Dairy Sale Centres in Khorramabad

Nemat Shams, Amin Jaidari, Lida Etemadfar

Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran

Downloaded from ijmm.ir at 1:22 +0330 on Wednesday December 13th 2017

Article Information

Article history:
Received: 2017/06/10
Accepted: 2017/08/14
Available online: 2017/09/12

Article Subject:
Food Microbiology

IJMM 2017; 11(4): 13-20

Corresponding author:

Dr. Nemat Shams

Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran

Tel: 0989121772134

Email:
Nematshams1386@yahoo.com

Abstract

Background and Aims: Brucellosis or Malta fever is one of the most prevalent zoonotic diseases considered as a health and economic problem in many countries in the Middle East, including Iran. The consumption of contaminated milk, milk products and contact with infected animals are the main transmission ways of pathogenic *Brucella* strains among human. The aim of the current study was to determine simultaneous detection of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in raw and none-pasteurized bulk cow milk tanks of traditional domestic dairy sale centres in Khorramabad, Iran.

Materials and Methods: In this cross-sectional study during October and November 2015, a total of 120 samples from raw and unpasteurized bulk cow milk tanks were collected from traditional domestic dairy sale centres in Khorramabad. To confirm the presence of *Brucella* genus among the samples, single PCR was carried out using B4 and B5 primers and multiplex PCR was then carried out in order to detect the *B. abortus* and *B. melitensis* spp.

Results: The present study revealed that 10% of the bulk milk tank samples in traditional domestic dairy sale centres in Khorramabad were contaminated with *Brucella*.

Conclusions: Results of PCR assay showed that raw and unpasteurized bulk cow milk tanks of traditional domestic dairy sale centres in Khorramabad are the potential cause of human brucellosis in this region.

KeyWords: Brucella, Bulk Tank Milk, Khorramabad, PCR

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

Final

How to cite this article:

Shams N, Jaidari A, Etemadfar L. Molecular Detection of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in Raw and Unpasteurized Bulk Cow Milk Tanks of Traditional Domestic Dairy Sale Centres in Khorramabad. Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (4): 13-20

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۱ – شماره ۴ – مهر و آبان ۱۳۹۶

Journal homepage: www.ijmm.ir

جستجوی مولکولی *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی‌تنسیس* در تانک‌های ذخیره شیر خام و غیرپاستوریزه گاو در مراکز فروش لبنیات سنتی شهرستان خرم‌آباد

نعمت شمس، امین جایدری، لیدا اعتمادفر

گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۲۰

پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۲۳

انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۶/۲۱

موضوع:

میکروبیولوژی مواد غذایی

IJMM 1396; 11(4): 13-20

نویسنده مسئول:

دکتر نعمت شمس

گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

تلفن: ۰۹۸۹۱۲۱۷۷۲۱۴۳

پست الکترونیک:

Nematshams1386@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهداف: بروسلوز یا تب مالت یکی از شایع‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام است که در بسیاری از کشورهای خاورمیانه ازجمله ایران به‌عنوان یک معضل بهداشتی و اقتصادی مورد توجه ویژه قرار دارد. مصرف شیر و فرآورده‌های لبنی آلوده و نیز تماس با ترشحات دام آلوده از اصلی‌ترین راه‌های انتقال سویه‌های بیماری‌زای بروسلا در انسان می‌باشند. هدف از بررسی حاضر جستجوی همزمان *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی‌تنسیس* در تانک‌های ذخیره شیر خام و غیرپاستوریزه گاو مراکز فروش لبنیات سنتی در شهرستان خرم‌آباد می‌باشد.

مواد و روش کار: در این مطالعه مقطعی– توصیفی طی ماه‌های آبان و آذر سال ۱۳۹٤ درمجموع ۱۲۰ نمونه از تانک‌های ذخیره شیر خام و غیرپاستوریزه گاو مراکز فروش لبنیات سنتی شهرستان خرم‌آباد جمع‌آوری گردید. برای اثبات حضور جنس بروسلا در کلیه نمونه‌ها آزمون PCR منفرد با استفاده از پرایمرهای اختصاصی B4 و B5، و برای جستجوی گونه های *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی‌تنسیس* از آزمون PCR چندگانه استفاده شد.

یافته‌ها: مطالعه حاضر نشان داد که ۱۰٪ از نمونه‌های شیر تانک‌های ذخیره شیر خام و غیرپاستوریزه گاو مراکز فروش لبنیات سنتی در شهرستان خرم‌آباد به *بروسلا* آلوده هستند.

