بررسی امکان شناسایی هلیکوباکتر پیلوری از شیر گوسفند و بز روستاهای اطراف مشهد به روش کشت و PCR

محمد همتی[۱*]، الهه بینش[۲]، مهرانگیز خواجه‌کرم‌الدینی[۳]، سعید زیبایی[۴]

خلاصه

سابقه و هدف: هلیکوباکتر پیلوری شایع‌ترین عفونت گوارشی دنیا می‌باشد. بعضی از پژوهشگران آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری در چوپان‌ها را با تماس آنها با گوسفند مرتبط می‌دانند. با این وجود در تحقیقی دیگر که بر روی ۴۴۰ نمونه شیر گوسفند انجام گرفت پژوهشگران نتوانستند هلیکوباکتر پیلوری را جدا نمایند. نظر به نتایج متناقض، هنوز انتقال هلیکوباکتر پیلوری از شیر نشخوارکنندگان کوچک به انسان و احتمال زئونوز بودن بیماری (بیماری مشترک انسان و دام) به اثبات نرسیده است و تحقیقات در این مورد ادامه دارد. شناخت راه‌های انتقال این باکتری به انسان، به عنوان شایع‌ترین عفونت گوارشی، برای شناسایی راه‌های پیشگیری و درمان ضروری است.

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۰۰ نمونه شیر (شامل ۸۱ نمونه شیر گوسفند و ۱۹ نمونه شیر بز) از ۲۰ روستای اطراف مشهد به صورت نمونه‌گیری خوشه‌ای تصادفی طی دو سال در فصل شیرواری جمع‌آوری گردید. پرسشنامه‌ای در خصوص وضعیت چوپان و خانواده از نظر وجود ناراحتی‌های گوارشی، تنظیم، تایید و پر گردید. تمامی نمونه‌های شیر بر روی دو نوع محیط ویژه هلیکوباکتر پیلوری یکی به نام HPSPA (Helicobacter pylori Special Peptone Agar) و دیگری محیط کلمبیا آگار (Merck) حاوی خون بدون فیبرین گوسفند، سرم جنین گاو، آنتی‌بیوتیک‌های وانکومایسین، آمفوتریسین B، بتاسیکلودکسترین، تری‌متوپریم، پلی‌میکسین B کشت و در شرایط مناسب انکوبه شد. مراحل استخراج DNA بعد از سانتریفوژ روی رسوب همه‌ی شیرها انجام گردید. ژن اوره‌آز C ویژه هلیکوباکتر پیلوری با روش ملکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ردیابی شد.

نتایج: نتایج آزمون‌های جداسازی و آزمایش PCR برای تمامی شیرها منفی بود و هیچ یک از دو روش کشت و PCR نتوانست وجود هلیکوباکتر پیلوری یا ژن اوره‌آز C که برای هلیکوباکتر پیلوری ویژه است را در نمونه‌های اخذ شده به اثبات برساند. اطلاعات پرسش‌نامه نشان داد که ۲۰ درصد از چوپانان و ۲۵ درصد از خانواده‌های آنان و نیز در ۱۰ درصد موارد چوپان به همراه خانوادهاشان به نوعی از ناراحتی‌های گوارشی گلایه دارند ولی با توجه به اینکه این امر موضوع پژوهش‌های جداگانه‌ای بود میزان ارتباط این ناراحتی‌ها با هلیکوباکتر پیلوری مشخص نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که هیچ یک از دو روش کشت و PCR نتوانست وجود هلیکوباکتر پیلوری یا ژن اوره‌آز C (ویژه هلیکوباکتر پیلوری) را به اثبات برساند. احتمالا در چرخه‌ی زندگی این باکتری عوامل فراوانی نقش دارند که شناخت آنها برای تعیین راهبرد پیشگیری و درمان ضروری خواهد بود. اما در خصوص انتقال بیماری از نشخوارکنندگان کوچک و شیر آنها به انسان هنوز مطالب پیچیده زیادی وجود دارد که به پژوهش‌های بیشتری نیاز دارد.

