مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

آلودگی پنیرهای کوزه‌ای محلی عرضه‌شده در شهرستان ارومیه به گونه‌های *بروسلا* و ارزیابی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها

بروسلا در پنیرهای کوزه‌ای محلی ارومیه و مقاومت آنتی‌بیوتیکی

سما غلامعلی[۱]، مسلم نیریز نقدهی[۲*]، محمد رضا اصغرزاده[۳]

[۱] دانش‌آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.

[۲] استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

[۳] استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۲/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۶/۲۰

کلمات کلیدی:

آلودگی،

پنیر کوزه‌ای محلی،

مقاومت آنتی‌بیوتیکی،

گونه‌های *بروسلا*

DOI: 10.22034/FSCT.20.144. 169

DOR:20.1001.1.20088787.1402.20.144.10.4

* مسئول مکاتبات:

mnn.uiau@yahoo.com

چکیده

بروسلوز یک بیماری زئونوز مهم می‌باشد. شیر و فرآورده‌های شیر غیرپاستوریزه از منابع اصلی انتقال *بروسلا* به انسان هستند. تحقیق حاضر با هدف بررسی میزان آلودگی پنیرهای کوزه‌ای محلی عرضه‌شده در شهرستان ارومیه به گونه‌های *بروسلا* و ارزیابی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها انجام شد. ۵۰ نمونه پنیر کوزه‌ای گاوی محلی از خرده‌فروشی‌های لبنیات سنتی مناطق مختلف شهرستان ارومیه به‌صورت تصادفی و با شرایط سترون در سال ۱۴۰۱ جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها، ابتدا در آب‌گوشت غنی‌سازی *بروسلا* سپس در آگار انتخابی *بروسلا* با مکمل کشت داده شدند. شناسایی مولکولی گونه‌های *بروسلا* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) انجام شد. آزمایش حساسیت ضدمیکروبی روی جدایه‌ها به‌روش انتشار دیسک کربی-بائر انجام شد. از میان نمونه‌های آزمایش‌شده، ۲ نمونه آلوده به *بروسلا* (۴ درصد) تشخیص‌داده شدند. یک نمونه به *بروسلا آبورتوس* بیووار ۱، ۲ و ۴ (۲ درصد) و نمونه دیگر به *بروسلا ملی‌تنسیس* (۲ درصد) آلوده بودند. جدایه‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های آزیترومایسین، ایمی‌پنم، داکسی‌سایکلین، ریفامپین، کوتریموکسازول، حساس و در برابر آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین-کلاوولانیک اسید، تتراسایکلین، جنتامایسین و سفتریاکسون مقاوم بودند. هم‌چنین سویه *بروسلا آبورتوس* در برابر سیپروفلوکساسین، حساس ولی سویه *بروسلا ملی‌تنسیس* در برابر آن مقاوم بودند. از طرفی جدایه‌ها ویژگی مقاومت به چند دارو (MDR) نشان دادند. از یافته‌ها می‌توان نتیجه‌گیری نمود که آلودگی به *بروسلا* در پنیرهای کوزه‌ای محلی عرضه‌شده در شهرستان ارومیه پایین می‌باشد؛ ولی نظر به بیماری‌زایی بالای *بروسلا ملی‌تنسیس* برای انسان، غربال‌گری گاوهای آلوده، مایه‌کوبی گله‌های گوسفند و بز و جلوگیری از عرضه شیر و فرآورده‌های شیر غیرپاستوریزه پیشنهاد می‌گردد. هم‌چنین توصیه می‌گردد آنتی‌بیوتیک‌های آزیترومایسین و ایمی‌پنم توام با سایر آنتی‌بیوتیک‌های رایج در درمان بروسلوز ارزیابی گردند.

۱- مقدمه

پنیر کوزه‌ای[1] از پنیرهای سنتی شناخته شده و محبوب در مناطق کردستان و آذربایجان ایران می‌باشد. این پنیر رسیده[2]، به‌صورت سنتی از شیر خام گوسفند و یا مخلوطی از شیر خام گوسفند و بز عمدتاً با رنت[3] و بدون افزودن آغازگر[4] تهیه می‌گردد. در حال حاضر به‌دلیل تقاضای بالا برای مصرف، این پنیر از شیر گاو هم تهیه می‌گردد. برای تهیه این پنیر در شرایط سنتی، رنت به شیر افزوده شده و در دمای ۳۴-۳۳ درجه‌سلسیوس به‌مدت ۶۰-۴۵ دقیقه نگه‌داری می‌گردد. لخته[5] پس از تشکیل، برش و در کیسه‌های پارچه‌ای ریخته شده و به‌مدت ۱۵-۱۴ ساعت جهت خروج کامل آب پنیر فشرده می‌گردد. سپس پنیرها نمک‌پاشی و خرد می‌گردند. در این مرحله، در صورت نیاز سبزی‌های معطر افزوده و مخلوط می‌گردد. پنیرهای خردشده در ظروف سفالی، پلاستیکی و یا حلبی فشرده و پر می‌گردند. درب ظروف محکم بسته‌شده و جهت رسیدن در یک مکان مناسب در زیر خاک، سرداب و یا انبارهایی با شرایط دما و رطوبت کنترل شده به‌مدت معین (۳-۲ ماه) نگهداری می‌گردند [۱، ۲ و ۳]. با توجه به این‌که پنیرهای کوزه‌ای سنتی از شیر خام تهیه می‌گردند؛ بنابراین امکان آلودگی عوامل بیماری‌زای مهم و قابل انتقال به انسان نظیر *بروسلا*[6] در آن‌ها وجود دارد.

باکتری‌های جنس *بروسلا* کوکوباسیل‌های درون سلولی اختیاری، گرم منفی، فاقد کپسول، تاژک و اندوسپور هستند. گرچه رشد *بروسلاها* به‌صورت هوازی رخ می‌دهد ولی بسیاری از گونه‌ها از قبیل *بروسلا آبورتوس* برای رشد بهینه به غلظت ۱۰-۵ درصد دی‌اکسیدکربن نیاز دارند. محدوده pH بهینه برای رشد ۷/۴-۶/۶ است ولی گونه‌های *بروسلا* می‌توانند در سطح اسیدیته لاکتاتی کمتر از ۰/۵ درصد زنده بمانند و تولید آنزیم اوره‌آز آن‌ها را قادر می‌سازد تا اسیدیته معده را تحمل کنند. هفت گونه *بروسلا* با منشا خاک شناخته شده است که عبارتند از: *بروسلا ملی‌تنسیس*[7] (گوسفند و بز)، *بروسلا سوئیس*[8] (خوک)، *بروسلا آبورتوس*[9] (گاو)، *بروسلا اوویس*[10] (گوسفند)، *بروسلا کانیس*[11] (سگ)، *بروسلا نئوتومه*[12] (رت چوب *بیابانی*[13]) و *بروسلا میکروتی*[14] (موش صحرایی). ازبین گونه‌ها، *بروسلا ملی‌تنسیس* به بیشترین میزان در جمعیت عمومی رخ می‌دهد و بیماری‌زاترین و مهاجم‌ترین گونه است؛ به‌دنبال آن، *بروسلا سوئیس*، *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا کانیس* به‌ترتیب قرار دارند. *بروسلا آبورتوس* علاوه‌بر میزبان اصلی، می‌تواند گاومیش، شتر، آهو، سگ، اسب، گوسفند و انسان را هم آلوده نماید. هم‌چنین *بروسلا ملی‌تنسیس* می‌تواند به گاو انتقال یابد و برای انسان هم بسیار عفونی است. اگرچه *بروسلا* در فرآورده‌های تخمیری شیر کمتر یافت می‌شود ولی گزارش شده است که pH اسیدی فقط تاثیر اندکی روی این ارگانیسم می‌گذارد. هم‌چنین این باکتری‌ها در شرایط سرد و انجماد عمیق به‌خوبی زنده می‌مانند ولی به سرعت در دمای ۶۰ درجه‌سلسیوس در مدت ۱۰ دقیقه از بین می‌روند. این ارگانیسم در فرآیند تولید پنیر زنده می‌ماند و می‌تواند در طول نگه‌داری پنیر بقا یابد. در واقع پنیر تهیه شده از شیر غیرپاستوریزه یکی از غذاهایی است که اغلب به‌عنوان منبع عفونت نقش دارد [۴ و۵].