نتیجه‌گیری: نتایج آزمون PCR نشان داد که تانک‌های ذخیره شیر خام و غیرپاستوریزه گاو مراکز فروش لبنیات سنتی در شهرستان خرم‌آباد عامل بالقوه بروسلوز انسانی در منطقه است.

کلمات کلیدی: بروسلا، تانک ذخیره شیر، خرم‌آباد، PCR

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

بروسلوز یا تب مالت که توسط باکتری‌های جنس بروسلا ایجاد می‌شود یکی از شایع‌ترین بیمارهای مشترک بین انسان و دام در سراسر دنیا به‌ویژه منطقه مدیترانه، خاورمیانه و آفریقا است که به لحاظ ضرر و زیان‌های بهداشتی و اقتصادی دارای اهمیت فراوان می‌باشد (۳-۱). بررسی‌های ژنوتایپینگ و مشابهت DNA تاکنون نشان داده است در جنس بروسلا دوازده گونه مشتمل بر ۹ گونه کلاسیک (*بروسلا آبورتوس*، *بروسلا ملی تنسیس*، *بروسلا اویس*، *بروسلا کنیس*، *بروسلا سویس*، *بروسلا نئوتومه*، *بروسلا پینی پیدیالیس*، *بروسلا ستی*، *بروسلا پاپیونیس*) و ۳ گونه غیر تیپیک (*بروسلا میکروتی*، *بروسلا اینوپیناتا*، و *بروسلا ولپیس*) طبقه‌بندی‌شده است (۴،۵). *بروسلا میکروتی*، *بروسلا اینوپیناتا*، *بروسلا ستی*، *بروسلا پینی‌پدیالیس*، *بروسلا پاپیونیس* که از بعضی از حیوانات جداشده‌اند، گاه‌گاهی قادر به ایجاد بیماری در انسان هستند لیکن گونه‌های، *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی‌تنسیس* گونه‌های اصلی آلوده‌کننده انسان می‌باشند (۶). این بیماری در ایران و بسیاری از کشورهای دیگر بومی بوده و طیف وسیعی از پستانداران شامل انسان، گاو، شتر، بز، خوک، جوندگان و پستانداران دریایی را درگیر می‌کند (۳-۱). بیماری بروسلوز در دام‌ها با بروز اختلالات تولیدمثلی نظیر سقط‌جنین، جفت ماندگی، نازایی و کاهش ۱۰ الی ۲۰ درصدی تولید شیر

