تعیین هلیکوباکتر پیلوری در آب، شیر گاو، پنیر و بستنی سنتی به دو روش کشت سطحی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

الهه کاظمی خیرآبادی[۱]، ابراهیم رحیمی[۲*]، امیر شاکریان[۲]

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد،ایران
[۲] دانشیار گروه بهداشت و صنایع مواد غذایی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد،ایران
[۳] دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد،ایران
[۴] کارشناس مرکز تحقیقات مواد غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد،ایران

تاریخ دریافت: ۲۴ / ۹۰/۶ تاریخ پذیرش: ۹۰ /۹/۲۵

چکیده

عفونت حاصل از هلیکوباکتر پیلوری یکی از شایع‌ترین عفونت‌ها در سراسر جهان است. با این حال، منشا و انتقال این باکتری به وضوح شناخته نشده است. یکی از نظریه‌های پیشنهادی، انتقال آن از طریق شیر خام حیوانات به انسان است. بنابراین، مطالعه‌ی حاضر با هدف تعیین هلیکوباکتر پیلوری در آب آشامیدنی لوله کشی، شیر گاو، پنیر و بستنی سنتی انجام شد. از خرداد ماه ۱۳۸۹ تا خرداد ماه ۱۳۹۰، در مجموع ۱۸۲ نمونه آب آشامیدنی لوله کشی (n=۴۰) ، شیر خام گاو(n=۷۰)، پنیر سنتی (n=۴۷) و بستنی سنتی (n=۲۵) به صورت تصادفی از شهرهای شهرکرد و شیراز تهیه و جهت تعیین هلیکوباکتر پیلوری توسط روش‌های کشت سطحی و واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) مورد ارزیابی قرار گرفت. از ۷۰ نمونه شیر گاو مورد بررسی هلیکوباکترپیلوری تنها از یک نمونه جداسازی شد، در حالی که از نمونه‌های آب، پنیر و بستنی سنتی جدا نشد. از مجموع ۱۸۲نمونه مورد مطالعه ۱۶ نمونه (۸/۸ درصد) از نظر حضور ژن ureC مثبت بود. به طور کلی، ۲ نمونه از مجموع ۴۰ نمونه آب لوله کشی (۵ درصد)، ۷ نمونه از ۷۰ نمونه شیر گاو (۱۰درصد)، ۶ نمونه از ۴۷ نمونه پنیر سنتی(۱۲/۸درصد) و ۱ نمونه از ۲۵ بستنی سنتی (۴ درصد) مثبت بود. نتایج این مطالعه لزوم تحقیقات بیش‌تری بر روی منبع آلوده کننده نمونه‌های شیر و آب را نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: آب، شیرخام گاو، هلیکوباکتر پیلوری، بستنی، پنیرسنتی.