بروسلوز[15] دراصل یک بیماری مسری حیوانات اهلی است ولی انسان‌ها هم از راه‌های مختلف به این بیماری مبتلا می‌شوند. دوز عفونی گزارش شده برای *بروسلا* بین ۱۰ تا ۱۰۰ ارگانیسم متفاوت است. این بیماری از طریق تماس مستقیم با حیوانات آلوده و ترشحات آن‌ها به انسان منتقل می‌شود. هم‌چنین ممکن است از طریق خوردن محصولات غذایی آلوده مانند شیر خام و فرآورده‌های شیر غیرپاستوریزه گسترش یابد [۴]. بیماری‌زایی به حدت سویه *بروسلا* و ایمنی میزبان بستگی دارد. علائم معمولاً ۲ تا ۸ هفته اما در موارد حاد به‌طور متوسط 14-10 روز پس از عفونت ظاهر می‌شود. بروسلوز انسانی با علایم سردرد، تب مواج، درد مفاصل، درد عضلات، تعریق فراوان، لرز، ضعف، بی‌حالی، بی‌خوابی، بی‌اشتهایی، یبوست، عصبی بودن و افسردگی ظاهر می‌گردد. میزان مرگ و میر در موارد بدون درمان کمتر از ۲ درصد است اما برای عفونت‌های *بروسلا ملی‌تنسیس* بیشتر است. در موارد شدید بروسلوز، سیستم اسکلتی ممکن است تحت تاثیر قرار گیرد و باعث اسپوندیلیت[16] و آرتریت[17] شود. دستگاه تناسلی ادراری هم ممکن است مبتلا گردد

1. Crumbled Kope cheese
2. Ripened cheese
3. Rennet
4. Starter
5. Curd
6. *Brucella*
7. *Brucella melitensis*
8. *Brucella suis*
9. *Brucella abortus*
10. *Brucella ovis*
11. *Brucella canis*
12. *Brucella neotomae*
13. Desert wood rat
14. *Brucella microti*
15. Brucellosis
16. Spondylitis
17. Arthritis

که منجر به ارکیت[1]، پروستاتیت[2] و اپیدیدیمو-ارکیت[3] در مردان جوان گردد. به‌ندرت پیچیدگی‌های عصبی و عوارض قلبی نیز ممکن است رخ دهد. اندوکاردیت عفونی مسئول اکثر مرگ و میرهای مرتبط با بروسلوز است [۴ و ۵]. در حیوانات، بروسلوز باعث سقط جنین، مرگ جنین و عفونت‌های تناسلی می‌شود [۶]. در حال حاضر تشخیص بروسلوز متکی بر روش‌های سرم‌شناسی، میکروب‌شناسی و مولکولی می‌باشد [۷].

آنتی‌بیوتیک‌ها معمولاً در درمان بروسلوز استفاده می‌شوند و ممکن است تکثیر باکتری را سرکوب کنند. یکی از موانع درمان آنتی‌بیوتیکی این است که *بروسلاها* می‌توانند در محیط‌های درون سلولی زنده مانده و در ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک تکثیر یابند. به‌همین دلیل آنتی‌بیوتیک‌های مورداستفاده باید فعالیت درون‌سلولی داشته باشند [۸]. آنتی‌بیوتیک‌های پرکاربرد در درمان بروسلوز عبارتند از: تتراسایکلین‌ها، تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول (کوتریموکسازول)، آمینوگلیکوزیدها، ریفامپین (ریفامپیسین) و فلوروکینولون‌ها. اثربخشی کم و عودهای مکرر پس از تک درمانی منجر به انتقال به یک برنامه درمانی ترکیبی در سال ۱۹۸۶ شد [۹]. در حال حاضر برنامه‌های درمانی توصیه‌شده توسط WHO [4] شامل ترکیب داکسی‌سایکلین و ریفامپین به مدت ۶ هفته یا ترکیب داکسی‌سایکلین (برای ۴۵ روز) و استرپتومایسین (برای ۲۱ روز) می‌گردد [۹ و۱۰]. تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول به‌تنهایی یا همراه با ریفامپین یا جنتامایسین برای معالجه زنان باردار یا بیمارانی که نسبت به تتراسایکلین‌ها عدم تحمل دارند مفید است. هم‌چنین ریفامپین با کوتریموکسازول برای درمان بیماری غیرپیچیده در کودکان توصیه شده است [۴]. با این حال، برنامه‌های ترکیبی نیز به‌دلیل ایجاد مقاومت در برابر آنتی بیوتیک‌ها، موفقیت کمتر از ۱۰۰ درصد دارند [۱۱].

بررسی‌های مختلفی در زمینه میزان آلودگی پنیرهای محلی به گونه‌های *بروسلا* و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها در مناطق مختلف جهان و ایران انجام شده است [۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸ و ۱۹]. تحقیق حاضر با هدف بررسی میزان آلودگی پنیرهای کوزه‌ای محلی عرضه‌شده در شهرستان ارومیه به گونه‌های *بروسلا* و ارزیابی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها صورت پذیرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جداسازی و شناسایی گونه‌های *بروسلا*

تعداد ۵۰ نمونه پنیر کوزه‌ای گاوی محلی به‌صورت تصادفی از لبنیاتی‌های مختلف سطح شهر ارومیه با رعایت شرایط سترون در سال ۱۴۰۱ جمع‌آوری و در مجاورت یخ به آزمایشگاه کنترل کیفی و بهداشتی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی انتقال داده شدند. نظر به ماهیت زئونوتیک *بروسلا*، آزمایش‌ها با رعایت الزامات ایمنی‌زیستی سطح دو انجام شدند [۲۰]. ابتدا ۱۰ گرم از نمونه‌های پنیر در ۹۰ میلی‌لیتر آبگوشت *بروسلا* (Qulab, Canada) در دستگاه استوماکر همگن شدند. سپس نمونه‌های همگن‌شده در بطری‌های سترون ریخته‌شده و در دمای ۳۷ درجه‌سلسیوس به‌مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه‌های هوازی و بی‌هوازی (با غلظت ۱۰ درصد دی‌اکسیدکربن) غنی‌سازی شدند. بعد از سپری شدن زمان گرمخانه‌گذاری، بطری‌ها همگن‌شده و بر روی آگار *بروسلا* (Qulab, Canada) که با ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفندی و مکمل انتخابی *بروسلا* FD005 محتوی پلی میکسین B (IU ۲۵۰۰)، باسیتراسین (IU ۱۲۵۰۰)، نیستاتین (IU ۵۰۰۰۰)، سیکلوهگزیمید (۵۰ mg)، نالیدیکسیک اسید (۲/۵ mg) و ونکومایسین (۱۰ mg) (Himedia, Mumbai, India) تکمیل‌شده بود؛ کشت‌خطی داده‌شدند. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه‌سلسیوس به‌مدت ۴۸ ساعت در شرایط هوازی و بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شدند. پلیت‌های دارای پرگنه‌های سفید تا خاکستری و غیر موکوئیدی به‌عنوان پلیت‌های مثبت احتمالی برای آزمایش‌های بیوشیمیایی در نظر گرفته‌شدند. برای شناسایی گونه‌ی *بروسلا*، آزمایش‌های رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز، تولید اندول، تولید سولفیدهیدروژن، اوره‌آز و رشد در حضور ۱۰ درصد دی‌اکسیدکربن انجام شدند [۲۱ و۲۲].

۲-۲- شناسایی جدایه‌ها با آنتی سرم‌های اختصاصی

برای انجام این آزمایش از آنتی‌سرم‌های اختصاصی *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی‌تنسیس* شرکت بهار افشان ایران استفاده شد. ابتدا روی یک اسلاید با زمینه سیاه یک قطره سالین سترون ریخته شد. سپس با استفاده از آنس حلقوی سترون یک پرگنه از کشت تازه جدایه‌ها در آگار خوندار برداشته و در سالین پراکنده شد. در ادامه

[1]. Orchitis
[2]. Prostatitis
[3]. Epididymo-orchitis
[4]. World health organization

یک قطره آنتی سرم اختصاصی به سوسپانسیون باکتریایی افزوده و اسلاید به آرامی تکان داده شد. مشاهده آگلوتیناسیون دلیل بر مثبت بودن واکنش و شناسایی باکتری مورد نظر بود.