Downloaded from ijmm.ir at 1:22 +0330 on Wednesday December 13th 2017

همراه است. بروسلاها در دام‌های شیردار مبتلا در غدد لنفاوی فوق پستانی و غدد پستانی موضعی شده و از این طریق در طول زندگی خود عامل بیماری را از طریق شیر دفع می‌کنند. تب مالت در انسان متعاقب مصرف شیر و محصولات لبنی آلوده یا تماس مستقیم با دام آلوده و حتی در مواردی استنشاق هوای اصطبل دام‌های آلوده ایجاد می‌شود (۷،۸). نیاز به ریشه‌کنی این بیماری در جمعیت‌های دامی به‌عنوان پایه و رکن اساسی محور آن در جامعه انسانی، ضرورت بررسی و پژوهش همه‌جانبه و گسترده در خصوص این زئونوز را بیش‌ازپیش آشکار می‌سازد. ریشه‌کنی بیماری اساساً متکی بر انجام تست‌های غربالگر نظیر رزبنگال، آزمایش رایت و 2M به‌منظور شناسایی و کشتار حیوانات آلوده به همراه پوشش کامل واکسیناسیون در جمعیت دامی است. تشخیص بروسلوز در انسان و دام‌ها بر پایه انجام تست‌های باکتریولوژیک و ایمونولوژیک می‌باشد، لیکن استفاده از تست‌های سرولوژیکی به‌طور غیرمستقیم برای تشخیص بیماری توصیه می‌شود. بااین‌حال بسیاری از تست‌های سرولوژیکی ازنظر حساسیت نتایج مثبت کاذب دارند و ازنظر اختصاصیت دارای نتایج منفی کاذب هستند. علاوه براین دارای واکنش‌های متقاطع با باکتری‌هایی مانند *یرسینیا انترکولیتیکا*، *کامپیلوباکتر فتوس*، *ویبریو کلرا*، *بردتلا برونشیسپتیکا* و جنس سالمونلا می‌باشند (۹). استاندارد طلایی تشخیص بروسلوز، کشت و جداسازی ارگانیسم است، اما نیاز به دوره انکوباسیون طولانی‌مدت دارد و حساسیت آن به‌خصوص در موارد مزمن کم است. به‌علاوه به دلیل اینکه بروسلا در زمره پاتوژن‌های کلاس سه ایمنی زیستی است، کشت آن باید با دقت بسیاری انجام شود (۱). بنابراین کاربرد روش‌های نوین تشخیصی نظیر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز که ساده، سریع و حساس و نیز اختصاصیت بیشتری نسبت به تست‌های سرولوژیکی دارد برای تشخیص بروسلوز پیشنهاد می‌شود (۱۳-۱۰). با وجود اینکه بروسلاها دارای میزبان ترجیحی هستند لیکن بررسی‌ها نشان داده است که آلودگی گاو به *بروسلا ملی‌تنسیس* و آلودگی گوسفند و بز با *بروسلا آبورتوس* رخ می‌دهد (۱۴). بنابراین شناسایی دقیق گونه‌های بروسلا جهت مطالعات اپیدمیولوژیکی در انسان و حیوانات اهلی، به‌منظور به‌کارگیری راه‌های کنترلی مناسب اهمیت دارد. از طرفی مرکز مدیریت بیماری‌های واگیر اداره مبارزه با بیماری‌های قابل‌انتقال بین انسان و حیوانات وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی استان لرستان را در زمره استان‌های با میزان آلودگی بسیار بالا (میزان بروز ۳۱-۴۱ نفر به ازای یک‌صد هزار نفر) گروه‌بندی نموده است (۱۵،۱۶)، لذا با توجه به موارد فوق‌الذکر و به لحاظ معضلات مهم بهداشتی و اقتصادی ناشی از بیماری و با توجه به اینکه تعیین میزان آلودگی شیر و فرآورده‌های لبنی به بروسلا اقدام مهم و مؤثری در پیشگیری و کاهش ابتلا به بروسلا به‌حساب می‌آید، این مطالعه با هدف بررسی ژنومی *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی‌تنسیس* در تانک‌های ذخیره شیر خام و غیرپاستوریزه گاو عرضه شده در مراکز فروش لبنیات سنتی شهرستان خرم‌آباد انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

در این مطالعه مقطعی- توصیفی از آبان تا آذرماه سال ۱۳۹۴ درمجموع تعداد ۱۲۰ نمونه از تانک‌های ذخیره شیر خام و غیرپاستوریزه گاو به‌صورت تصادفی از مراکز فروش لبنیات سنتی سطح شهرستان خرم‌آباد جمع‌آوری شد. آدرس و مشخصات کلیه مراکز فروش لبنیات سنتی شهرستان خرم‌آباد از اتاق اصناف و مرکز بهداشت شهرستان خرم‌آباد اخذ گردید. نمونه‌ها در ظروف استریل در کنار یخ به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان انتقال و جهت انجام مراحل بعدی، نمونه‌ها در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

استخراج DNA از نمونه‌های شیر

جهت استخراج DNA ژنومی یک میلی‌لیتر از نمونه شیر را در میکروتیوپ ریخته و در دور g ۱۳۰۰۰ به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و پس از جداسازی چربی، میکروتیوپ با آب مقطر استریل دو بار شستشو داده شد. جهت استخراج DNA، از کیت (Gene All cell SV mini 250) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. پس از استخراج، برای بررسی اولیه کمیت و میزان آلودگی DNA به RNA و پروتئین از دستگاه نانودراپ (ND-2ooo, Thermo Scientific USA) استفاده شد. با تزریق دو میکرولیتر محلول DNA در صفحه چشمی مخصوص، اسپکتروفتومتری نمونه با اشعه UV انجام شد که دستگاه میزان جذب نور را در فاصله ۱۹۰ تا ۸۴۰ نانومتر برای DNA به‌صورت نمودار و نسبت جذب نور در طول‌موج ۲۶۰ به ۲۸۰ و ۲۶۰ به ۲۳۰ (نشان‌دهنده میزان خلوص و آلودگی) محاسبه و درنهایت غلظت DNA را به‌صورت ng/µL گزارش کرد. نمونه‌های DNA استخراج‌شده تا زمان انجام PCR در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

Downloaded from ijmm.ir at 1:22 +0330 on Wednesday December 13th 2017

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 1:22 +0330 on Wednesday December 13th 2017