واژگان کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، شیر گوسفند، PCR، کشت

۱- استادیار پژوهشی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه مشهد

۲- کارشناس میکروبیولوژی موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی شعبه مشهد

۳- استاد گروه پاتوبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۴- استادیار پژوهشی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه مشهد

* نویسنده مسوول: محمد همتی

آدرس: مشهد، خ احمدآباد، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه مشهد، گروه تولید واکسن‌های هوازی

پست الکترونیک: m_hemmaty@yahoo.com

تلفن: ۰۹۱۵ ۱۰۵ ۵۵۸۳

دورنویس: ۰۵۱۱ ۸۴۲۰۴۳۰

تاریخ دریافت: ۸۷/۳/۲۹

تاریخ پذیرش نهایی: ۸۷/۸/۱۱

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری یک پاتوژن انسانی است. سطح مخاط معده انسان زیستگاه اصلی این باکتری می‌باشد [۱]. هلیکوباکتر پیلوری عامل یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی جهان می‌باشد که بیش از نیمی از بالغین را آلوده می‌کند. آلودگی با هلیکوباکتر پیلوری منجر به تظاهرات بالینی متفاوتی از گاستریت خفیف تا زخم‌های گوارشی شدید و حتی سرطان معده می‌گردد [۲]. اینکه از چه زمانی و چگونه هلیکوباکتر پیلوری وارد جمعیت انسانی شده است اطلاعی در دست نیست [۳]. نخستین بار در سال ۱۸۹۳ پژوهشگری به نام Bizzozero متوجه باکتری‌های مارپیچی در لایه پوششی مخاط معده سگ و گربه شد [۴]. احتمالا اغلب عفونت‌های هلیکوباکتر در سگ‌ها و گربه‌ها بدون علایم هستند [۵]. از آنجایی که گونه‌های هلیکوباکتر از معده حیوانات مختلف (راسوها، پریمات‌ها، سگ‌ها، گربه‌ها و یوزپلنگ وحشی) کشت و جداسازی شده است و به علاوه هلیکوباکترهای معدی، تعداد زیادی گونه‌های هلیکوباکتر از قسمت تحتانی دستگاه گوارشی پستانداران و پرندگان نیز جدا شده‌اند [۶]، لزوم مطالعه بیشتر روی مخازن حیوانی را محرز می‌نماید. در مطالعه‌ای در سال ۱۹۹۹ جهت بررسی و جستجوی مخزن حیوانی هلیکوباکتر پیلوری، سطح موکوسی معده اسب، گاو، خوک، خرگوش و طیور آزمایش شدند و هیچ مورد مثبتی در میان خرگوش‌ها و طیور مشاهده نشد ولی موارد مثبت زیادی در سایر حیوانات یعنی اسب، گاو و خوک دیده شد. به علاوه با روش PCR، وجود DNA ویژه‌ی این باکتری در مدفوع گاو تایید شد [۷]. با جداسازی هلیکوباکتر پیلوری از شیر پاستوریزه نشده گوسفند این احتمال داده شد که ممکن است شیر پاستوریزه نشده گوسفند یک چرخه‌ی انتقال واسطه برای عفونت هلیکوباکتر پیلوری باشد. پژوهشگران احتمال می‌دهند که این باکتری در گوسفند هم‌زیست بوده، و گوسفند به عنوان میزبان نهایی مطرح باشد [۳]. همچنین چرخه‌ی آلودگی هلیکوباکتر پیلوری ممکن است، تحت شرایطی مشخص در محیط زیست، حیوانات مختلف (گوسفند، سگ، گربه، میمون، خوک، اسب و گاو) و زیستگاه انسانی باشد [۸، ۹]. هزینه‌های تشخیص و درمان این باکتری بسیار بالا است و هنوز راه انتقال قطعی آن مشخص نشده است. میزان آلودگی و عفونت ناشی از این باکتری در دام هنوز به خوبی معلوم نیست و آسیب‌های احتمالی آن در دام و یا انتقال آن به انسان مورد پرسش است [۵]. اثبات چنین مواردی می‌تواند بسیار راه‌گشا بوده و راه‌کارهای مفیدی را در زمینه‌ی پیشگیری و قطع مسیرهای انتقالی در دسترس قرار دهد. با وجود اینکه در خصوص جداسازی و تعیین میزان آلودگی به این باکتری در بیمارستان‌های ایران پژوهش‌های مناسبی انجام گرفته است اما پژوهشی در مورد آلودگی حیوانات به این باکتری انجام نشده است، برای نخستین بار سعی در تعیین آلودگی شیر گوسفند و بز با هلیکوباکتر پیلوری گردید و نتایج حاصله با روش ملکولی PCR مورد تایید قرار گرفت. این پژوهش در مناطق مختلف دنیا انجام شده و نتایج متفاوتی داشته است. در بعضی مناطق چون ساردینیا آلودگی بالا با هلیکوباکتر و در بعضی مناطق دیگر نظیر ترکیه عدم آلودگی با این باکتری گزارش شده است.