۲-۳- شناسایی مولکولی جدایه‌ها با واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)

استخراج DNA جدایه‌ها با استفاده از کیت استخراج DNA به‌روش ستونی (FAST DNrich Bacteria Kit) (شرکت کیمیا طب گستر، ایران) انجام شد. شناسایی مولکولی *بروسلا آبورتوس* (بیووارهای ۱، ۲ و ۴) و *بروسلا ملی‌تنسیس* با استفاده از پرایمرهای ارایه شده توسط Amoupour و همکاران انجام شد[۲۳]. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نمایش‌داده شده است. پرایمرها در شرکت سیناژن ایران تولید شدند. مخلوط نهایی PCR برای هر جدایه شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط اصلی (بافر PCR، آنزیم Taq DNA polymerase، dNTPs و MgCl2)، ۲ میکرولیتر پرایمر، یک میکرولیتر DNA استخراج شده و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر ۲ بار تقطیر بود. میکروتیوب‌های محتوی مخلوط نهایی در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شده و طبق برنامه حرارتی و زمانی جدول ۲ واکنش PCR انجام شد. سپس محصولات PCR از نظر تکثیر یا عدم تکثیر ژن مورد نظر با الکتروفورز ژل آگارز بررسی شدند. برای این منظور، ابتدا ژل آگارز ۱/۵ درصد تهیه گردید. در چاهک اول ژل، ۳ میکرولیتر DNA Ladder 100 bp و در چاهک‌های بعدی به‌ترتیب ۵ میکرولیتر از محصولات PCR کنترل مثبت و جدایه‌ها با ۲ میکرولیتر از بافر لودینگ مخلوط و بارگذاری شدند. عمل الکتروفورز با ولتاژ ۱۰۰ ولت و به‌مدت یک ساعت انجام شد. سپس با استفاده از دستگاه ژل داکیومنتیشن و با تابش اشعه ماورا بنفش (UV) باندهای DNA مشاهده و ثبت گردیدند. در مرحله آخر اندازه محصول PCR با مقایسه موقعیت باند DNA تکثیر شده با اندازه باندهای مارکر تخمین زده شد [۷ و۲۳].

Table 1. Specific primer sequence used in PCR test for identification of *Brucella* spp.

Brucella spp	Primer name	Primer sequence	Product size	References
B. abortus (bv 1, 2 and 4)	Ba-sp	5 - GAC GAA CGG AAT TTT TCC AAT CCC- 3	498 bp	7, 23
	IS711-sp	5 - TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT- 3		
B. melitensis	Bm-sp	5 - AAA TCG CGT CCT TGC TGG TCT GA – 3	731 bp	7, 23
	IS711-sp	5 - TGC CGA TCA CTT AAG GGC CTT CAT- 3		

Table 2. Temperature and time program used for PCR test

Stage	Temperature	Time	Cycle number
Initial denaturation	95 ℃	5 min	1
Denaturation	95 ℃	30 sec	
Annealing	54 ℃	30 sec	40
Extension	72 ℃	30 sec	
Final extension	72 ℃	5 min	1

۲-۴- حساسیت ضدمیکروبی جدایه‌های *بروسلا*

حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *بروسلا* با روش انتشار دیسک کربی-بائر تعیین شد. ابتدا جدایه‌ها در آگار خوندار کشت‌داده شدند. سپس یک سوسپانسیون باکتریایی از پرگنه‌ها در سالین سترون تهیه شد. کدورت سوسپانسیون با کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند به‌صورت چشمی تنظیم شد. سپس سوسپانسیون باکتریایی با استفاده از یک سوآب سترون بر روی پلیت‌های آگار مولرهینتون تکمیل‌شده با ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفندی به‌صورت خطی و یکنواخت کشت‌داده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی آزیترومایسین (۱۵ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، آموکسی‌سیلین-کلاوولانیک‌اسید (۲۰-۱۰ میکروگرم)، ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول (۱/۲۳-۲۵/۷۵ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، داکسی‌سایکلین (۳۰ میکروگرم)، ریفامپین (۵ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم) و کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم) (پادتن طب، ایران) بر روی پلیت‌های تلقیح شده قرارداده شدند. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی براساس آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورداستفاده در درمان بروسلوز و آنتی‌بیوتیک‌های آزمایش‌شده در مقالات مختلف انتخاب شدند. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه‌سلسیوس به‌مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی‌هوازی با ۱۰ درصد دی‌اکسیدکربن گرمخانه‌گذاری شدند. سپس قطر منطقه مهاری رشد هر یک از آنتی‌بیوتیک‌ها اندازه‌گیری و با معیارهای مربوط به باکتری‌های کند رشد (گونه‌های *هموفیلوس*) موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی (CLSI)[1] مقایسه و نتایج به‌صورت حساس[2]، نیمه‌حساس[3] و مقاوم[4] ثبت شدند. آنتی‌بیوگرام جدایه‌ها در سه تکرار انجام شد. هم‌چنین جدایه‌هایی که به سه نوع آنتی‌بیوتیک و یا بیشتر مقاوم بودند؛ به‌صورت مقاوم به چند دارو یا MDR[5] تعریف شدند [۲۴، ۲۵ و ۲۶].

۳- نتایج و بحث

۱-۳- میزان آلودگی پنیرهای کوزه‌ای محلی شهرستان ارومیه به گونه‌های *بروسلا*

نتایج آزمایش‌های کشت میکروبی و PCR نشان داد که از ۵۰ نمونه مورد آزمایش، ۲ نمونه آلوده به *بروسلا* (۴ درصد) بودند. یک نمونه به *بروسلا آبورتوس* (۲ درصد) و نمونه دیگر، به *بروسلا ملی‌تنسیس* (۲ درصد) آلوده بودند (نمودار ۱ و شکل ۱).

مطالعه‌های متعددی در نقاط مختلف دنیا روی میزان آلودگی پنیرهای محلی به گونه‌های *بروسلا* صورت گرفته است؛ کارا و آکّایا [۲۷] آلودگی پنیرهای شهر افیون‌کاراحیسار ترکیه را به *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی تنسیس* بررسی نمودند. آلودگی گونه‌های *بروسلا* در پنیرهای تازه به‌میزان ۹ درصد (۲ درصد *بروسلا آبورتوس* و ۷ درصد *بروسلا ملی‌تنسیس*) و در پنیرهای افیون‌تولوم به‌میزان ۶ درصد (۲ درصد *بروسلا ملی‌تنسیس* و ۴ درصد *بروسلا آبورتوس*) تشخیص‌داده شد. فادیل و خلیل [۱۴] به بررسی گونه‌های *بروسلا* در پنیرهای محلی جیبین‌العرب شهر بعقوبه عراق پرداختند. برای جداسازی از روش کشت مرسوم استفاده شد. آلودگی به *بروسلا* به‌میزان ۱۲ درصد (۸ درصد *بروسلا ملی‌تنسیس* و ۴ درصد *بروسلا آبورتوس*) تشخیص داده شد.

