شیوع و ژنوتایپینگ سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از نمونه‌های شیر خام

سید محمدحسین حجت[1]، محمدحسین مرحمتی زاده[1*]

۱.گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

*نویسنده مسئول: *Mhmarhammatizadeh@yahoo.com*

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۱۲/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۲۸

چکیده

با وجود اهمیت بالای هلیکوباکتر پیلوری، هنوز منشا اصلی باکتری و راه‌های انتقال آن به جوامع بشری مشخص نشده است. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی شیوع و ژنوتایپینگ ایزوله‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از نمونه‌های شیر خام انجام پذیرفت. در کل ۱۸۰ نمونه شیر خام گاو، گوسفند و بز از استان فارس به صورت تصادفی جمع آوری شد. حضور هلیکوباکتر پیلورری در نمونه های شیر خام با استفاده از کشت میکروبی بررسی شد. DNA ژنومی از جدایه‌های هلیکوباکتر پیلوری استخراج و فراوانی انواع ژنوتیپ های VacA، CagA، IceA و OipA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ارزیابی شد. در کل ۵۳ نمونه از ۱۸۰ (۲۹/۴۴ درصد) نمونه شیر خام آلوده به هلیکوباکتر پیلوری بودند. شیوع آلودگی در نمونه‌های شیر خام گاو، گوسفند و بز به ترتیب ۲۰، ۳۸/۳۳ و ۳۰ درصد بود. VacA s1a (۶۹/۷۱ درصد)، m1a (۶۷/۹۲ درصد)، s2 (۶۲/۲۶ درصد) و m2 (۵۸/۴۹ درصد) و cagA (۵۰/۹۴ درصد) فراوان‌ترین ژنوتیپ‌های ردیابی شده بودند. نادرترین ژنوتیپ‌های ردیابی شده به ترتیب VacA s1c (۷/۵۴ درصد)، s1b (۱۶/۹۸ درصد) و m1b (۱۸/۸۶ درصد) و iceA2 (۷/۵۴ درصد) بودند. S1am1a (۳۹/۶۲ درصد)، s2m1a (۳۲/۰۷ درصد)، s1am2 (۲۸/۳۰ درصد) و s2m2 (۲۶/۴۱ درصد) فراوان‌ترین ژنوتیپ-های ترکیبی ردیابی شده بودند. شیر خام و خصوصا شیر خام گوسفند به عنوان حاملی برای انتقال سویه‌های حدت دار هلیکوباکتر پیلوری در نظر گرفته شد. تشابه در الگوی ژنوتایپینگ جدایه‌ها احتمالا نشان‌دهنده مشابهت در منبع آلودگی نمونه‌ها به هلیکوباکتر پیلوری است.

کلید واژه‌ها: هلیکوباکتر پیلوری، شیوع، ژنوتایپینگ، شیر خام.

مقدمه

شیر یکی از معدود غذاهای مغذی است که روزانه توسط میلیون‌ها نفر مصرف می شود. از زمان دوشش شیر از پستان دام تا زمان ورود آن به کارخانجات و همچنین عرضه به صورت شیر خام در مراکز فروش، امکان بروز آلودگی میکروبی شیر، دور از انتظار نیست (Velázquez-Ordoñez, et al., 2019). آلودگی شیر خام ممکن است در زمان دوشش در اثر انتقال آلودگی از پشم، پوست و حتی مدفوع دام، دست آلوده کارکنان مراکز شیردوشی و همچنین در زمان انتقال شیر به مراکز فروش و کارخانجات، اتفاق افتد (Ruangwittayanusorn, et al., 2016). هلیکوباکتر پیلوری یک باکتری گرم منفی، میکروآئروفیل و تاژک‌دار است که به عنوان عامل احتمالی برای بروز زخم معده، گاستریت مزمن فعال، زخم دئودنوم، سرطان و لنفوم معده، کم‌خونی ناشی از فقر آهن و پورپورای ترومبوسیتوپنی ناشناخته(ITP) در انسان شناخته می‌شود (Alexander, et al., 2021). با وجود این که مطالعات روش‌های مدفوعی-دهانی و دهانی-دهانی را به عنوان راه‌های اصلی انتقال باکتری در جوامع بشری معرفی نموده‌اند (Stefano, et al., 2018; Ding, et al., 2022)، تحقیقات زیادی حضور باکتری در موادغذایی و