تشخیص مولکولی بروسلا با استفاده از PCR

برای اثبات باکتری بروسلا در نمونه‌های شیر، آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای B4 و B5 ارائه‌شده توسط Baily و همکاران انجام گردید (۱۰). این پرایمرها که موجب تکثیر ژن محافظت‌شده bcsp31 (ژن کدکننده پروتئین غشاء ۳۱ کیلودالتونی *بروسلا آبورتوس*) می‌شود، اختصاصی جنس بروسلا می‌باشد. جهت انجام PCR، ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (Ampliqon C, Denmark)، ۲ میکرولیتر DNA نمونه مشکوک (۱۰ng/µL) و یک میکرولیتر از پرایمرهای B4 و B5 با غلظت ۱۰ پیکومول استفاده گردید و سپس با آب مقطر دیونیزه حجم نهایی به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برنامه زمانی و دمایی ترموسایکلر مطابق با جدول شماره ۲ انجام گردید.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورداستفاده جهت شناسایی جنس و گونه‌های بروسلا

منبع	اندازه (bp)	توالی پرایمرها (´۳ → ´۵)	نام پرایمر	
Baily et al, ۱۹۹۲	۲۲۳	B4- F: TGG CTC GGT TGC CAA TAT CAA B5- R: CGC GCT TGC CTT TCA GGT CTG	B4 B5	تعیین جنس بروسلا
Bricker et ۱۹۹۴ al,	۴۹۸	Abor-F: GAC GAA CGG AAT TTT TCC AAT CCC IS711-R: TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT	Ba-SP IS711-SP	*بروسلاآبورتوس (بیوار ۱،۲،۴)*
Bricker et ۱۹۹۴ al,	۷۳۱	Meli-F: AAA TCG CGT CCT TGC TGG TCT GA IS711-R:TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT	Bm-SP IS711-SP	*بروسلا ملی‌تنسیس*

برای تشخیص گونه‌های *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی تنسیس* به روش Multiplex PCR از پرایمرهای ارائه‌شده توسط Bricker و Halling استفاده گردید (۱۷). توالی پرایمرهای استفاده شده در این بررسی در جدول ۱ ارائه شده است. مخلوط نهایی برای انجام آزمون Multiplex PCR برای هر نمونه، ۲۵ میکرولیتر بوده است. به جزء پرایمرها، مخلوط واکنش‌گرها مطابق با آزمون PCR تعیین جنس بروسلا بود. درنهایت میکروتیوپ‌ها، در دستگاه ترموسایکلر (Primus 96,Germany) با برنامه دمایی که در جدول شماره ۳ نشان داده شده است، قرار داده شد. در این بررسی از سویه واکسن RB51 (Razi institute, Iran) به‌عنوان کنترل مثبت برای *بروسلا آبورتوس* و از سویه واکسن Rev.1 (Razi institute, Iran) به‌عنوان کنترل مثبت برای *بروسلا ملی‌تنسیس* و از سویه استاندارد *اشریشیا کلی* (ATCC 43895) به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید. همچنین کنترل بلانک شامل همه موارد واکنش PCR به جزء DNA بود.

الکتروفورز محصولات PCR توسط دستگاه الکتروفورز (Padideh Nojen Pars, Iran) بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ (Sigma, USA) و با استفاده از رنگ Safe Stain (SinaClon, Iran) انجام شد. ژل‌ها با استفاده از دستگاه ژل داک (Syngene, England) موردبررسی قرار گرفتند.

جدول ۲: برنامه و سیکل‌های دمایی استفاده شده در PCR جهت تشخیص جنس بروسلا

دما (°C)	زمان	برنامه	
۹۳	۵ دقیقه	واسرشت اولیه	
۹۰	۱ دقیقه	واسرشت اولیه	۴۰
۵۸	۴۵ ثانیه	اتصال	چرخه
۷۲	۱ دقیقه	گسترش نهایی	دمایی
۷۲	۱۰ دقیقه	گسترش نهایی	

جدول ۳: برنامه و سیکل‌های دمایی استفاده شده در Multiplex PCR

دما (°C)	زمان	برنامه	
۹۰	۵ دقیقه	واسرشت اولیه	
۹۰	۱ دقیقه	واسرشت اولیه	۳۵
۵۸	۴۵ ثانیه	اتصال	چرخه
۷۲	۱ دقیقه	گسترش نهایی	دمایی
۷۲	۷ دقیقه	گسترش نهایی	