در مناطق مختلف ایران هم بررسی‌هایی بر روی میزان آلودگی پنیرهای محلی به گونه‌های *بروسلا* انجام شده است. شاکریان [۲۸] از ۵۰ نمونه پنیر محلی مورد آزمایش در استان‌های اصفهان و چهارمحال بختیاری به‌روش مولکولی، آلودگی به *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی‌تنسیس* را ۲/۵ درصد گزارش کرد. در یک بررسی به‌روش کشت میکروبی، اکبرمهر [۱۵] آلودگی گونه‌های *بروسلا* در پنیرهای محلی عرضه‌شده در شهرستان سراب و حومه را ۲/۲ درصد گزارش کرد که ۷ نمونه آن (۰/۷ درصد) *بروسلا ملی‌تنسیس* و ۱۵ نمونه (۱/۵ درصد) *بروسلا آبورتوس* بودند. در بررسی دیگر که توسط عبدالی و همکاران [۱۹] بر روی فرآورده‌های شیر غیرپاستوریزه در استان شیراز به‌روش PCR صورت گرفت؛ در نمونه‌های پنیر و بستنی سنتی آلودگی به *بروسلا* مشاهده نشد. باطنی و صمدزاده [۲۹] نشان دادند که از ۱۴۰ نمونه پنیر سنتی مورد آزمایش در شهرستان زنجان به روش کشت میکروبی، ۲ نمونه (۱/۴ درصد) آلوده به *بروسلا* بودند. یک نمونه آلوده به *بروسلا ملی‌تنسیس* و نمونه دیگر آلوده به *بروسلا آبورتوس* بودند. در

[1] . Clinical and Laboratory Standards Inistitue (CLSI)
[2] . Susceptible
[3] . Intermediate
[4] . Resistant
[5] . Multi-Drug Resistant (MDR)

بررسی دیگر که توسط شاکریان و همکاران [۳۰] بر روی ۲۰۰ نمونه پنیر سفید غیرپاستوریزه گوسفندی در شهرکرد و حومه به روش کشت میکروبی صورت گرفت، تنها یک نمونه آلوده به *بروسلا ملی‌تنسیس* (۰/۵ درصد)تشخیص داده شد. در مطالعه دیگر یوسفی مشعوف [۳۱] میزان آلودگی به *بروسلا* در پنیرهای تازه محلی شهر همدان به‌روش کشت میکروبی را ۲/۴ درصد مشخص نمود. مسلمی و همکاران [۱۸] آلودگی پنیرهای غیر پاستوریزه عرضه‌شده در استان تهران را با روش PCR زمان واقعی ۳۹/۱ درصد گزارش کردند. در مطالعه‌ای دیگر معروف و همکاران [۱۷] آلودگی پنیرهای سنتی عرضه شده در استان آذربایجان شرقی به گونه‌های *بروسلا* را با روش PCR زمان واقعی ۲۲/۹۳ درصد گزارش نمودند.

در تحقیق حاضر آلودگی به *بروسلا* در پنیرهای کوزه‌ای محلی شهرستان ارومیه که یک نوع پنیر رسیده می باشد؛ تشخیص داده شد. نتایج مطالعه حاضر با یافته‌های محققین در ایران و سایر کشورها در زمینه آلودگی به *بروسلا* در پنیرهای محلی و غیرپاستوریزه مطابقت دارد. جداسازی و تشخیص *بروسلا* در پنیرهای کوزه‌ای محلی در شهرستان ارومیه دلالت بر وجود این باکتری در جمعیت‌های دامی این مناطق دارد. هم‌چنین می‌توان استنباط نمود که باکتری *بروسلا* می‌تواند در مراحل تهیه و نگه‌داری پنیر کوزه‌ای سنتی زنده بماند و نظر به دوز عفونی پایین *بروسلا*، امکان ایجاد بروسلوز از طریق مصرف این نوع پنیرها در منطقه وجود دارد. از طرفی، در تحقیق حاضر از پنیرهای کوزه‌ای گاوی، *بروسلا ملی‌تنسیس* جداسازی شد که این یافته در نتایج شفیعی و همکاران [۷] هم گزارش شده است و احتمالاً به‌دلیل پرورش نزدیک گله‌های گوسفند و بز با گله‌های گاو در منطقه، آلودگی به *بروسلا ملی‌تنسیس* در میزبان غیرترجیحی اتفاق افتاده‌است.

همان‌گونه که مشاهده شد میزان آلودگی به *بروسلا* در پنیرهای محلی و غیرپاستوریزه در مطالعات مختلف متفاوت می‌باشد. در مطالعاتی که از روش‌های مولکولی نظیر PCR زمان واقعی استفاده نمودند [۲۰ و۲۱] ؛ میزان‌های بالایی از آلودگی به‌دست آمده است که دلیل آن ارتباط دارد با این حقیقت که در روش‌های مولکولی، DNA باکتری‌های مرده و زنده تواماً شناسایی می‌گردد در حالی‌که در روش کشت میکروبی فقط باکتری‌های زنده جداسازی می‌گردند. هم‌چنین آلودگی به *بروسلا* هم در پنیرهای محلی تازه و هم در پنیرهای محلی رسیده گزارش شده که میزان آلودگی در پنیرهای محلی تازه بالاتر بوده است [۲۷]. بنابراین می‌توان استنباط نمود که مصرف پنیرهای محلی تازه غبرپاستوریزه می توانند مخاطره ابتلا به بروسلوز بالایی داشته باشند. از طرفی سایر عوامل از جمله حجم نمونه، عوامل میزبانی، موقعیت جغرافیایی، غربال‌گری دام‌های آلوده، انجام مایه‌کوبی بر علیه بروسلوز در دام‌ها، نحوه پرورش دام‌ها، حساسیت آزمون‌های مورد مطالعه و نحوه تولید پنیرهای سنتی می‌توانند در میزان آلودگی به *بروسلا* نقش داشته باشند [۲۸].

عامل اصلی آلودگی شیر به *بروسلا*، وقوع بیماری بروسلوز در گله‌های دامی است. باکتری *بروسلا* در گره‌های لنفاوی فوق‌پستانی دام‌های آلوده جایگزین و باعث آلودگی شیر می‌گردد. درصورتی‌که شیر دام‌های عفونی بدون سالم‌سازی حرارتی مصرف شوند و یا این‌که در تهیه فرآورده‌های شیر استفاده گردند؛ باعث ابتلای مصرف‌کنندگان به بیماری تب مالت خواهند شد. بنابراین مهمترین روش پیشگیری از وقوع بروسلوز در انسان، غربالگری گاوهای آلوده، مایه‌کوبی گله‌های گوسفند و بز، آموزش عشایر و روستائیان منطقه به مخاطرات و راه‌های انتقال بیماری و جلوگیری از عرضه و مصرف شیر و فرآورده‌های شیر غیرپاستوریزه بویژه در مناطق آلوده می باشد.

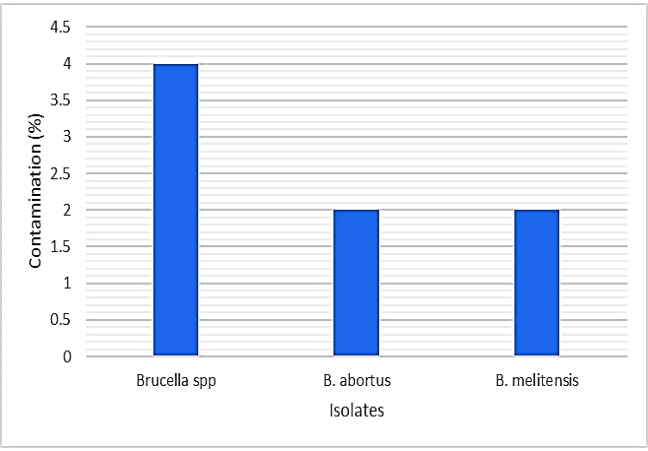

Fig 1. Contamination rate of *Brucella* isolates in local Kope cheeses of Urmia

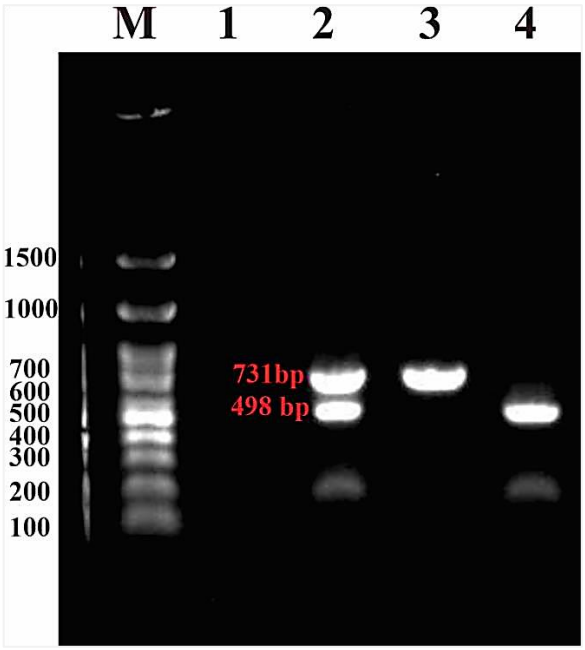

Fig 2. Electrophoresis of PCR products: lane M, DNA ladder 100 pb, lane 1: negative control, lane 2: positive control (band 731 bp for *Brucella melitensis* and band 498 bp for *Brucella abortus*), lane 3: positive sample of *B. melitensis*, lane 4: positive samples of *B. abortus*.