مواد و روش‌ها

۱- **پرکردن پرسش‌نامه و نمونه‌گیری:** با استفاده از روش نمونه‌گیری خوشه‌ای تصادفی ۲۰ روستای اطراف مشهد انتخاب شد و به صورت تصادفی یک گله از روستا برگزیده شد. برای ردیابی نمونه‌ها و جهت بررسی اولیه میزان ارتباط آلودگی چوپانان با ناراحتی‌های گوارشی احتمالی در چوپان یا اعضای خانواده او، پرسش‌نامه‌ی زیر نظر متخصصین امر طراحی و تایید شد. پرسش‌نامه در محل نمونه‌گیری از گله توسط کارشناس آموزش‌دیده از چوپان پرسیده و پر گردید. تعداد پنج نمونه شیر گوسفند و یا بز به روش کاملا تصادفی از هر گله اخذ شد. در مجموع تعداد ۱۰۰ نمونه شیر گوسفند و بز (شامل ۸۱ نمونه شیر گوسفند و ۱۹ نمونه شیر بز) تهیه شد. نمونه‌ها پس از ضدعفونی کردن سرپستانک توسط پنبه الکل و با رعایت کامل شرایط نمونه‌برداری اخذ گردید و در لوله‌های درپیچ‌دار استریل حاوی محیط ترانسپورت استوارت جمع‌آوری و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل شد. به علت محدودیت زمانی در شیرواری گوسفندان، نمونه‌گیری تنها در ماه‌های اردیبهشت و خرداد در دو سال متوالی انجام گرفت.

۲- **جداسازی:** برای کشت از دو محیط ویژه برای کشت هلیکوباکتر استفاده گردید.

الف - کلمبیا آگار (Merck) حاوی خون بدون فیبرین گوسفند، سرم جنین گاو، آنتی‌بیوتیک‌های انکومایسین (10 mg/l) (Sigma)، آمفوتریسین B (5 mg/l) (ACS Chemical)، بتاسیکلودکسترین (100mg/l) (Merck)، تری‌متوپریم (Sigma) (10 mg/l)، پلی‌میکسین B (Merck) (2500Iu/l).