یافته‌ها

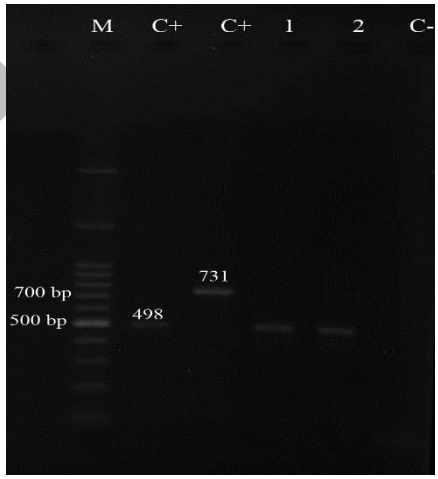
نتایج به‌دست‌آمده از PCR نمونه‌ها نشان داد که از مجموع ۱۲۰ نمونه تانک ذخیره شیر خام و غیرپاستوریزه گاو عرضه‌شده در مراکز فروش لبنیات سنتی شهرستان خرم‌آباد، ۱۲ نمونه (۱۰ درصد) ازنظر وجود توالی اختصاصی ژن Bcsp31 در *بروسلا* مثبت بودند. در کلیه نمونه‌های مثبت باند ۲۲۳ bp تکثیر و مشاهده شد (شکل ۱).

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 1:22 +0330 on Wednesday December 13th 2017

نتایج حاصل از Multiplex PCR با پرایمرهای اختصاصی تعیین گونه نشان داد که هر ۱۲ نمونه مثبت، واجد باند bp ۴۹۸ گونه *بروسلا آبورتوس* بودند (شکل ۲).

شکل ۱: الکتروفورز محصولات PCR حاصل از تکثیر ژن bcsp31. M: مارکر bp ۱۰۰، c^+: کنترل مثبت، ستون‌های ۱،۲،۳،۴،۵: نمونه‌های مثبت، c^-: کنترل منفی، cb: کنترل بلانک



شکل ۲: الکتروفورز محصولات Multiplex PCR. M: مارکر bp ۱۰۰، c^+: کنترل مثبت، ستون‌های ۱ و ۲: نمونه‌های *بروسلا آبورتوس* مثبت، c^-: کنترل منفی

بحث

شیر و فرآورده‌های لبنی در تغذیه انسان به لحاظ دارا بودن ارزش غذایی بالا، دارای نقش به سزایی هستند. بعلاوه شیر غنی از پروتئین، چربی و قند بوده که یک محیط کشت ایده‌ال برای رشد میکروارگانیسم‌های مختلف است (۱۸). در سال‌های اخیر مصرف شیر با توجه به ارزش غذایی آن در کشور ما رو به افزایش بوده و درنتیجه بررسی میزان میکروارگانیسم‌های پاتوژن و مولد آلودگی، بسیار حائز اهمیت است.

آلودگی شیر خام و محصولات لبنی به باکتری‌های بیماری‌زا خطرات بالقوه‌ای را برای مصرف‌کنندگان محصولات خام ایجاد می‌نماید. بنابراین استفاده از روش‌های پاستوریزاسیون یک روش مؤثر برای کنترل باکتری‌های پاتوژن در شیر و فرآورده‌های لبنی می‌باشد. اگرچه پاستوریزاسیون مناسب می‌تواند این خطرات را کاهش دهد ولی بخشی از عموم مردم، شیر یا محصولات غیرپاستوریزه را مصرف می‌کنند که این امر ناشی از فرهنگ عمومی و یا عادت فردی است که دلایل عمده آن تفکر اشتباه مبنی بر مفید بودن محصولات خام لبنی برای سلامتی می‌باشد. مطالعه Hashtarkhani و همکاران (۲۰۱۵) در خراسان رضوی بر روی بیماران مبتلا به تب مالت نشان داده است که ۷۷/۲٪ از بیماران، سابقه مصرف مواد لبنی غیرپاستوریزه را داشته‌اند که در بین مواد لبنی غیرپاستوریزه مصرف‌شده توسط مبتلایان، شیر با ۹۱/۴٪ و پنیر با ۲۷/۸٪ بیشترین موارد مصرف را داشته‌اند (۱۹).