* مسوول مکاتبه: ebrahimrahimi55@yahoo.com

۱- مقدمه

هلیکوباکترپیلوری، یک باکتری گرم منفی است که در مخاط معده‌ی انسان کلونیزه می‌شود. عفونت حاصل از این میکرو ارگانیسم بسیار معمول است و شاید بیش از نیمی از جمعیت انسانی به آن آلوده باشند. میزان آلودگی به این میکروارگانیسم در کشورهای صنعتی ۵۰ درصد و در کشورهای در حال توسعه بالاتر و نزدیک ۹۰درصد است(۴و۱۹). مطالعات نشان می‌دهد اکثر موارد ابتلا به عفونت قبل از سن ده سالگی رخ داده است (۱۹و۲۵). هلیکوباکترپیلوری مسوول چندین عامل بیماری از جمله زخم معده و سرطان معده است(۹). با وجود شیوع بالای عفونت این باکتری راه‌های انتقال آن به انسان هنوز به روشنی مشخص نشده است. اگرچه تحقیقات زیادی در این زمینه انجام شده است ومتداول‌ترین راه انتقال آن دهانی- مدفوع است(۱۴و۲۸). معده‌ی انسان، مناسب‌ترین محیط برای رشد هلیکوباکتر پیلوری محسوب می شود. مهم‌ترین عوامل خطرزا برای عفونت هلیکوباکترپیلوری عبارت است از پایین بودن سطح بهداشت، فقدان آب آشامیدنی بهداشتی و مواد غذایی غیربهداشتی است (۲۲). عفونت‌های حاصل از هلیکوباکتر پیلوری عمدتاً از طریق انتقال مستقیم انسان به انسان یا آلودگی محیط صورت می گیرد، اگرچه گزارش‌هایی از انتقال آلودگی از طریق مواد غذایی و آب وجود دارد(۱۴). مطالعات اخیر، زئونوز بودن هلیکوباکترپیلوری را مورد توجه قرار داده و بیان می‌دارد اگر چه این باکتری قادر به رشد در غذا نیست ولی مواد غذایی احتمالاً به عنوان یک حامل غیر فعال درانتقال هلیکو باکتر پیلوری در انسان نقش بازی می کند (۲، ۶، ۱۲، ۲۸). در این میان، شیر و فرآورده‌های آن به عنوان یکی از مهم‌ترین گروه‌های مواد غذایی در تغذیه‌ی انسان از اهمیت ویژه ای برخوردار اند و برخی از مطالعات اخیر حاکی از آن است که این گروه می تواند به عنوان یکی از حاملین این ارگانیسم به حساب آید(۱۰، ۱۲، ۲۶). حداقل دوز عفونی این باکتری در انسان کاملاً مشخص نشده است اما احتمالاً حداقل ۱۰۵ واحد تشکیل دهنده پرگنه از این باکتری جهت ایجاد یک عفونت نیاز است (۱۵).

مطالعاتی محدودی در خصوص ارزیابی حضور هلیکوباکتر پیلوری در آب و مواد غذایی از جمله شیر گاو، گوسفند و بز در ایران (۱۲) و سایر کشورها (۱۰، ۱۱، ۱۶، ۲۶) فرضیه‌ی انتقال این پاتوژن را از طریق آب و مواد غذایی تقویت نموده است. لذا با توجه به اهمیت هلیکوباکتر پیلوری در سلامت انسان، این مطالعه با هدف بررسی وتعیین میزان آلودگی هلیکوباکتر پیلوری در آب لوله کشی، شیر گاو، پنیر و بستنی سنتی در شهرهای شهرکرد و شیراز به روش کشت سطحی و واکنش زنجیره ای پلی مراز انجام شد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- جمع آوری نمونه‌ها

از خرداد ماه ۱۳۸۹ تا خرداد ماه ۱۳۹۰، در مجموع ۱۸۲ نمونه شامل آب آشامیدنی لوله کشی (n=۴۰) از مناطق مختلف شهرستان‌های شیراز و شهرکرد و شیر خام گاو(n=۷۰)، پنیر سنتی (n=۴۷) و بستنی سنتی (n=۲۵) ، به صورت تصادفی ساده از مراکز عرضه‌ی فرآورده‌های لبنی در شهرکرد و شیراز تهیه شد (جدول ۱) و جهت تعیین هلیکوباکتر پیلوری توسط روش‌های کشت سطحی و واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) مورد ارزیابی قرارگرفت. تعداد نمونه‌های مورد مطالعه با توجه به تفاوت در مصرف فرآورده‌های لبنی سنتی و دسترسی راحت‌تر به این محصولات انتخاب شد. نمونه‌ها ی آب به میزان یک لیتر و سایر نمونه‌های لبنی به میزان ۵۰۰ گرم در ظروف استریل جمع آوری در شرایط یخچالی در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شدند.

۲-۲- جداسازی هلیکو با کتر پیلوری به روش کشت

نمونه‌های شیر و سوسپانسیون تهیه شده از نمونه‌های پنیر و بستنی سنتی به طور سطحی بر روی محیط بروسلا آگار (MO74 شرکت HIMEDIA) غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گوساله (RM-112 شرکت HIMEDIA) و ۵ درصد خون دفیبرینه شده گوسفند، ۱۰ میکروگرم / میلی لیترتری متو پریم،۶ میکروگرم / میلی‌لیتر سفکسیم و ۵ میکروگرم / میلی لیتر وانکومایسین (Merck)کشت داده شدند و به مدت ۵-۳ روز در محیط ۳۷ درجه‌ی سانتیگراد در گرمخانه‌ی Co_2 دار تحت شرایط میکرو آئروفیلیک (۱۰ درصد Co_2، ۵ درصد O_2 و ۸۵ درصد N_2)گرم خانه گذاری شدند. در ادامه، پرگنه‌های مشکوک به هلیکوباکترپیلوری با استفاده از رنگ آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی شامل کاتالاز، اکسیداز، اوره‌آز بررسی و مورد تائید قرار گرفتند(۲۶).