خصوصا شیر و فراورده‌های لبنی را اثبات کرده‌اند (Osman, et al., 2015; Mousavi, et al., 2015; Šťástková, et al., 2021). همچنین، مطالعه Momtaz و همکاران (۲۰۱۴) (Momtaz, et al., 2014) نشان داد که علاوه بر معده انسان که مخزن قطعی هلیکوباکترپیلوری است، باکتری در نمونه‌های بایوپسی اخذ شده از دستگاه گوارش گاو، گوسفند و بز نیز شیوع بالایی داشته‌است. بنابراین به نظر می‌رسد مواد غذایی با منشا دامی می‌توانند به عنوان یک حامل برای انتقال هلیکوباکترپیلوری در نظر گرفته شوند (Quaglia and Dambrosio, 2018). متاسفانه هنوز نقش مواد غذایی به عنوان حاملین هلیکوباکتر پیلوری مشخص نشده‌است. در نتیجه انجام مطالعات به منظور بررسی نقش غذا در انتقال هلیکوباکترپیلوری ضروری به نظر می‌رسد.

ورود هلیکوباکتر پیلوری به دستگاه گوارش میزبان و چسبندگی و حمله آن به سلول‌های اپیتلیومی مرهون حضور و فعالیت تعدادی از فاکتورهای حدت است. ژنوتایپینگ با استفاده از فاکتورهای حدت متفاوتی مانند سایتوتوکسین خاص واکوئله (VacA)، ژن آ مرتبط با سایتوتوکسیسیتی (CagA)، فاکتور تحریک شده در اثر تماس با اپیتلیوم (IceA) و پروتئین غشای خارجی (OipA) به عنوان یکی از کاربردی‌ترین روش‌ها برای بررسی ارتباط بین ایزوله‌های هلیکوباکترپیلوری جداسازی شده از منابع مختلف و همچنین تنوع سویه‌ای است (Ranjbar, et al., 2016a,b). فراوانی بالای فاکتورهای VacA، CagA، IceA و OipA در ایزوله‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از موارد عفونت‌های بالینی، گزارش شده است (Sedaghat, et al., 2014). فاکتور VacA یک ژنچند شکلی با نواحی سیگنالی (s1 و s2) و بین منطقه‌ای (m1 و m2) متفاوت است که در نواحی s1 و m1 به دو زیر ناحیه a و b تقسیم‌بندی می‌شود (Keikha, et al., 2020). فاکتور IceA نیز دو تحت تیپ ۱ و ۲ دارد که در اکثر موارد عفونی، فراوانی متفاوتی دارند (Huang, et al., 2016). نظر به اهمیت هلیکوباکتر پیلوری و نقش موادغذایی با منشا دامی در انتقال این باکتری به جوامع بشری، مطالعه حاضر به منظور ارزیابی شیوع و ژنوتایپینگ ایزوله‌های هلیکوباکتر پیلوری جداشده از نمونه‌های شیر خام گاو، گوسفند و بز جمع‌آوری‌شده از استان فارس انجام پذیرفت.

جداسازی هلیکوباکتر پیلوری

به منظور جداسازی هلیکوباکترپیلوری ۲۵ میلی‌لیتر از هر نمونه در کنار شعله و در شرایط کاملا استریل به ۲۲۵ میلی‌لیتر محیط مایع بروسلا (Mo74 شرکت HiMedia، هند) اضافه و با ۵ درصد سرم اسب و مکمل Supplement F0oo9 موجود در محیط کشت خریداری شده، غنی‌سازی شد. سپس محیط‌های کشت در میکرو آئروفیلیک در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. پس از ۷ روز گرمخانه‌گذاری، ۰/۱ میلی‌لیتر از محیط مایع غنی‌سازی شده روی محیط بروسلا آگار (MO74 شرکت HiMedia، هند) که حاوی ۵ درصد خون اسب دیفیبرینه شده و مکمل قبلی بود، منتقل و به مدت ۷ روز در ۳۷ درجه سلسیوس و تحت شرایط میکروآئروفیلیک گرمخانه‌گذاری شد. پرگنه‌های مشکوک به هلیکوباکترپیلوری براساس ریخت شناسی، تحت آزمایشات رنگ آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز و اوره آز قرار گرفتند (Ranjbar, et al., 2019).