ب - محیط اختصاصی کشت هلیکوباکترپیلوری به نام (Helicobacter pylori Special Peptone Agar) HPSPA واجد اسید پیرویک ۰/۵ گرم بر لیتر

برای انجام مطالعه، نمونه‌های شیر در محیط ترانسپورت اخذ شد و پس از انتقال به آزمایشگاه روی محیط‌های کلمبیا آگار

و HPSPA کشت گردید و در شرایط میکروآئروفیلیک در جار واجد گازپک Merck) C) در شرایط مرطوب و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. جهت بررسی وجود پرگنه‌های مشکوک و تهیه‌ی گسترش، پلیت‌های کشت شده هر سه روز یک بار به مدت دو هفته مورد بازدید قرار گرفتند. جهت راه‌اندازی و به عنوان کنترل محیط‌های کشت و روش آزمایش، نخست ۳۰ نمونه بیوپسی به روش آندوسکوپی از معده بیماران مراجعه‌کننده به درمانگاه ویژه بیمارستان قائم مشهد تهیه شد و با استفاده از هر دو محیط اختصاصی هلیکوباکتر کشت و جداسازی انجام شد و از صحت مواد و روش کار اطمینان حاصل گردید.

۳- آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR):

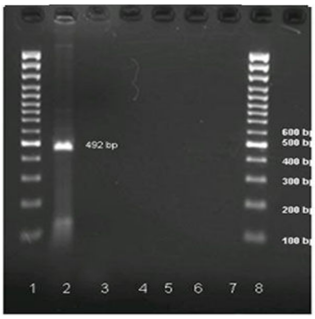
۳-۱- استخراج DNA (DNA extraction): مراحل استخراج طبق دستور کار شرکت سیناژن [۱۰] به طور اندک به قرار زیر می‌باشد: پس از سانتریفوژ (۵۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه) هم حجم رسوب نمونه‌ها به آن فنل اضافه شد. مرحله‌ی آبی آن با پیپت پاستور برداشته شد و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. این عمل دوباره تکرار گردید. در مرحله‌ی بعد همین عمل با ترکیب فنل ـ کلروفرم ـ ایزوآمیل الکل صورت پذیرفت. در مراحل آخر نخست با اتانل ۹۶ درجه و سپس با اتانل ۷۰ درجه آب‌گیری گردید و آنگاه DNA خشک شد. خلوص DNA با استفاده از اسپکتروفتومتر (Nano Drop, USA) در طول موج ۲۶۰ و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد.

۳-۲- تکثیر DNA (Amplification): جهت تکثیر از کیت هلیکوباکترپیلوری ساخت شرکت سیناژن استفاده گردید. این شرکت برای تکثیر قطعه ویژه‌ی ۴۹۲ زوج بازی از ژنUrease C باکتری، پرایمرها را طراحی نموده است. تکثیر مطابق دستور کار کیت انجام گرفت. به طور خلاصه نخست به هر لوله ۲۰میکرولیتر از PCR Mix (1x) (واجد Mgcl2, dNTPs و پرایمرها) به اضافه ۰/۴ میکرولیتر Taq-DNA Polymerase اضافه گردید. سپس روی هر نمونه یک قطره (۲۵-۲۰ میکرولیتر) روغن معدنی اضافه شد، به مقدار ۵ میکرولیتر DNA کنترل به لوله کنترل مثبت و همین مقدار آب دوبار تقطیر استریل به لوله‌ی کنترل منفی و ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده در مرحله قبل به سایر لوله‌ها افزوده شد. پس از سانتریفوژ کوتاه (۵-۳ ثانیه) لوله‌ها به دستگاه ترموسایکلر (TECHNE, Techne Ltd, USA) منتقل شدند. نخست پنج سیکل به صورت ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه،۵۰ درجه به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد و سپس ۳۰ سیکل در دستگاه به صورت ۹۴ درجه به مدت ۲۰ ثانیه،۵۰ درجه به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه برنامه‌ریزی و انجام گردید.

۳-۳- قرائت آزمایش PCR: مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR به طور مستقیم و بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد واجد ۱ درصد اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردید. حضور قطعه‌ی ۴۹۲ زوج بازی از ژن Urase C در کنترل مثبت دلالت بر صحت شرایط آزمایش داشت.