۲-۳- استخراج DNA و ردیابی هلیکوباکتر پیلوری به روش PCR

ردیابی هلیکوباکتر پیلوری از نمونه‌های مورد بررسی به روش PCR مطابق روش تشریح شده به وسیله‌ی Lage وهمکاران (۱۹۹۵) انجام شد(۱۵).جهت استخراج DNA ازکیت استخراج DNA (Genomic DNA Purification kit-Fermentas)و مطابق دستورالعمل سازنده اقدام شد. کمیت و کیفیت DNAاستخراج شده به دو روش اسپکترومتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر و الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱٪ مورد ارزیابی قرار گرفت. DNAهای استخراج شده تا زمان انجام PCR در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتیگراد نگه داری شدند. پرایمر استفاده شده جهت تشخیص H. pylori مربوط به ژن ureCبود. توالی پرایمرهای مورد مطالعه عبارتند از: HP-F:5'-AAGCTTTTAGGGGTGTTAGGGGTTT-3' و HP-R:5'-AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC-3' که محصولی برابر ۲۹۴ جفت باز تکثیر می‌کنند. برای انجام PCR غلظت بهینه مواد به کار رفته در واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به صورت ۵ میکرولیتر DNA الگو، ۰/۵ میلی مولار کلرید منیزیم، ۱میکرومول از هر پرایمر، ۰/۵ واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq، و ۲۰۰ میکرومولار مخلوط dNTP تعیین گردید. سپس، حجم فوق الذکر در درون دستگاه‌ترموسایکلر (Eppendorf Co. Germany) قرار داده شد و برنامه‌ی دمایی به صورت زیر تنظیم گردید: ۹۴ درجه‌ی سانتیگراد ۴ دقیقه،۳۰ چرخه‌ی دمایی به‌ترتیب ۹۴ درجه‌ی سانتیگراد ۱ دقیقه،۵۶ درجه‌ی سانتیگراد ۱ دقیقه،۷۲ درجه‌ی سانتیگراد ۱ دقیقه،و یک مرحله‌ی نهایی ۷۲ درجه‌ی سانتیگراد ۵ دقیقه. محصول PCR به دست آمده در ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز گردید و با نور UV مورد مشاهده و بررسی قرار گرفت.

۳- نتایج و بحث

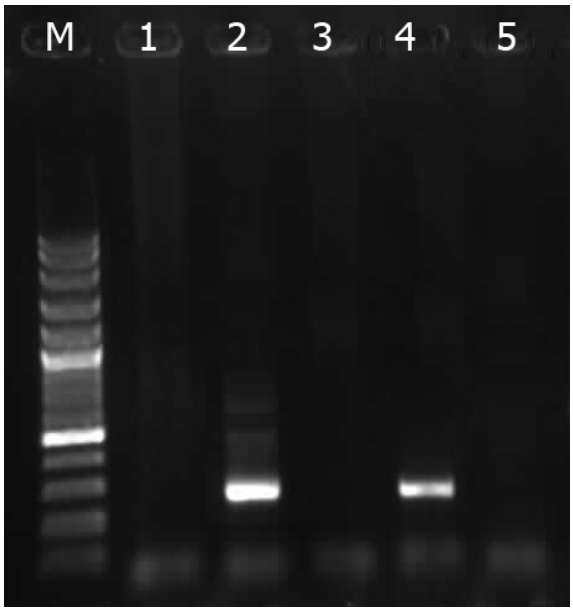
مطالعه حاضر با هدف بررسی وضعیت آلودگی آب لوله کشی، شیر خام گاو، پنیرهای سنتی و بستنی‌های سنتی عرضه شده در شهرستان‌های شهرکرد و شیراز به هلیکوباکتر پیلوری اجرا شد. نتایج آزمون‌های میکروبیولوژی نشان داد تنها ۱ نمونه (۰/۵۵ درصد) از مجموع ۱۸۲ نمونه مورد مطالعه حامل هلیکوباکترپیلوری بوده است (تصویر شماره‌ی ۱). نمونه‌ی مثبت مربوط به شیر خام عرضه شده در سطح شهر بود، در حالی که هیچ یک از نمونه‌های آب، پنیر و بستنی‌های سنتی از نظر آلودگی به هلیکوباکترپیلوری مثبت نبوده‌اند.