استخراج DNA و ارزیابی فراوانی ژنوتیپ‌ها

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها

مطالعه حاضر کاربردی[1] از نوع توصیفی[2] مقطعی[3] بود .در این مطالعه جامعه آماری نمونه‌های شیر خام گاو، گوسفند و بز عرضه شده در تابستان سال ۱۴۰۰ در استان فارس بودند که به صورت تصادفی جمع‌آوری شدند.

[1] Study
[2] Description
[3] Cross sectional

در کل ۱۸۰ نمونه شامل شیر خام گاو (۶۰ نمونه)، شیر خام گوسفند (۶۰ نمونه) و شیر خام بز (۶۰ نمونه) از مراکز فروش واقع در استان فارس به صورت تصادفی، جمع‌آوری شدند. هر نمونه (۱۰۰ میلی‌لیتر) به صورت جداگانه در لوله آزمایش استریل جمع‌آوری و سریعا در دمای ۴ درجه سلسیوس به آزمایشگاه منتقل شدند. به منظور استخراج DNA از کشت یک هفته‌ای باکتری در محیط مایع بروسلا استفاده شد. جهت استخراج DNA از باکتری‌های جدا شده از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده، استفاده شد. کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد و کمیت آن با استفاده از دستگاه نانودراپ (NanoDrop, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) ارزیابی شد.

سپس نمونه‌های DNA در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس تا زمان انجام آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، قرار داده شد. جدول ۱ لیست پرایمرهای مورد استفاده و شرایط واکنش PCR جهت ژنوتایپینگ جدایه‌های هلیکوباکترپیلوری را نشان می‌دهد. تمام واکنش‌های PCR، با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) انجام شد.

حجم واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز با توجه به مطالعات پیشین تعیین شد (Peek, et al., 1998; Wang, et al., 2002). از PCR-grade water (Thermofisher Scientific, Germany) به عنوان کنترل منفی و از سویه‌های استاندارد هلیکوباکتر پیلوری SS1، J99، Tx-30، ۸۴۱۸۳، ۲۶۶۹۵ و ۲۳-۸۸ به عنوان کنترل‌های مثبت، استفاده شد. در نهایت ۱۰ میکرولیتر از محصول نهایی واکنش PCR با یک میکرولیتر Loading buffer (Thermofisher Scientific, Germany) مخلوط و به داخل ژل آگارز ۲ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم برماید (Thermofisher Scientific, Germany) تزریق و فرایند الکتروفورز به مدت ۳۰ دقیقه انجام پذیرفت.

نوارهای DNA تکثیر شده هر ژن در نهایت با استفاده از پرتو UV تحت دستگاه UVDoc (انگلستان) مشاهده و ارزیابی گردید.

جدول۱- لیست پرایمرهای مورد استفاده و شرایط واکنش PCR جهت ژنوتایپینگ ایزوله‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از نمونه‌های شیر خام (Peek, et al., 1998; Wang, et al., 200