پژوهش‌های متعددی در ارتباط با آلودگی شیر خام و غیرپاستوریزه در ایران و سایر کشورها انجام‌گرفته است. در ایران بررسی Izadi و همکاران در سال ۲۰۱۲ در استان تهران نشان داده است از ۵۷ نمونه شیر خام گاو، ۹ نمونه (۳۳ درصد) با آزمون Nested PCR مثبت می‌باشند (۲۰)، که با مطالعه حاضر به دلیل حساسیت آزمون‌های مورداستفاده تفاوت دارد. مطالعه Shakerian و همکاران در سال ۲۰۱۲ در استان اصفهان و چهارمحال بختیاری که با هدف بررسی میزان آلودگی نمونه‌های شیر خام گاو به *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی تنسیس* با روش PCR انجام گرفته است، تنها ۱ درصد از نمونه‌ها را به باکتری *بروسلا آبورتوس* مثبت گزارش نمودند (۲۱)، که با مطالعه ما مطابقت ندارد که می‌تواند به دلیل تفاوت درروش نمونه‌گیری، تعداد نمونه‌های اخذشده، عوامل جغرافیایی منطقه مورد بررسی، انجام واکسیناسیون و اقدامات کنترلی بیماری در دام‌های این دو استان باشد. بررسی پراکندگی جغرافیایی این بیماری نشان می‌دهد که استان چهارمحال و بختیاری در گروه استان‌های با میزان آلودگی متوسط (میزان بروز ۲۰-۱۱ نفر در صد هزار نفر) و استان اصفهان در گروه استان‌های با آلودگی پائین (میزان بروز ۱۰-۰ نفر در صد هزار نفر) طبقه‌بندی گردیده‌اند (۱۶). در سال ۲۰۱۲ در استان کردستان Shafeie و همکاران (۲۰۱۲) با

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 1:22 +0330 on Wednesday December 13th 2017

بهره‌گیری از پرایمرهای مشابه بررسی حاضر و انجام آزمون PCR بر روی ۶۰ نمونه شیر خام گاو، دریافتند تعداد ۲۰ نمونه (۳۳/۳۳ درصد) آلوده به باکتری بروسلا بوده و از این تعداد نامبردگان ۹ نمونه (۴۵ درصد) را به‌عنوان بیوارهای ۱، ۲ و ۴ *بروسلا آبورتوس* شناسایی نمودند (۲۲). نامبردگان مغایرت در نتایج حاصله با مطالعات انجام‌شده در سایر مناطق را به دلیل مجاورت و همسایگی استان کردستان با کشورهایی نظیر عراق و ترکیه و وارد شدن بیوارهای غیربومی به استان کردستان و نیز انتشار احتمالی بیوار ۱ *بروسلا آبورتوس* واکسن RB51 در شیر متعاقب واکسیناسیون در دام‌های موردمطالعه دانستند.

در مطالعه Khalili و همکاران طی سال ۲۰۱۶، که جهت بررسی آلودگی شیر خام به بروسلا با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در کرمان انجام‌گرفته است، درمجموع ۸/۳٪ از نمونه‌های شیر مخزن از نظر وجود ژنوم باکتری‌های گونه بروسلا مثبت اعلام شد (۲۳)، که اندکی با نتایج حاصله از بررسی حاضر مطابقت دارد.