۲-۳- حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *بروسلا* از پنیرهای کوزه‌ای محلی شهرستان ارومیه

نتایج حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که جدایه‌های *بروسلا* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آزیترومایسن، ایمی‌پنم، داکسی‌سایکلین، ریفامپین، تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول حساس می‌باشند (جدول ۳). هم‌چنین جدایه‌های *بروسلا* در برابر آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، آموکسی‌سیلین-کلاوولانیک اسید، تتراسایکلین، جنتامایسین و سفتریاکسون مقاوم بودند (جدول ۳ و نمودار ۲). جدایه *بروسلا آبورتوس* در برابر سیپروفلوکساسین، حساس ولی جدایه *بروسلا ملی‌تنسیس* در برابر آن مقاوم بود (جدول ۳ و نمودار ۲). از طرفی جدایه‌ها ویژگی مقاوم به چند دارو یا MDR نشان دادند (جدول ۴ و نمودار ۲).

اخیراً افزایش مقاومت میکروبی به آنتی‌بیوتیک‌های رایج توجه زیادی را برای انتخاب گروه‌های جدید آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان بیماری‌های عفونی خاص به خود جلب کرده است. طبق گفته سازمان جهانی بهداشت (WHO)، فقط برخی از آنتی بیوتیک‌های محدود با کارایی بالینی و نفوذ داخل سلولی خوب در درمان بروسلوز مورداستفاده قرار می‌گیرند. آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی در این زمینه، داکسی‌سایکلین، ریفامپین، تری متوپریم-سولفامتوکسازول و استرپتومایسین می‌باشند. درمان‌های تک دارو با خطر عود بیماری همراه هستند؛ بنابراین درمان‌های ترکیبی توصیه می‌گردد.

داکسی‌سایکلین یک مشتق نیمه‌ساختگی از اکسی‌تتراسایکلین و بسیار محلول در چربی است. در نتیجه نفوذ داخل سلولی بالاتر و توزیع بافتی بهتر نسبت به سایر تتراسایکلین‌ها ایجاد می‌شود [۲۶]. داکسی‌سایکلین به‌عنوان یک داروی استاندارد طلایی توسط سازمان بهداشت جهانی (WHO) رتبه‌بندی شده است و به‌دلیل مشخصات فارماکوکینتیک برتر، به رایج‌ترین مشتق تتراسایکلین تجویزشده در درمان عفونت‌های *بروسلا* تبدیل‌شده است [۳۲]. اثر هم‌افزایی در ترکیب تتراسایکلین‌ها با استرپتومایسین یا ریفامپین بر روی ارگانیسم‌های داخل سلولی *بروسلا* دیده‌شده است [۲۶]. مطالعات انجام‌شده در کشورهای مختلف نشان داده‌اند که جدایه‌های *بروسلا* حساسیت خود را نسبت به داکسی‌سایکلین حفظ کرده‌اند [۲۶، ۳۲، ۳۳، ۳۴ و۳۵]. در تحقیق حاضر، جدایه‌های *بروسلا* هم راستا با این یافته‌ها، در برابر داکسی‌سایکلین حساس بودند.

ریفامپین که با نام ریفامپیسین نیز شناخته می‌شود. یک داروی ضدباکتری است که می‌تواند باکتری‌های داخل سلولی را با مهار سنتز RNA از بین ببرد. ریفامپین یک آنتی‌بیوتیک ضروری و موثر در درمان بروسلوز است و به‌طور گسترده برای درمان خط اول توصیه می‌شود. دارای اثرات باکتریواستاتیک یا باکتری‌کش با نفوذ درون سلولی ایده‌آل و هم افزایی آشکار همراه با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها است. بنابراین، چنین ترکیباتی توسط WHO برای مدیریت بروسلوز پیشنهاد شده است [۲۶]. ترکیبی از ریفامپین و داکسی‌سایکلین امروزه بهترین درمان خوراکی برای بروسلوز است

[۳۲]. در تحقیق کنونی، جدایه‌های *بروسلا* نسبت به ریفامپین حساس بودند. با این حال، در مطالعات مختلف درصدهایی از مقاومت جدایه‌های *بروسلا* نسبت به ریفامپین گزارش شده است [۲۶، ۳۲، ۳۳، ۳۴، ۳۵ و۳۶]. ظهور مقاومت در برابر ریفامپین می‌تواند باعث نگرانی در درمان بروسلوز گردد. مقاومت به ریفامپین را می‌توان با طرح‌های درمانی مشابه بروسلوز و سل در منطقه خاورمیانه توضیح داد. تعداد کمی از تحقیقات مبتنی بر مولکولی، اساس ژنتیکی کاهش حساسیت یا مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های خاص را ارزیابی کرده‌اند. جهش در ژن rpoB در *بروسلا ملی‌تنسیس* مقاوم به ریفامپین در چند مطالعه گزارش شده است. از طرفی، ترکیب ریفامپین و داکسی‌سایکلین ممکن است در بسیاری از کشورهای در حال توسعه، از جمله کشورهای خاورمیانه، مشکلاتی در درمان بیماری سل ایجاد کند[۲۶].

آمینوگلیکوزیدها ترکیبات باکتری‌کشی هستند که در سنتز پروتئین باکتریایی اختلال ایجاد می‌کنند. تنها سه مورد از این آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بروسلوز استفاده شده است که عبارتند از: استرپتومایسین، جنتامایسین و نتیلماسین. استرپتومایسین به‌عنوان یکی از موثرترین ترکیبات در درمان بروسلوز انسانی شناخته شده است ولی به‌تنهایی در درمان بروسلوز بی‌اثر است. با این حال، اثر هم افزایی ترکیب آن با تتراسایکلین‌ها به خوبی شناخته شده است. مطالعاتی که بر روی جدایه‌های حیوانی و انسانی *بروسلا* انجام شده است، ظهور جدایه‌های مقاوم به استرپتومایسین را گزارش کردند. جنتامایسین عملکردی مشابه استرپتومایسین دارد با این حال، سمیت کلیوی اغلب با جنتامایسین گزارش می‌شود. جنتامایسین به‌طور منظم در بیماران مبتلا به اندوکاردیت بروسلایی استفاده می‌گردد. گزارشاتی از مقاومت جدایه‌های انسانی و حیوانی *بروسلا* به جنتامایسن وجود دارد [۲۶، ۳۴ و۳۶]. در تحقیق حاضر، جدایه‌های *بروسلا* هم راستا با این گزارشات، در برابر جنتاماسین مقاوم بودند. این یافته شاید به دلیل استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی به‌تنهایی و یا در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام در دامپزشکی باشد.

کوتریموکسازول ترکیبی از تری‌متوپریم و سولفامتوکسازول به نسبت ۱:۵ است. هر دو ترکیب با قطع سنتز پورین باکتریایی اما در سطوح مختلف عمل می‌کنند. تری‌متوپریم یک داروی ضد باکتری است اما زمانی که با سولفامتوکسازول ترکیب شود؛ موثرتر است. بنابراین، ترکیب تری‌متوپریم–سولفامتوکسازول اثرات هم‌افزایی بر روی باکتری‌های داخل سلولی نشان می‌دهد و برای درمان بروسلوز توصیه می‌گردد. این دارو باید در ترکیب با ریفامپین در کودکان زیر ۸ سال و زنان باردار و همراه با داکسی‌سایکلین و ریفامپین در درمان اندوکاردیت ناشی از *بروسلا* استفاده شود [۲۶]. در تحقیق حاضر، مطابق با یافته‌های پارلاک و همکاران [۳۲] و المیان و همکاران [۳۳] جدایه‌های *بروسلا* در برابر تری‌متوپریم– سولفامتوکسازول حساس بودند. با این حال، گزارشاتی در مورد جدایه‌های انسانی وجود دارد که کاهش حساسیت به تری‌متوپریم–سولفامتوکسازول را نشان دادند [۲۶، ۳۵ و ۳۶].