ژن هدف		توالی پرایمر (’3-’5)	اندازه محصول (bp)	شرایط دمایی
VacA	s1a	F: CTCTCGCTTTAGTAGGAGC R: CTGCTTGAATGCGCCAAAC	۲۱۳	
	s1b	F: AGCGCCATACCGCAAGAG R: CTGCTTGAATGCGCCAAAC	۱۸۷	1 cycle: 1 min: 95 0C 32 cycles: 45 s: 95 0C 50 s: 64 0C 70 s: 72 0C 1 cycle: 5 min: 72 0C
	s1c	F: CTCTCGCTTTAGTGGGGYT R: CTGCTTGAATGCGCCAAAC	۲۱۳	
	s2	F: GCTAACACGCCAAATGATCC R: CTGCTTGAATGCGCCAAAC	۱۹۹	
	m1a	F: GGTCAAAATGCGGTCATGG R: CCATTGGTACCTGTAGAAAC	۲۹۰	
	m1b	F: GGCCCCAATGCAGTCATGGA R: GCTGTTAGTGCCTAAAGAAGCAT	۲۹۱	
	m2	F: GGAGCCCCAGGAAACATTG R: CATAACTAGCGCCTTGCA	۳۵۲	
CagA		F: GATAACAGCCAAGCTTTTGAGG R: CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA	۳۰۰	1 cycle: 1 min: 94 0C 32 cycles: 60 s: 95 0C 60 s: 56 0C 60 s: 72 0C 1 cycle: 10 min: 72 0C
IceA	1	F: GTGTTTTTAACCAAAGTATC R: CTATAGCCASTYTCTTTGCA	247	1 cycle: 5 min: 96 0C 30 cycles: 60 s: 96 0C 60 s: 55 0C 2 min: 72 0C 1 cycle: 10 min: 72 0C
	2	F: GTTGGGTATATCACAATTTAT R: TTRCCCTATTTTCTAGTAGGT	۲۲۹	
OipA		F: GTTTTTGATGCATGGGATTT R: GTGCATCTCTTATGGCTTT	۴۰۱	1 cycle: 1 min: 94 0C 32 cycles: 60 s: 94 0C 60 s: 56 0C 60 s: 72 0C 1 cycle: 10 min: 72 0C

تحلیل آماری داده‌ها

داده‌های حاصل از آزمایشات انجام شده در نرم افزار Microsoft Office Excel گردآوری شده و توسط نرم افزار SPSS آنالیز می‌شوند. روش آماری تجزیه و تحلیل داده‌ها، آزمون مربع کای و تست دقیق فیشر بود. در نهایت $p<0/05$ به عنوان حد معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

در کل ۵۳ نمونه از کل ۱۸۰ نمونه (۲۹/۴۴ درصد) شیر خام جمع آوری شده از استان فارس، آلوده به هلیکوباکترپیلوری بودند. شیوع آلودگی به هلیکوباکترپیلوری در نمونه‌های شیر خام گوسفند (۳۸/۳۳ درصد) بیشتر و شیر خام گاو، کمتر (۲۰ درصد) از سایر نمونه‌ها بود. شیوع آلودگی به هلیکوباکترپیلوری در نمونه‌های شیر خام بز، ۳۰ درصد بود. اختلاف آماری معنی‌دار برای شیوع هلیکوباکترپیلوری بین انواع نمونه‌های شیر خام مشاهده شد ($p<0/05$). جدول ۲ فراوانی ژنوتیپ‌های ردیابی شده در ایزوله‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از نمونه‌های شیر خام جمع آوری شده از استان فارس را نشان می‌دهد. ژنوتیپ‌های VacA s1a (۶۹/۷۱ درصد)، m1a (۶۷/۹۲ درصد)، s2 (۶۲/۲۶ درصد) و m2 (۵۸/۴۹ درصد) و cagA (۵۰/۹۴ درصد) بیشترین فراوانی را در بین ایزوله‌های جداشده داشتند. با این وجود، ژنوتیپ‌های VacA s1c (۷/۵۴ درصد)، m1b (۱۸/۸۶ درصد) و s1b (۱۶/۹۸ درصد) و iceA2 (۷/۵۴ درصد) کمترین فراوانی را داشتند. سویه‌های هلیکوباکترپیلوری جداشده از نمونه‌های شیر خام گوسفند حامل تعداد بیشتری از ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بودند ($p<0/05$). اختلاف آماری معنی‌دار بین فراوانی ژنوتیپ‌های iceA1 و iceA2 دیده شد ($p<0/05$).

جدول ۳ الگوی ژنوتایپینگ ایزوله‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از نمونه-های شیر خام جمع آوری شده از استان فارس را نشان می‌دهد. S1am1a (۳۹/۶۲ درصد)، s2m1a (۳۲/۰۷ درصد)، s1am2 (۲۸/۳۰ درصد) و s2m2 (۲۶/۴۱ درصد) فراوان‌ترین ژنوتیپ‌های ترکیبی در جدایه‌های هلیکوباکترپیلوری بودند. هیچ نمونه مثبتی برای ژنوتیپ‌های ترکیبی s1cm1b و s1cm2 یافت نشد. ژنوتیپ‌های ترکیبی s1cm1a (۱/۸۸ درصد) و iceA1/iceA2 (۱/۸۸ درصد) کمترین فراوانی را در بین سایر ژنوتیپ‌ها داشتند. اختلاف آماری معنی‌دار بین فراوانی سویه‌های cagA+ و cagA- و oipA+ و oipA-، دیده شد ($p<0/05$). اختلاف آماری معنی‌دار برای فراوانی ژنوتیپ‌های ترکیبی بین انواع نمونه های شیر خام مشاهده شد ($p<0/05$).