تمام نمونه‌های آب، شیر، پنیر و بستنی علاوه بر بررسی میکروبیولوژیکی از نظر هلیکوباکترپیلوری به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نیز بررسی شدند. نتایج این بخش از مطالعه نشان داد که ۱۶ نمونه (۸/۸ درصد) از مجموع ۱۸۲ نمونه ی مورد آزمایش حامل هلیکوباکترپیلوری یا DNA آن بوده است. نتایج این بخش از مطالعه به طور خلاصه در جدول ۱ آورده شده است.

نتایج مطالعه‌ی حاضر، نشان داد ۵ درصد نمونه‌های آب مورد مطالعه حامل DNA *هلیکوباکتر پیلوری* بوده است. مطالعات نیز اثبات کرد که *H. pylori* قادر است برای دوره‌ی زمانی کوتاه و در یک بازه‌ی دمایی در آب باقی بماند و قابل ردیابی است(۱، ۵،۳، ۲۴،۱۸). هر چند که بالا رفتن دما منتج به کاهش و از دست رفتن توانایی کشت باکتری می‌شود (۳).

بررسی‌ها نشان می‌دهد *هلیکوباکتر پیلوری* قادر است تا بیش از ۱۴ روز در آب زنده بماند(۲۸).

Quaglia و Azevedo و همکاران (۲۰۰۸)، Moreno و همکاران (۲۰۰۷)، Adams و همکاران (۲۰۰۳)، Johnson و همکاران (۱۹۹۷)، Baker و همکاران (۲۰۰۲)،



شکل ۱- نتایج PCR نمونه‌ها در ژل آگاروز ۱/۵ درصد؛ ستون M : مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۱ : کنترول منفی (آب مقطر استریل)، ستون ۲ : کنترول مثبت، ستون ۳ و ۵: نمونه‌های منفی، ستون ٤: نمونه مثبت هلیکوباکتر پیلوری

جدول ۱ – وضعیت آلودگی آب‌های لوله کشی، شیر، پنیر و بستنی سنتی در شهرکرد و شیراز به *هلیکوباکترپیلوری* به روش PCR

شهر مورد مطالعه	نمونه‌ی مورد مطالعه	تعداد نمونه	تعداد نمونه‌های منفی (درصد)	تعداد نمونه‌های مثبت (درصد)
شهرکرد	آب لوله کشی شهری	۲۰	۱۹(۹۵/۰)	۱ (۵/۰)
	شیر خام گاو	۳۸	۳۳ (۸۶/۸)	۵(۱۳/۲)
	پنیر سنتی	۲۲	۲۰ (۹۰/۱)	۲ (۹/۹)
	بستنی سنتی	۱۴	۱۳ (۹۲/۹)	۱ (۷/۱)
شیراز	آب لوله کشی شهری	۲۰	۱۹(۹۵/۰)	۱ (۵/۰)
	شیر خام گاو	۳۲	۳۰ (۹۳/۷)	۲ (۶/۳)
	پنیر سنتی	۲۵	۲۱ (۸۴/۰)	۴ (۱۶/۰)
	بستنی سنتی	۱۱	۱۱ (۱۰۰)	۰ (۰/۰)
	تعداد کل نمونه‌ها	۱۸۲	۱۶۶(۹۱/۲)	۱۶(۸/۸)

همچنین مطالعات مشابهی از Cellini و همکاران (۲۰۰۵) و Lu و همکاران (۲۰۰۲) بیانگر جداسازی *هلیکوباکترپیلوری* از نمونه‌های آب شهری، آب دریا و فاضلاب می‌باشد. اخیراً حضور *H. pylori* در بیوفیلم‌های آب چاه، رودخانه و آب سیستم‌های توزیع آب گزارش شده است(۱، ۳، ۵، ۸، ۱۳، ۱۸، ۲۱، ۲۴ ، ۲۶، ۲۹).