نتایج

نتایج حاصل از کشت نمونه‌های آندوسکوپی اخذ شده از بیماران در بیمارستان قائم مشهد که جهت راه‌اندازی و به عنوان کنترل محیط‌های کشت و روش آزمایش انجام گردید، نشان داد که با استفاده از هر دو نوع محیط (کلمبیا آگار همراه افزودنی‌های لازم و نیز HPSPA) می‌توان باکتری هلیکوباکترپیلوری را جدا نمود. پرگنه‌های هلیکوباکتر پیلوری بر روی این محیط‌ها نمایان شده و در عرض سه روز به اندازه طبیعی خود رسید. نتایج حاصل از مورفولوژی کلنی، رنگ‌آمیزی و مشاهده آن و نیز آزمون‌های بیوشیمیایی حضور هلیکوباکتر پیلوری را تایید کردند. نتایج حاصل از بررسی پرسش‌نامه نشان داد که ۲۰ درصد از چوپانان (۴ مورد) و ۲۵ درصد از خانواده چوپانان (۵ مورد) و نیز در ۱۰ درصد چوپان به همراه خانواده‌اش (دو مورد) به نحوی از مشکلات گوارشی گلایه دارند ولی با توجه به اینکه این امر موضوع پژوهش‌های جداگانه‌ای بود میزان ارتباط این ناراحتی‌ها با هلیکوباکترپیلوری مشخص نشد. نتایج حاصل از کشت نمونه‌های شیر نشان داد که از هیچ یک از ۱۰۰ نمونه کشت شده هلیکوباکتر پیلوری جدا نگردید. در نتایج PCR نمونه‌های شیر نیز هیچ باندی مشاهده نگردید و از نظر وجود ژنوم اختصاصی هلیکوباکتر پیلوری منفی تلقی گردید. نتایج حاصل از کشت نمونه‌های مثبت و نیز نتایج حاصله از PCR نمونه‌ی مثبت موجود در کیت (مشاهده باند ۴۹۰ bp) نتایج به دست آمده را تایید می‌نماید.



شکل ۱- نتایج حاصل PCR تعدادی از نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. شماره‌های ۱ و ۸: مارکر ۱۰۰bp، شماره ۲: کنترل مثبت ۴۹۲ bp شماره‌های ۳، ۴، ۵، ۶: نمونه‌هایی که پس از PCR جواب منفی داشته‌اند، شماره ۷: کنترل منفی

بحث

در این پژوهش هیچ یک از نمونه‌های شیر مورد آزمایش از نظر وجود باکتری هلیکوباکترپیلوری مثبت ارزیابی نگردید. نتایج این تحقیق با نتایج Turutoglu و Mudul (۲۰۰۲) که در ترکیه بر روی ۴۴۰ نمونه شیر گوسفند گرفته شد هم‌خوانی دارد. این پژوهشگران نیز نتوانستند وجود هلیکوباکتر پیلوری را در شیر گوسفند تایید نمایند [۱۱]. با این وجود شواهدی وجود دارد که هلیکوباکتر پیلوری ممکن است در گوسفند هم‌زیست بوده و گوسفند به عنوان میزبان نهایی مطرح باشد. اما اینکه در چه زمانی و تحت چه شرایطی هلیکوباکتر پیلوری توانسته وارد جمعیت انسانی شود هنوز مشخص نشده است [۱۲]. در پژوهشی که توسط Dore و همکارانش در شمال ساردینیا انجام شد ۵۱ نمونه شیر خام جمع‌آوری و جهت تایید هلیکوباکتر پیلوری از روش PCR با استفاده از تکثیر و شناسائی ژن 16SrRNA استفاده گردید. در این مطالعه ۶۰/۳ درصد از نمونه‌های شیر با روش PCR مثبت گزارش گردید ولی به روش کشت، تنها یک مورد از نمونه‌های شیر هلیکوباکتر پیلوری تشخیص داده شد [۸]. از دست‌آورد سایر پژوهشگران برمی‌آید که باکتری هلیکوباکتر پیلوری می‌تواند از شیر جدا گردد اما به دلیل اینکه باکتری به اکسیژن و شرایط محیطی بسیار حساس است امکان جداسازی آن از شیر بسیار کم می‌باشد [۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵]. جهت تایید حضور باکتری در شیر می‌توان ناحیه ویژه ژنوم باکتری را با استفاده از روش PCR تکثیر و جهت شناسایی به کار برد. برای اختلاف نتایج این مطالعه با تحقیق در ساردینیا می‌توان به مواردی توجه داشت:

۱- ژن هدف در آزمون PCR: در مطالعه حاضر از منطقه‌ای ویژه از ژن اوره‌آز جهت تهیه پرایمر استفاده شده است در حالی که در تحقیق Dore و همکارانش از ژن 16SrRNA استفاده شده است. بنابراین نواحی متفاوتی از ژنوم در آزمون PCR مورد تکثیر قرار گرفته است. با توجه به اینکه ناحیه مورد استفاده در این مطالعه ویژه است و نیز در مورد نمونه‌های مثبت به خوبی پاسخ داده است، بنابراین می‌توان گفت که احتمال حضور باکتری در شیرهایی که کار شده بسیار کم است.

۲- منطقه متفاوت جغرافیایی: با توجه به اینکه نتایج حاصل از کشت باکتری در ترکیه وجود باکتری را در شیر تایید نمی‌کند که با نتایج حاصل از کشت در این تحقیق هم‌خوانی دارد این احتمال قوی‌تر است که شرایط منطقه‌ای ایران را نزدیک به ترکیه بدانیم. اما چون باکتری حساس است اگر نتایج مطالعه در ترکیه نیز با آزمون PCR تایید شده بود در نتیجه‌گیری بهتر کمک می‌کرد.

۳- سایر زنجیره‌های اپیدمیولوژیک: مانند آداب و رسوم اجتماعی در رابطه با راه‌های برخورد افراد با یکدیگر و با محیط اطراف و ارتباط آن با میزان آلودگی، آلودگی‌های شغلی در انسان و بالاخره آلودگی‌های محیطی و سایر حیوانات که همگی ممکن است در زنجیره‌ی حیات باکتری موثر باشند و تحقیقات کاملی در این نواحی صورت نپذیرفته است.

نتیجه‌گیری

در پایان، با توجه به نتایج متفاوتی که در بعضی از نقاط دنیا به دست آمده و وسعت آلودگی انسانی در منطقه، چنین به نظر می‌رسد که میکروب می‌تواند چرخه‌های زندگی متفاوتی را در مناطق مختلف داشته باشد اگرچه برای رسیدن به چنین نظریه‌ای می‌بایست تعداد نمونه‌ی بیشتری در یک منطقه با استفاده از آزمون‌های مولکولی مورد بررسی قرار گیرد و سایر زنجیره‌های اپیدمیولوژیک مانند آداب و رسوم اجتماعی در رابطه با طرق برخورد افراد با یکدیگر و با محیط اطراف و ارتباط آن با میزان آلودگی، آلودگی‌های شغلی در انسان و بالاخره آلودگی‌های محیطی و سایر حیوانات نیز مورد توجه و بررسی قرار گیرد. برای رسیدن به چنین مسیرهایی می‌بایست نخست بیماران مراجعه‌کننده پس از تایید آزمایشگاهی بیماری، پرسش‌نامه‌هایی در رابطه با شرایط اقتصادی، چگونگی ارتباط با دام و نحوه‌ی مصرف فرآورده‌های دامی، شرایط اقلیمی، شغل، ارتباطات خانوادگی (مانند چگونگی ارتباط مادر با فرزند و همسر و ...)، عادات تغذیه‌ای، میزان حضور حشرات، جوندگان و پرندگان در محیط زندگی و ... تکمیل کنند و پس از تایید ارتباط آماری هر یک از گزینه‌ها به ردیابی آزمایشگاهی (اعم از جداسازی، روش‌های ملکولی، سرولوژی و ...) باکتری پرداخته شود. چه بسا نتایج چنین تحقیقاتی روشن‌کننده‌ی مسیرهای جدیدی در انتقال این جرم بین افراد، محیط و حیوانات باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی برای حمایت مالی از این مطالعه تحت طرح مصوب شماره ۰۵-۰۰۰۰۳۳۰۰۰۴۰-۸۰ صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین نویسندگان بر خود فرض می‌دانند که از همکاری آزمایشگاه میکروب‌شناسی درمانگاه ویژه بیمارستان قائم مشهد و اداره‌ی کل دام‌پزشکی استان خراسان رضوی و شبکه دام‌پزشکی مشهد و کارکنان بخش تشخیص موسسه رازی مشهد تشکر و قدردانی نمایند.