جدول۲- فراوانی ژنوتیپ‌ها در ایزوله‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از نمونه‌های شیر خام جمع آوری شده از استان فارس.

نمونه های شیر خام (تعداد مثبت از نظر هلیکوباکتر پیلوری)	فراوانی ژنوتیپ‌ها (درصد)										
	VacA								IceA		OipA
	s		m				CagA				
	1a	1b	1c	2	1a	1b	2	1	2		
گاو (۱۲)	۶ (۵۰)	۲ (۱۶/۶۶)	۱ (۸/۳۳)	۵ (۴۱/۶۶)	۵ (۴۱/۶۶)	۲ (۱۶/۶۶)	۴ (۳۳/۳۳)	۲ (۱۶/۶۶)	-	۲ (۱۶/۶۶)
گوسفند (۲۳)	۲۰ (۸۶/۹۵)	۳ (۱۳/۰۴)	۲ (۸/۶۹)	۱۸ (۷/۸۲)	۲۰ (۸۶/۹۶)	۵ (۲۱/۷۳)	۱۶ (۶۹/۵۶)	۱۰ (۴۳/۴۷)	۳ (۱۳/۰۴)	۷ (۳۰/۴۳)
بز (۱۸)	۱۲ (۶۶/۶۶)	۴ (۲۲/۲۲)	۱ (۵/۵۵)	۱۰ (۵۵/۵۵)	۱۱ (۶۱/۱۱)	۳ (۱۶/۶۶)	۷ (۳۸/۸۸)	۵ (۲۷/۷۷)	۱ (۵/۵۵)	۴ (۲۲/۲۲)
کل (۵۳)	۳۸ (۷۱/۶۹)	۹ (۱۶/۹۸)	۴ (۷/۵۴)	۳۳ (۶۲/۲۶)	۳۶ (۶۷/۹۲)	۱۰ (۱۸/۸۶)	۲۷ (۵۰/۹۴)	۱۷ (۳۲/۰۷)	۴ (۷/۵۴)	۱۳ (۲۴/۵۲)

جدول۳- الگوی ژنوتایپینگ ایزوله‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از نمونه‌های شیر خام جمع آوری شده از استان فارس.

نمونه های شیر خام (تعداد مثبت از نظر هلیکوباکتر پیلوری)	الگوی ژنوتایپینگ (درصد)																	
	S1am1a	S1am1b	S1am2	S1bm1a	S1bm1b	S1bm2	S1cm1a	S1cm1b	S1cm2	S2m1a	S2m1b	S2m2	CagA+	CagA-	IceA1/IceA2	OipA+	OipA-
گاو (۱۲)	۳ (۲۵)	-	۲ (۱۶/۶۶)	-	-	-	-	-	-	۲ (۱۶/۶۶)	۱ (۸/۳۳)	۲ (۱۶/۶۶)	۴ (۳۳/۳۳)	۸ (۶۶/۶۶)	-	۲ (۱۶/۶۶)	۱۰ (۸۳/۳۳)
گوسفند (۲۳)	۱۲ (۵۲/۱۷)	۲ (۸/۶۹)	۹ (۳۹/۱۳)	۱ (۴/۳۴)	۱ (۴/۳۴)	۱ (۴/۳۴)	۱ (۴/۳۴)	-	-	۱۰ (۴۳/۴۷)	۲ (۸/۶۹)	۸ (۳۴/۷۸)	۱۶ (۶۹/۵۶)	۷ (۳۰/۴۳)	۱ (۴/۳۴)	۷ (۳۰/۴۳)	۱۶ (۶۹/۵۶)
بز (۱۸)	۶ (۳۳/۳۳)	۱ (۵/۵۵)	۴ (۲۲/۲۲)	۱ (۵/۵۵)	۱ (۵/۵۵)	۱ (۵/۵۵)	-	-	-	۵ (۲۷/۷۷)	۱ (۵/۵۵)	۴ (۲۲/۲۲)	۷ (۳۸/۸۸)	۱۱ (۶۱/۱۱)	-	۴ (۲۲/۲۲)	۱۴ (۷۷/۷۷)
کل (۵۳)	۲۱ (۳۹/۶۲)	۳ (۵/۶۶)	۱۵ (۲۸/۳۰)	۲ (۳/۷۷)	۲ (۳/۷۷)	۲ (۳/۷۷)	۱ (۱/۸۸)	-	-	۱۷ (۳۲/۰۷)	۴ (۷/۵۴)	۱۴ (۲۶/۴۱)	۲۷ (۵۰/۹۴)	۲۶ (۴۹/۰۵)	۱ (۱/۸۸)	۱۳ (۲۴/۵۲)	۴۰ (۷۵/۴۷)