طی مطالعه‌ای که توسط Hoffman و همکاران در سال ۲۰۱۶، با استفاده از روش Real-time PCR بر روی نمونه‌های شیر خام گاو عرضه‌شده در مراکز فروش در اوگاندا صورت گرفته است، درمجموع ۶/۵ درصد نمونه‌ها دارای ژن Bcsp31 و مثبت بودند (۲). در کشور کنیا در سال ۲۰۰۴ مطالعه Kangethe و همکاران نشان داده است میزان آلودگی شیر خام گاو به باکتری *بروسلا آبورتوس* ۴ درصد می‌باشد (۲۴). طی مطالعه Gulbaz و همکاران در سال ۲۰۱۶ در ترکیه، با به‌کارگیری روش‌های کشت و مولکولی دریافتند از ۲۱۵ نمونه شیر خام ۱/۸۶ درصد از نمونه‌ها به باکتری بروسلا آلوده می‌باشند (۲۵). در مطالعه‌ای که Kaynak-Onurdag و همکاران در سال ۲۰۱۶، در ادیرنه ترکیه انجام دادند، ۲ درصد از کل نمونه‌ها هم با روش کشت و هم با روش qPCR ازنظر وجود باکتری *بروسلا آبورتوس* مثبت اعلام شد (۲۶). در کشور نیجریه مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۸ بر روی نمونه‌های شیر خام گاو انجام گرفت، میزان آلودگی به باکتری *بروسلا آبورتوس* ۴۰ درصد گزارش‌شده است (۲۷). علت عدم همخوانی میزان آلودگی شیر خام گاو در بررسی حاضر با سایر بررسی‌ها می‌تواند به دلیل روش جداسازی باکتری، حجم نمونه‌های مورد بررسی، عوامل میزبانی، موقعیت و شرایط اقلیمی و جغرافیایی، انجام واکسیناسیون در دام‌های منطقه، حساسیت آزمون‌های موردمطالعه باشد. مطالعات انجام‌شده در ایران نشان داده است بیووار ۳ *بروسلا آبورتوس* از موارد ابتلا بروسلوز انسانی بیشتر جدا می‌شود (۲۸). پرایمرهای استفاده شده در بررسی حاضر و بسیاری از بررسی‌های مشابه تنها قادر به تشخیص بیووارهای ۱، ۲، و ۴ *بروسلا آبورتوس* می‌باشد (۱۷)، ازاین‌رو نتایج حاصل از بررسی حاضر با سایر استان‌های کشور مغایرت دارد. از طرفی از آنجا که سویه موجود در واکسن RB51 بیووار ۱ *بروسلا آبورتوس* می‌باشد و احتمال انتشار سویه واکسن در شیر متعاقب زایمان وجود دارد این امر می‌تواند در افزایش تعداد موارد این بیووار غیر شایع در بعضی مطالعات باشد (۲۹).

بررسی حاضر نشان داد ۱۰ درصد از نمونه‌های شیر تانک‌های ذخیره شیر مراکز فروش لبنیات سنتی شهرستان خرم‌آباد به بروسلا آلوده بوده و گونه *بروسلا آبورتوس* گونه محتمل موجود در شیر خام مراکز لبنیات سنتی شهرستان خرم‌آباد می‌باشد. مطالعه‌ای که توسط Zowghi و همکاران (۲۰۰۸) در ایران انجام‌شده است گونه *بروسلا آبورتوس* را گونه غالب بروسلا در ایران اعلام نمودند (۲۸). با توجه به نتایج حاصله که دلالت بر وجود بیماری در جمعیت دامی شهرستان دارد، مصرف شیر و فرآورده‌های لبنی خام و غیرپاستوریزه در مراکز فروش لبنیات سنتی منطقه مورد مطالعه به‌عنوان یکی از عمده‌ترین راه‌های انتقال و یک خطر جدی و بالقوه در بروز تب مالت در منطقه مورد بررسی بسیار حائز اهمیت است.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه لرستان در طرح پژوهشی مصوب به شماره ۹۴۳۰۲۵۹۹۵ مورخ ۹۴/۱۱/۶، به دلیل حمایت مالی تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 1:22 +0330 on Wednesday December 13th 2017