در مناطق جغرافیایی که آب سالم آشامیدنی در دسترس نیست میزان شیوع عفونت ناشی از *H. pylori* به طور واضحی بالاتر از مناطقی است که دسترسی به آب آشامیدنی سالم وجود دارد که خود می‌تواند نشان دهنده‌ی مسیر انتقال به میزبان باشد (۱۶). نتایج مطالعه‌ی در پرو نشان می‌دهد ۵۰ درصد از نمونه‌های آب آشامیدنی مورد مطالعه ازنظر حضور DNA *هلیکوباکترپیلوری* مثبت بوده است(۱۹). با وجود این، مطالعه‌ی از Janzon و همکاران (۲۰۰۹) دربنگلادش در خصوص ردیابی ژن‌های hpaA و glmA هلیکوباکترپیلوری به روش RT-PCR در ۷۵ نمونه‌ی آب آشامیدنی، بیانگر آن است که هیچ یک از نمونه‌های بررسی شده حامل ژن‌های فوق الذکر نبوده است (۱۷). همچنین Horiuchi و همکاران (۲۰۰۱) در ژاپن ۱۰ نمونه آب لوله کشی، ۶ نمونه آب چاه، ۱۰ نمونه آب رودخانه و ۱۰ نمونه فاضلاب با هدف بررسی شیوع *هلیکو باکترپیلوری* به روش RT-PCR (ژن‌های UreA و rRNA ۱۶s)مورد بررسی قرار گرفتند. دراین مطالعه، هیچ یک از نمونه‌های آب لوله کشی، آب رودخانه و فاضلاب‌ها از نظر *هلیکوباکترپیلوری* مثبت نبودند در حالی که ۳۳ درصد از نمونه‌های آب رودخانه تنها از نظر rRNA s ۱۶مثبت گزارش شده اند(۱۶).

مطالعات، نشان می‌دهد علاوه بر آب، مواد غذایی با منشاء دامی خصوصاً شیر و فرآورده‌های آن نیز به عنوان منابع احتمالی در عفونت انسان به *هلیکوباکتر پیلوری* معرفی شده اند(۱۰، ۱۱، ۱۲، ۲۳، ۲۶، ۲۸). در مطالعه‌ی حاضر به‌ترتیب ۱۰، ۱۲/۸ و ۴ درصد از نمونه‌های شیر، پنیر و بستنی‌های سنتی حامل DNA *هلیکوباکتر پیلوری* بوده است که مشابه مطالعات اخیراست. مطالعه‌ی جدیدی از Quaglia و همکاران (۲۰۰۸) در خصوص وقوع *هلیکوباکترپیلوری* در شیر خام گاو،گوسفند و بز به روش Nested-PCR نشان می‌دهد از ۴۰۰ نمونه شیر مورد مطالعه ۱۳۹ نمونه (۴۰/۷درصد)از نظر حضور ژن glmM *هلیکوباکترپیلوری* مثبت بوده است هر چند در نمونه‌های کشت داده باکتری جدا نشده است (۲۶). مطالعه‌ی مشابه از Fujimura و همکاران از ژاپن (۲۰۰۲) در خصوص تعیین *هلیکوباکتر پیلوری* در شیر گاو نشان می‌دهد ۷۲/۲ درصد از نمونه‌های شیر خام مورد مطالعه (۱۳ نمونه از ۱۸ نمونه) و ۵۵ درصد از نمونه‌های شیر پاستوریزه(۱۱نمونه از ۲۲ نمونه) آلوده به *هلیکوباکتر پیلوری* بوده است (۱۱). قاسمیان صفایی و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ی در خصوص ردیابی *هلیکوباکتر پیلوری* در شیر به روش الایزا نشان دادند که به‌ترتیب

۲۵ درصد و ۱۶ درصد از نمونه‌های سرم و شیر گاوهای شیری شهرستان شهرکرد حامل آنتی ژن *هلیکوباکتر پیلوری* بوده است (۱۲).