سیپروفلوکساسین و افلوکساسین کینولون‌های اصلی و مورد استفاده در درمان بروسلوز هستند [۳۲]. فلوروکینولون‌ها گروهی از آنتی‌بیوتیک‌های باکتری‌کش با طیف وسیع هستند که با سنتز DNA باکتریایی تداخل می‌کنند. فعالیت آن‌ها بر علیه *بروسلا ملی‌تنسیس* در شرایط آزمایشگاهی گزارش شده است. با این حال، آن‌ها به‌عنوان تک درمان علیه بروسلوز فعال کارآمد نیستند. فلوروکینولون‌ها با شکست و عودهای درمانی غیرقابل قبول بسیار، ایجاد مقاومت و عدم ایجاد هم‌افزایی در شرایط آزمایشگاهی با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها همراه هستند. اثربخشی سیپروفلوکساسین در درمان بروسلوز مورد بحث می‌باشد. در تعدادی از مطالعات، مقاومت *بروسلا ملی‌تنسیس* نسبت به سیپروفلوکساسین گزارش شده است [۲۶ و ۳۶]. در تحقیق حاضر، جدایه *بروسلا ملی‌تنسیس* هم راستا با این گزارشات در برابر سیپروفلوکساسین مقاوم بود؛ ولی جدایه *بروسلا آبورتوس* در برابر آن حساس بود.

سفالوسپورین‌ها به‌ویژه گروه نسل سوم، اثربخشی گسترده‌ای در برابر ارگانیسم‌های گرم منفی با مهار سنتز موکوپپتید دیواره سلولی باکتری دارند. اگرچه گزارش شده است که سفتریاکسون در شرایط آزمایشگاهی بر علیه *بروسلا* موثر می‌باشد [۳۳] ولی شیوع بالای شکست درمان در بیماران مبتلا به بروسلوز فعال وجود دارد. هم‌چنین کاهش حساسیت به سفتریاکسون در موارد بروسلوز انسانی از کشورهای مختلف گزارش شده است [۲۶ و۳۶]. در تحقیق حاضر جدایه‌های *بروسلا* در برابر سفتریاکسون مقاوم بودند. هم‌چنین مقاومت به آمپی‌سیلین–سولباکتام و پنی‌سیلین از جدایه‌های انسانی *بروسلا* گزارش شده است [۲۶ و۳۵]. در تحقیق کنونی جدایه‌های *بروسلا* در برابر آمپی‌سیلین و آموکسی‌سلین–کلاوولانیک اسید مقاوم بودند. این یافته را می‌توان به استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام و سفالوسپرین‌ها در درمان موارد ورم پستان در گله‌های شیری نسبت داد.

کارباپنم‌ها گروهی از آنتی‌بیوتیک‌ها متعلق به رده بتالاکتام هستند. دارای طیف وسیعی از فعالیت هستند. کارباپنم‌ها با میل ترکیبی بالا به پروتئین‌های متصل شونده به پنی‌سیلین با وزن مولکولی بالا، اتصال می‌یابند و باعث لیز باکتریایی می‌شوند. اثربخشی آن‌ها با سمیت پایین و بروز مقاومت پایین تکمیل می‌شود. ایمی‌پنم با مجوز برای استفاده در بریتانیا در سال ۱۹۸۸، اولین کارباپنم بود که به طور گسترده در دسترس قرار گرفت [۳۷] . گزارشی از وقوع مقاومت جدایه‌های حیوانی *بروسلا* نسبت به ایمی پنم از مصر وجود دارد [۳۸]. هم‌چنین در یک بررسی در کشور هند جدایه‌های حیوانی *بروسلا* در برابر ایمی پنم حساس بودند [۳۹]. در تحقیق حاضر، جدایه‌های *بروسلا* در برابر ایمی‌پنم حساس بودند. بنابراین تفاوت‌های منطقه‌ای در مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های *بروسلا* دیده می‌شود.

آزیترومایسین یکی از ماکرولیدهایی است که با توزیع سریع پس از مصرف خوراکی و با غلظت‌های بالاتر در داخل سلول‌ها به‌ویژه فاگوسیت‌ها شناخته می‌شود [۲۶]. این آنتی‌بیوتیک در ترکیب با ریفامپین در موارد بروسلوز به‌ویژه در دوران بارداری می‌تواند استفاده شود. در بسیاری از مطالعات، آزیترومایسین به‌عنوان یک آنتی‌بیوتیک موثر در برابر سویه‌های *بروسلا* شناخته شده است [۳۲]. مطالعه‌ای در اسپانیا تفاوت جزئی در حساسیت *بروسلا ملی‌تنسیس* به آزیترومایسین و تتراسایکلین را نشان داد که بیانگر نقش درمانی امیدوارکننده آزیترومایسین در بروسلوز انسانی است. با این حال، در مطالعات بر روی جدایه‌های انسانی و حیوانی *بروسلا* مقاومت به آزیترومایسین نیز گزارش شده است [۲۶]. در تحقیق حاضر، جدایه‌های *بروسلا* در برابر آزیترومایسین حساس بودند. این یافته را می‌توان به استفاده کمتر آنتی‌بیوتیک‌های ماکرولیدی در دامپزشکی به‌ویژه در گله‌های شیری نسبت داد.

ظهور مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها یک مسئله بهداشت عمومی در سطح جهانی است و گزینه‌های درمانی را در مورد اثربخشی آنتی‌بیوتیک‌ها و کنترل عفونت‌های باکتریایی به خطر می‌اندازد. انتشار گسترده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها به‌دلیل استفاده نامناسب و کنترل‌نشده از آنتی بیوتیک‌ها در دامپزشکی و پزشکی در کشورهای در حال توسعه می‌باشد [۳۸]. گزارش‌هایی از ظهور سویه‌های *بروسلا* با مقاومت چند دارویی وجود دارد [۳۵، ۳۶، ۳۸ و۳۹]. در تحقیق حاضر جدایه‌های *بروسلا* ویژگی مقاومت به چند دارو را نشان دادند. ظهور و گسترش سویه‌های *بروسلا* با مقاومت چند دارو می‌تواند تهدید جدی برای انسان باشد. زیرا ممکن است وضعیت مراقبت‌های بیمارستانی را نامناسب و گزینه‌های درمانی در محیط‌های بهداشت عمومی را محدود کند.

Table 3. Antibiotic susceptibility profile of *Brucella* isolates in local Kpoe cheeses of Urmia

Antibiotic	***Brucella* spp (N=2)**			***B. abortus* (N=1)**			***B. melitensis* (N=1)**		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Ampicillin (AM)	00 (00%)	00 (00%)	02 (100%)	00 (00%)	00 (00%)	01 (100%)	00 (00%)	00 (00%)	01 (100%)
Amoxicillin-clavulanic acid (AMC)	00 (00%)	00 (00%)	02 (100%)	00 (00%)	00 (00%)	01 (100%)	00 (00%)	00 (00%)	01 (100%)
Azithromycin (AZM)	02 (100%)	00 (00%)	00 (00%)	01 (100%)	00 (00%)	00 (00%)	01 (100%)	00 (00%)	00 (00%)
Ceftriaxone (CRO)	00 (00%)	00 (00%)	02 (100%)	00 (00%)	00 (00%)	01 (100%)	00 (00%)	00 (00%)	01 (100%)
Ciprofloxacin (CP)	01 (50%)	00 (00%)	01 (50%)	01 (100%)	00 (00%)	00 (00%)	00 (00%)	00 (00%)	01 (100%)
Chloramphenicol (C)	00 (00%)	00 (00%)	02 (100%)	00 (00%)	00 (00%)	01 (100%)	00 (00%)	00 (00%)	01 (100%)
Co-trimoxazole (SXT)	02 (100%)	00 (00%)	00 (00%)	01 (100%)	00 (00%)	00 (00%)	01 (100%)	00 (00%)	00 (00%)
Doxycycline (D)	02 (100%)	00 (00%)	00 (00%)	01 (100%)	00 (00%)	00 (00%)	01 (100%)	00 (00%)	00 (00%)
Gentamycin (G)	00 (00%)	00 (00%)	02 (100%)	00 (00%)	00 (00%)	01 (100%)	00 (00%)	00 (00%)	01 (100%)
Imipenem (IPM)	02 (100%)	00 (00%)	00 (00%)	01 (100%)	00 (00%)	00 (00%)	01 (100%)	00 (00%)	00 (00%)
Rifampin (RA)	02 (100%)	00 (00%)	00 (00%)	01 (100%)	00 (00%)	00 (00%)	01 (100%)	00 (00%)	00 (00%)
Tetracycline (TE)	00 (00%)	00 (00%)	02 (100%)	00 (00%)	00 (00%)	01 (100%)	00 (00%)	00 (00%)	01 (100%)