References

1. Haque N, Bari MS, Hossain MA, Muhammad N, Ahmed S, Rahman A, et al. An overview of Brucellosis. Mymensingh Med J 2011; 20(4):742–747.
2. Hoffman T, Rock K, Mugizi DR, Muradrasoli S. Molecular detection and characterization of Brucella species in raw informally marketed milk from Uganda. Infect Ecol Epidemiol 2016; 6(1): 1-4.
3. Luna L, Mejía G, Barragán V, Trueba G. Molecular Detection of Brucella Species in Ecuador. Intern J Appl Res Vet Med 2016; 14(2):185-189.
4. Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckaert A. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for Brucella strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. Int J Syst Evol Microbiol 2007; 57(11): 2688-2693.
5. Whatmore AM, Davison N, Cloeckaert A, Al Dahouk S, Zygmunt MS, Brew SD, et al. *Brucella papionis* sp. nov., isolated from baboons (Papio spp.). Int J Syst Evol Microbiol 2014; 64(12): 4120- 4128.
6. Franco MP, Mulder M, Gilman RH, Smits HL. Human brucellosis. Lancet Infect Dis 2007; 7(12): 775-786.
7. Diaz Aparicio E. Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*. Rev Sci Tech 2013; 32(1):53-60.
8. Guerra H. The brucellae and their success as pathogens. Crit Rev Microbiol 2007; 33(4):325-31.
9. Gall D, Nielsen K. Serological diag-nosis of bovine brucellosis: A review of test performance and cost comparison. Rev Sci Tech 2004; 23(3): 989-1002.
10. Baily GG, Krahn JB, Drasar BS, Stoker NG. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. J Trop Med Hyg 1992; 95(4): 271-275.
11. Gupta VK, Verma DK, Rout PK, Singh SV, Vihan VS. Polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Brucella melitensis* in goat milk. Small Rumin Res 2006; 65(1-2): 79–84.
12. Hamdy MER, Amin AS. Detection of Brucella Species in the Milk of Infected Cattle, Sheep, Goats and Camels by PCR. Vet J 2002; 163(3): 299-305.
13. Mirnejad R, Mohamadi M, Piranfar V, Mortazavi SM, Kachuei R. Aduplex PCR for the rapid and simultaneous detection of Brucella spp. In human blood samples. Asian pac j trop med 2013; 6(6): 453-456.
14. Ocholi RA, Kwaga JKP, Ajogi I, Bale JOO. Abortion due to *Brucella abortus* in sheep in Nigeria. Revue Scientifique et Technique 2005; 24(3): 973-979.
15. Shams N, Mansouri F, Jahani E. Seroprevalence of brucellosis in dairy farms of Ivan in 1392. Journal of Zoonoses Research 2013; 2(1): 21-24. [in Persian]
16. Zeinali M, Shirzadi MR, Haj rasuliha H. National Guideline for Brucellosis Control. 2nd ed. Tehran: Ministry of health and medical education; 2012.
17. Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv.1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and Brucella suis bv. 1 by PCR. J Clin Microbiol 1994; 32(11):2660–2666.
18. Dhanashekar R, Akkinepalli S, Nellutla A. Milk-borne infections. An analysis of their potential effect on the milk industry. GERMS 2012; 2(3):101-109.
19. Hashtarkhani S, Akbari M, jarahi L, Atminani K. Epidemiological characteristics and the incidence of brucellosis in the province Khorasan Razavi. Med J Mashhad Univ Med 2015; 58(9): 531-538. [in Persian]
20. Izadi A, Moslemi E, Hossein Yazdi A. Detection of Brucella spp. in raw milk and cheeses samples using hemi nested PCR. New Cell Mol Biotechnol J 2012; 2 (7): 83-90. [in Persian]
21. Shakerian A. Study of contamination rate in craw milk and its traditional products with *Brucella abortus*, and *Brucella mellitensis* in Isfahan and Chaharmahal and Bakhtiari Provinces, 2012. J Shahrekord Univ Med Sci 2015; 17(1): 16-23. [in Persian]
22. Shafeie B, Ahmadi M, Dastmalchi Saei H. Diagnosis of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in the Milk of Cattle and Sheep in Kurdistan Province by Polymerase Chain Reaction. jvm 2012; 8(2): 127-135. [in Persian]
23. Khalili M, Aflatoonian M, Salari Aliabadi F, Abshenas J. Brucella contamination in raw milk by polymerase chain reaction. Tehran Univ Med J 2016; 74(7): 517-521. [in Persian]
24. Kangethe EK, Arimi SM, Omore AO, McDermott JJ, Nduhiu JG, Macharia JK, et al. Testing for antibodies to Brucella abortus in milk from consumers and market agents in Kenya using milk ring test and enzyme immunoassay. Kenya Vet 2004; 27(1): 18-21.

Final Proof

25. Gulbaz G, Kamber U. The detection of brucella bacteria with PCR and bacteriological metod in raw milk and some of the dairy products which are consumed in kars. Bull Univ Agric Sci Vet Med Cluj Napoca 2016; 73(1): 127-132.

26. Kaynak-Onurdag F, Okten S, Sent B. Screening Brucella spp. in bovine raw milk by real-time quantitative PCR and conventional methods in a pilot region of vaccination, Edirne, Turkey. J Dairy Sci 2016; 99(5): 3351-3357.

27. Junaidu AU, Oboegbulem SI, Salihu MD. Seroprevalence of brucellosis in prison farm in Sokato, Nigeria. Asia J Epidemiol 2008; 1(1): 24-8.

28. Zowghi E, Ebadi A, Yarahmadi M. Isolation and identification of Brucella organisms in Iran. Iran J of Clin Infect Dis 2008; 3(4): 185-188. [In Persian].

29. Longo M, Mallardo K, Montagnaro S, De Martino L, Gallo S, Fusco G, et al. Shedding of *B. abortus* rough mutant strain RB51 in milk of water buffalo (*Bubalus bubalis*). Prev Vet Med 2009; 90(1-2):113–8.

Downloaded from ijmm.ir at 1:22 +0330 on Wednesday December 13th 2017

Final Proof