٤- نتیجه گیری

از ۱۸۲ نمونه‌ی مورد بررسی در این مطالعه، تنها از یک نمونه هلیکوباکتر پیلوری به روش کشت جدا سازی شد. گزارش‌ها از جداسازی هلیکوباکتر پیلوری از مواد غذایی بسیار کم است و بررسی‌ها نشان می‌دهد به علت عدم قابلیت رشد این باکتری در مواد غذایی تعداد آن احتمالاً محدود و جداسازی آن مشکل است (۳، ۷). آلودگی آب و مواد غذایی به هلیکو باکتر پیلوری عمدتاً ناشی از آلودگی مدفوعی است لذا رعایت اصول بهداشت فردی در تهیه و فرآیند تولید مواد غذایی و جلوگیری از آلودگی منابع آب به فاضلاب‌های انسانی،ترمیم و باز سازی و جایگزینی شبکه‌ی انتقال آب که می تواند نقش مهمی در جلوگیری از آلودگی آب ایفا کند را می‌توان از راه حل‌های مهم جلوگیری از آلودگی مواد غذایی به این باکتری دانست. مطالعات تکمیلی‌تر و مدون‌تر جهت بررسی وضعیت آلودگی مواد غذایی و بررسی راه‌های آلودگی مواد غذایی به این باکتری پیشنهاد می‌گردد.

٥- منابع

1. Adams, B.L., Bates, T.C., Oliver, J.D. 2003. Survival of *Helicobacter pylori* in a naturalfreshwater environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 7462–7466.
2. Alborzi,A., Soltani,J., Pourabas,B., Oboodi,B., Haghighat,M., and Hayati, M. 2006. Prevalence of *H. pylori* infection in children (south of Iran). *Diagnostic of Microbiology and Infection*, 54:250-261.
3. Azevedo,.F.,Almeida,C.,Fernandes,I.,Cerqueira,L.,Dias,S.,Keevil,C.W.,Vieira, M.J. 2008. Survival of gastric and enterohepatic *Helicobacter* spp. in water: implications for transmission. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 1805–1811.
4. Barbe, B.A., Sahm, D.F. and Weissfald, A.S. 2007. Bailey and Scotts, Diagnostic Micrbiology, 12th edition, PP. 421-423.
5. Baker, K.H., Hegarty, J.P., Redmond, B., Reed, N.A., Herson, D.S. 2002. Effect of oxidizing disinfectants (chlorine, monochloramine, and ozone) on *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 981–984.
6. Basile,A., Senator,F., Gargano,R.,Sorbo,S.,Pezzo,M.D.and Lavitola,A. 2006.Antibacterial and antioxidant activities in sideritis italic(Miller). *Journal of Ethnopharmacology*, 107: 240-248.
7. Cellini, L., Del, V.A., Di, C.M., Di, C.E., Favaro, M., Donelli, G., 2004. Detection of free and plankton-associated *Helicobacter pylori* in seawater. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 285–292.
8. Cellini, L., Di ,C.E., Grande, R., Di, B.S.,Prenna, M.,Pasquantonio, M.,Pane, L. 2005. Detection of Helicobacter pylori associated with zooplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 40: 115-120.
9. Das, J.C., Paul, N. 2007. Epidemiology and pathophysiology of *Helicobacter pylori* infection in children. *Indian Journal of Pediatrics*, 74: 287–290.
10. Dore,M.P., Sepulveda, A.R., El-Zimaty, H.,Yomaoka, Y., Osato, M.S.,Mototsugu, K., Nieddu, A.M., Realdi, G., Graham, D.Y. 2001. Isolation of *Helicobacter pylori* from milk sheep—implications for transmission to humans. *The American Journal of Gastroenterology*, 96: 1396 – 1401.
11. Fujimura, S., Kawamura, T., Kato, S., Tateno, H. and Watanabe, A., 2002. Detection of *Helicobater pylori* in cow's milk. *Letters in Applied Microbiology*, 35:504-507.
12. Ghasemian Safaei, H., Rahimi, E., Zandib, A., Rashidipour, A. 2011. *Helicobacter pylori* as a zoonotic infection: the detection of H. pylori antigens in the milk and faeces of cows. *Journal of Research in Medical Sciences*, 16: 184-187.
13. Giao, M.S., Azevedo, N.F.,Wilks, S.A., Vieira, M.J., Keevil, C.W., 2008. Persistence of *Helicobacter pylori* in heterotrophic drinking-water biofilms.