N: number; S: susceptible; I: intermediate; R: resistant

Table 4. Antibiotic resistance pattern and frequency of multi-drug resistant strains in *Brucella* isolates of Urmia local Kope cheeses

Isolates	Antibiotic resistance							MDR
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	
Brucella spp (N=2)	00 (00%)	00 (00%)	00 (00%)	00 (00%)	00 (00%)	00 (00%)	02 (100%)	02 (100%)
B. abortus (N=1)	00 (00%)	00 (00%)	00 (00%)	00 (00%)	00 (00%)	01 (100%)	00 (00%)	01 (100%)
B. melitensis (N=1)	00 (00%)	00 (00%)	00 (00%)	00 (00%)	00 (00%)	00 (00%)	01 (00%)	01 (100%)

N: number; R1: resistance to one; R2: resistance to two; R3: resistance to three; R4: resistance to four; R5: resistance to five; R6: resistance to six; R7: resistance to seven; MDR: multi-drug resistance (resistance to three or more antibiotics)

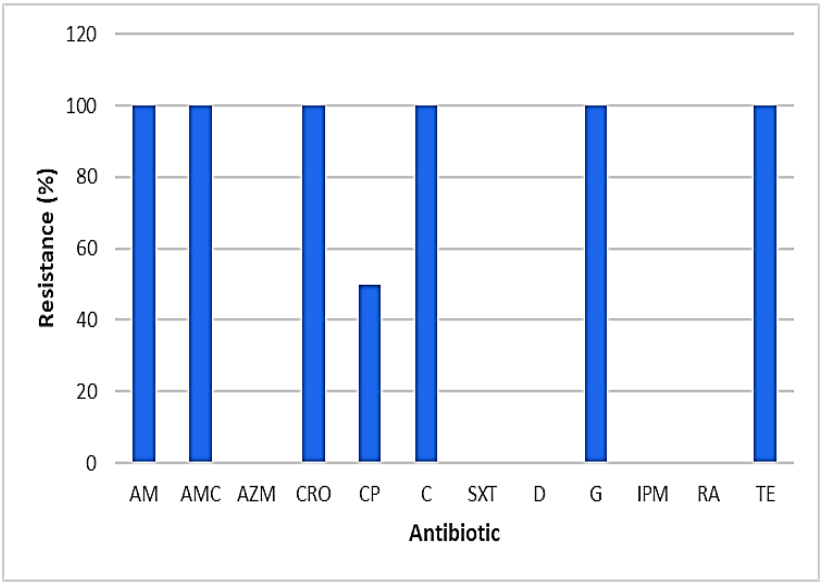

Fig 2. Antibiotic reistance frequency of *Brucella* isolates in local Kope cheeses of Urmia

۴- نتیجه‌گیری

این بررسی نشان داد اگرچه نمونه‌های پنیر کوزه ای محلی شهرستان ارومیه آلودگی کمتری به *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی‌تنسیس* دارند؛ ولی نظر به بیماریزایی بالای گونه‌های *بروسلا* برای انسان، اقدامات پیشگیرانه در منطقه باید از سوی مراجع ذی‌صلاح انجام گردد. پیشنهاد می‌گردد برنامه‌های ریشه‌کنی بیماری بروسلوز از قبیل غربالگری گاوهای آلوده، مایه‌کوبی کامل گله‌های گوسفند و بز در منطقه انجام گردد. کارگاه‌های کوچک تولید فرآورده‌های لبنی سنتی در منطقه به دستگاه‌های پاستوریزه کننده تجهیز گردند. هم‌چنین به عشایر و روستائیان منطقه در زمینه مخاطرات و راه‌های انتقال بیماری تب مالت آموزش‌های لازم داده شود. از طرفی، با توجه به حساسیت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های آزیترومایسن و ایمی‌پنم پیشنهاد می‌گردد این آنتی‌بیوتیک ها در برنامه‌های درمانی بروسلوز در کنار آنتی بیوتیک های رایج ارزیابی گردند.

۵- سپاسگزاری

مقاله پژوهشی حاضر مستخرج از پایان‌نامه دکتری عمومی دامپزشکی می‌باشد و نویسندگان مقاله بدین وسیله از حمایت‌های مادی و معنوی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه و مسئول محترم آزمایشگاه کنترل کیفی و بهداشتی مواد غذایی جناب مهندس باقری تشکر و قدردانی می نمایند.

۶- منابع

[1] Edalatian, M.R., Habibi- Najafi, M.B., Mortazavi, S.A., Alegría, A., Nassiri, M.R., Bassami, M.R., *et al*. (2012). Microbial diversity of the traditional Iranian cheeses Lighvan and Koozeh, as revealed by polyphasic culturing and culture-independent approaches. *Dairy Science and Technology*, 92: 75–90.

[2] Iran National Standards Organization (INSO). (2022). Crumbled kope cheese- Specifications and test methods. 1st edition, INSO No. 23175. [In Persian]

[3] Abbasinejad, B., Neyriz-Nagadehi, M. and Taher Talatappeh, N. (2015). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* in Koozeh cheeses of Urmia retails. *Journal of Food Hygiene*, 5(17): 27-35. [In Persian]

[4] Theron, J. and Thantsha, M.S. (2014). In: Batt, C. A. and Tortorello, L.M. (Editors), Encyclpedia of Food Microbiology. Academic press, pp. 332-336.

[5] Erkmen, O. and Bozoglu, T.F. (2016). Food Microbiology Principles into Practice. Volume1: Microorganisms Related to Foods, Foodborne

Diseases, and Food Spoilage. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 139-141.
[6] Doosti, A. and Moshkelani, S. (2011). The First Prevalence Report of Direct Identification and Differentiation of *B.abortus* and *B. melitensis* using Real Time PCR in House Mouse of Iran. *International Scholarly and Scientific Research & Innovation*, 5(2): 36-39.
[7] Shafeie, B., Ahmadi, M. and Dastmalchi Saei, H. (2012). Diagnosis of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in the Milk of Cattle and Sheep in Kordestan Province by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Veterinary Microbiology*, 8(2): 127-135. [In Persian]
[8] Yousefi-Nooraie, R., Mortaz-Hejri, S., Mehrani, M., Sadeghipour, P. (2012). Antibiotics for treating human brucellosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 10: CD007179.
[9] Saltoglu, N., Tasova, Y., Inal, A.S., Seki, T. and Aksu, H.S. (2002). Efficacy of rifampicin plus doxycycline versus rifampicin plus quinolone in the treatment of brucellosis. *Saudi Medical Journal*, *23*(8): 921–924.
[10] Geyik, M.F., Gur, A, Nas, K., Cevik, R., Saraç, J., Dikici, B., *et al*. (2002). Musculoskeletal involvement of brucellosis in different age groups: a study of 195 cases. *Swiss Medical Weekly*, 132(7-8): 98–105.
[11] Ariza, J., Gudiol, F., Pallares, R., Viladrich, P.F., Rufi, G., Corredoira, J. and Miravitlles, M.R. (1992). Treatment of human brucellosis with Doxycycline plus Rifampin or Doxycycline plus streptomycin - a randomized, double-blind-study. *Annals of Internal Medicine*, 117(1): 25–30.
[12] Pamuk, Ş and Gurler, Z. (2014). Detection of Prevence and contamination level of *Brucella* spp. in local cheese produced in Afyonkarahisar, Turkey. *Kocatepe Veterinary Journal*, 7(1): 1-10.
[13] Béjaoui, A., Abdallah, I.B. and Maaroufi, A. (2022). *Brucella* spp. contamination in artisanal unpasteurized dairy products: an emerging foodborne threat in Tunisia. *Foods*, 11(15): 2269.
[14] Fadihl, S.J. and Khalil, I.I. (2016). Investigation of *Burcella* spp. from locally produced cheeses in Baquba city- Iraq. *Diyala Journal for Pure Scienc*, 12(4): 83-90.
[15] Akbarmehr, J. (2011). The prevalence of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in local cheese produced in Sarab city, Iran and its public health implication. *African Journal of Microbiology Research*. 5(12): 1500-1503.
[16] Yaran, M., Najafi, S., Shoaei, P., Ataei, B., Fadaei Nobari, R., Ramazanpour, J., Farsi, M., *et al*. (2016). Prevalence of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* in raw milk and dairy product by real time PCR technique. *The Ulutas Medical Journal*, 2(1):7-11.
[17] Marouf, A.S., Hanifian, S. and 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.
[18] Moslemi, E., Soltandalal, M.M., Beheshtizadeh, M.R., Taghavi, A., Kheiri Manjili, H., Mahmoudi Lamouki, R., *et al*. (2018). Detection of *Brucella* spp. in dairy products by real-time PCR. *Archives of Clinical Infectious Diseases*, 13(1): e12673.
[19] Abdali, F., Hosseinzadeh, S., Berizi, E. and Pourmontaseri, M. (2020). Prevalence of *Brucella* species in unpasteurized dairy products consumed in Shiraz province using PCR assay. *Molecular Biology Research Communications*, 9(3): 117–121.
[20] Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (ISIRI), (2016). Microbiology of food and animal feeding stuffs –General requirements and guidance for microbiological examinations. 1st edition, ISIRI No. 9899. [In Persian]
[21] Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (ISIRI), (2020). Microbiology of Food Chain-Complete Method for Isolation and Identification of *Brucella* spp. 1st edition, ISIRI No. 19153. [In Persian].
[22] Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B. and Carter, G.R. (1999). Clinical Veterinary Microbiology. Elsevier Limited, pp. 261-268.
[23] Amoupour, M., Nezamzadeh, F., Bialvaei, A. Z., Sedighi, M., Jazi, F. M., Alikhani, M. Y. and Mirnejad, R. (2019). Differentiation of *Brucella abortus* and *B. melitensis* biovars using PCR-RFLP and REP-PCR. *New Microbe and New Infections*, 32: 100589
[24] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 28 ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA
[25] Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., *et al*. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology Infection*, 18: 268–281.
[26] Wareth, G., Dadar, M., Ali, H., Hamdy, M.E.R., Al-Talhy, A.M., Elkharsawi, A.R. *et al*. (2022). The perspective of antibiotic therapeutic challenges of brucellosis in the Middle East and North African countries: Current situation and therapeutic management. *Transboundary and Emerging Disease*, 69: e1253‑e1268.
[27] Kara, R. and Akkaya, L. (2013). Investigation of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* at cheeses