References:

[1] Graham DY, Evans DG, Evans DJ Jr. Campylobacter pylori, the organism and its clinical relevance. ***J Clin Gastroenterol*** 1989;11(1):S43-8.
[2] Go MF. Natural history and epidemiology of Helicobacter pylori infection. ***Aliment Pharmacol Ther*** 2002;16(1):3-15.
[3] Dore MP, Sepulveda AR, Osato MS, Realdi G, Graham DY. Helicobacter pylori in sheep milk. ***Lancet*** 1999;354(9173):132.
[4] Goodwin CS, McCulloch RK, Armstrong JA, Wee SH. Unusual cellular fatty acids and distinctive ultra structure in a new spiral bacterium (Campylobacter pyloridis) from the human gastric mucosa. ***J Med Microbiol*** 1985;19(2):257-67.
[5] Ettinger SJ, Feldman EC, editors. Textbook of veterinary internal medicine : diseases of the dog and cat. 5th ed. Philadelphia: Saunders; 2000.
[6] Hirsh D C, Zee YC, editors. Veterinary Microbiology: 2th ed. Malden, Mass. : Blackwell Science, 1999.
[7] Sasaki K, Tajiri Y, Sata M, Fujii Y, Matsubara F, Zhao M, et al. Helicobacter pylori in the natural environment. ***Scand J Infect Dis*** 1999; 31(3): 275-79.
[8] Dore MP, Bilotta M, Vaira D, Manca A, Massarelli G, Leandro G, et al. High prevalence of Helicobacter pylori infection in shepherds. ***Dig Dis Sci*** 1999;44(6):1161-4.
[9] Dimola S, Caruso ML. Helicobacter pylori in animals affecting the human habitat through the food chain. ***Anticancer Res*** 1999;19(5B):3889-94.
[10] Shah Hoseini MH, Seid Reza Tehrani SM. Polimerase Chain Reaction(PCR) Cinnagen. 1th ed. Tehran: Parcian; 2001. p. 100-130.
[11] Turutoglu H, Mudul S. Investigation of Helicobacter pylori in raw sheep milk samples. ***J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*** 2002;49(6):308-9.
[12] Dore MP, Sepulveda AR, El-Zimaity H, Yamaoka Y, Osato MS, Mototsugu K, et al. Helicobacter pylori from sheep: Implications for transmission to humans. ***A J Gastroentrol*** 2001;96(5):1396-401.
[13] Fann XG, Chua A, Li TG, Zeng QS. Survival of Helicobacter pylori in milk and top water. ***J Gastroenterol*** 1998;13(11):1096-98.
[14] Stevenson TH, Bauer N, Lucia LM, Acuff GR. Attempts to isolate Helicobacter from cattle and survival of Helicobacter pylori in beef products***.*** ***J Food Prot*** 2000;63(2):174-8.
[15] Fujimura S, Kawamura T, Kato S, Tateno H, Watanabe A. Detection of Helicobacter pylori in cow's milk. ***Letters in Applied Microbiology*** 2002;35(6):504.