14. Gomes, B.C and De Martinis ,E. C. P. 2004. The significance of *Helicobacter pylori* in water, food and environmental samples. *Food Control*, 15: 397-403.
15. Graham, D.Y., Opekun, A.R., Osato, M.S., El-Zimaity, H.M., Lee, C.K., Yamaoka, Y., Qureshi,W.A., Cadoz, M., Monath, T.P. 2004. Challenge model for *Helicobacter pylori* infection in human volunteers. *Gut* 53: 1235–1243.
16. Horiuchi, T., Ohkusa, T., Watanabe, M., Kobayashi, D., Miwa, H., Eishi, Y., 2001. *Helicobacter pylori* DNA in drinking water in Japan. *Microbiology and Immunology*, 45:515–519.
17. Janzon, A., Sjöling,A., Lothigius, A., Ahmed, D.,Qadri, F., and Svennerholm, A.M. 2009. Failure to detect *Helicobacter pylori* DNA in drinking and environmental water in Dhaka, Bangladesh, using highly sensitive Real-Time PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:3039-3044.
18. Johnson, C.H., Rice, E.W., Reasoner, D.J. 1997. Inactivation of *Helicobacter pylori* by chlorination. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 4969–4970.
19. Klein, P.D., Opekun, A.R., Smith, E.O., Graham, D.Y. 1991. Gastrointestinal Physiology working Group. *The Lancet*, 337: 1503-1506.
20. Lage AE Godfroid E, Fauconnier A, Burette, A., Butzler, J.P., Bollen, A. and Glupczynski, Y. 1995. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection by PCR: comparison with other invasive techniques and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 2752–2756.
21. Lu, Y., Redlinger, T.E., Avitia, R., Galindo, A., Goodman, K. 2002. Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated municipal waste water. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1436–1439.
22. Megraud, F., Broutet, N., 2000. Review article: have we found the source of *Helicobacter pylori*? *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 14:7–12.
23. Meng, J., Doyle, M.P., 1997. Emerging issues in microbiological food safety. *Annual Review of Nutrition*, 17: 255–275.
24. Moreno, A., Piqueres, P., Alenso , J.L., Jimenez, A., Gonzalez, A. And Ferrus, M.A. 2007. Survival and viability of *Helicobacter pylori* after inoculation into chlorinated drinking. *Water Research*, 41:3490-3496.
25. Parsons, H.K., Carter, M.J.D., Sanders, S., Winstanley, T. and Lobo, A.T. 2001. *Helicobacter pylori* antimicrobial resistance in the United Kingdom: the effect of age, sex and socio-economic status. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 15: 1473-1478.
26. Quaglia,N.C., Dambrosio,A., Normanno,G., Parisi,A. Patrono, R., Ranieri, G., et al. 2008. High occurrence of *Helicobacter pylori* in raw goat, sheep and cow milk inferred by glmM gene: A risk of food-borne infection?. *International Journal of Food Microbiology*, 124: 43–47.
27. Turutoglu, H., Mudul, S. 2002. Investigation of *Helicobacter pylori* in raw sheep milk samples. *Journal of Veterinary Medicine, Infectious diseases and veterinary Public Health, Series B*, 49:308-309.
28. Vale, F.F., Vítor, J.M.B. 2010. Transmission pathway of *Helicobacter pylori*: Does food play a role in rural and urban areas? *International Journal of Food Microbiology*, 138:1–12.
29. Watson, C.L., Owen, R.J., Said, B., Lai, S., Lee, J.V., Surman-Lee, S., Nichols, G. 2004. Detection of *Helicobacter pylori* by PCR but not culture in water and biofilm samples from drinking water distribution systems in England. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 690–698.