in Afyonkarahisar, Turkey. *British Journal of Dairy sciences*, 3(1): 5–8.
[28] Shakerian, A. (2015). Study of contamination rate in raw milk and its traditional products with *Brucella abortus*, and *Brucella mellitensis* in Isfahan and Chaharmahal and Bakhtiari Provinces, 2012. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*, 17(1): 16-23. [In Persian]
[29] Bateni, J. and Samadzadeh, R. (2001). Prevalence Of *Brucella* and *Escherichia coli* in traditional cheese and fresh milk in Zanjan- Iran. *Journal of Advances in Medical and Biomedical Research*, 9(35) :58-65. [In Persian]
[30] Shakerian, A., Karim, G., Sharifzadeh, A. and Sadeghy, M. (2005). The survey on the contamination of ewe's fresh white cheese non pasteurized with *Brucella melitensis*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in Shahr-e-Kord, Iran. *Journal of Comparative Pathobiology*, 2(8): 275-282. [In Persian]
[31] Yousefi Mashouf, R. (2001). *Brucella* and Coliforms organisms in fresh cheese produced in Hamadan, Iran. *Journal of Research in Medical Sciences*, 6(4): 348-349. [In Persian]
[32] Parlak, M., Güdücüoğlu, H., Bayram, Y., Çıkman, A., Aypak, C., Kılıç, S., *et al*. (2013). Identification and determination of antibiotic susceptibilities of *Brucella* strains isolated from patients in Van, Turkey by conventional and molecular methods. *International Journal of Medical Sciences*, 10(10):1406-1411.
[33] Alamian, S., Dadar, M., Etemadi, A., Afshar, D. and Alamian, M.M. (2019). Antimicrobial susceptibility of *Brucella* spp. isolated from Iranian patients during 2016 to 2018. *Iranian Journal of Microbiology*, 11(5): 363–367.
[34] Shevtsov, A., Syzdykov, M., Kuznetsov, A., Shustov, A., Shevtsova, E., Berdimuratova, K., *et al* (2017). Antimicrobial susceptibility of *Brucella melitensis* in Kazakhstan. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 6(1):130.
[35] Elbehiry, A., Aldubaib, M., Al Rugaie, Q., Marzouk, E., Abaalkhail, M., Moussa, I., *et al*. (2022). Proteomics-based screening and antibiotic resistance assessment of clinical and sub-clinical *Brucella* species: An evolution of brucellosis infection control. *PLoS* One, 17(1): e0262551.
[36] Alwan, N., Saleh, M., Beydoun, E., Barbour, E., Ghosn, N. and Harakeh, S. (2010). Resistance of *Brucella abortus* isolated from Lebanese dairy-based food products against commonly used antimicrobials. Dairy Science and Technology. 90: 579–588.
[37] Steven J. Edwards, S.J., , Emmas, C.E. and Campbell, H.E. (2005). Systematic review comparing meropenem with imipenem plus cilastatin in the treatment of severe infections. *Current Medical Research and Opinion*, 21(5): 785-794.
[38] Singh, B.R., Singh, K.P., Singh, S.V., Agrawal, R.K. and Agri, H. (2019). Antimicrobial susceptibility pattern of *Brucella* isolates from abortion cases in animals in northern India. *Austin Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry*, 6(3): 1062.
[39] Khan, A.U., Shell, W.S., Melzer, F., Sayour, A.E., Ramadan, E.S., Elschner, M.C., *et al*. (2019). Identification, genotyping and antimicrobial susceptibility testing of *Brucella* spp. isolated from livestock in Egypt. *Microorganisms*, 7 (12): 603.

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

The contamination of local crumbled Kope cheeses distributed in Urmia-Iran with *Brucella* species and evaluation of the antibiotic-resistant pattern of isolates

Brucella in Urmia local Kope cheeses and antibiotic resistance

Sama Gholamali[1], Moslem Neyriz Naghadehi[2*], Mohammad Reza Asgharzadeh[3]

[1] Graduated in Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.

[2] Assistant Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.

[3] Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Science, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.

ABSTRACT

Brucellosis is a momentous zoonotic disease. Unpasteurized milk and milk products are the leading sources of *Brucella* transmission to humans. The present research was conducted to investigate the contamination of local crumbled Kope cheeses distributed in Urmia city with *Brucella* species and evaluate the antibiotic-resistance pattern of the isolates. Fifty samples of local cow's Kope cheese were randomly collected from traditional dairy retailers in different regions of Urmia by sterile conditions in 2022. The samples were cultured in *Brucella* enrichment broth and then in *Brucella* selective agar with a supplement. Molecular identification of *Brucella* spp. was done using specific primers by polymerase chain reaction (PCR). Antimicrobial susceptibility testing on the isolates was performed by the Kirby-Bauer disc diffusion method. Among the tested samples, two samples were contaminated with *Brucella* (4%). One was contaminated with *B. abortus* bv. 1, 2, and 4 (2%), and the other with *B. melitensis* (2%). The isolates were sensitive to azithromycin, imipenem, doxycycline, rifampin, and co-trimoxazole antibiotics and were resistant to ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, tetracycline, gentamicin, and ceftriaxone antibiotics. Also, the *B. abortus* strain was sensitive to ciprofloxacin, but the *B. melitensis* strain was resistant. The isolates showed multi-drug resistance (MDR) characteristics. From the findings, it can be concluded that *Brucella* contamination in local Kope cheeses distributed in Urmia city is low; However, due to the high pathogenicity of *B. melitensis* for humans, it is recommended to screen infected cows, vaccinate sheep and goat herds, and prevent the supply of unpasteurized milk and milk products. It is also recommended to evaluate azithromycin and imipenem antibiotics along with other common antibiotics in brucellosis.

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 2023/5/8
Accepted: 2023/9/11

Keywords:

Antibiotic resistance,

Brucella species,

Contamination,

Local crumbled Kope cheese.

DOI: 10.22034/FSCT.20.144.169
DOR:20.1001.1.20088787.1402.20.144.10.4

*Corresponding Author E-Mail:
mnn.uiau@yahoo.com