بحث

هلیکوباکترپیلوری یک باکتری شایع عفونی است و تخمین زده می‌شود که حدود ۵۰ تا ۷۰ درصد از جمعیت جهان آلوده به این باکتری شاند (Hooi, et al., 2017). با این وجود، منبع اصلی انتقال باکتری به جوامع بشری مشخص نیست و محققان، معده انسان را به عنوان مخزن اصلی باکتری معرفی نموده‌اند (Stefano, et al., 2018). اخیرا مطالعات زیادی در زمینه ارتباط مصرف مواد غذایی و انتقال هلیکوباکترپیلوری، انجام شده است (Ahmed, et al., 2014). اکثر این مطالعات نقش موادغذایی با منشا دامی را در انتقال سویه‌های هلیکوباکترپیلوری، بررسی نموده‌اند (Zamani, et al., 2017).

مطالعه حاضر به منظور ارزیابی شیوع و الگوی ژنوتیپی ایزوله‌های هلیکوباکترپیلوری جداشده از نمونه‌های شیر خام جمع آوری شده از استان البرز، انجام پذیرفت. شیوع آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری در نمونه‌های مورد بررسی، ۲۹/۴۴ درصد و شیر گوسفند بیشترین میزان آلودگی (۳۸/۳۳ درصد) را به خود اختصاص داد. شیوع بالاتر هلیکوباکترپیلوری در نمونه‌های شیر گوسفند در مطالعات مشابه انجام پذیرفته در کشورهای ایران (Talaei, et al., 2015)، الجزایر (Guessoum, et al., 2018) و ایتالیا (Dore, et al., 2020)، نیز گزارش شده است. Rahimi و Kheirabadi (۲۰۱۲) (Rahimi and Kheirabadi, 2012) میزان شیوع هلیکوباکترپیلوری در نمونه‌های شیر خام گاو، گوسفند و بز را به ترتیب ۱۴/۱۰ درصد، ۱۲/۲۰ درصد و ۸/۷۰ درصد گزارش نمودند. مطالعات نشان داده اند که مواد غذایی با آب فعال بالاتر از ۰/۹۷ و pH، ۴/۹ تا ۷ (مانند شیر) شرایط مساعدی برای ماندگاری هلیکوباکتر پیلوری، دارند (Vale and Vitor, 2010). همچنین مطالعه پیشین نشان داد که هلیکوباکترپیلوری تلقیح شده به شیرفرادما نگهداری شده در دمای ۴ درجه سلسیوس، می تواند تا ۱۰ روز قابلیت زنده‌مانی و تکثیر داشته باشد (Elhariri, et al., 2018).

بنابراین شیر یکی از مساعدترین موادغذایی برای زنده‌مانی هلیکوباکترپیلوری و انتقال آن به جوامع بشری است. نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده فراوانی بالای ژنوتیپ‌های فاکتورهای VacA، CagA، IceA و OipA در ایزوله‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از نمونه‌های شیر خام جمع آوری شده از استان البرز بود. حضور این ژنوتیپ‌ها متضمن بروز آسیب به نواحی مختلف اپیتلیوم سلول‌های دستگاه گوارش است (Chan, et al., 2018; Baj, et al., 2021). میزان شیوع ژنوتیپ‌های VacA، CagA، IceA و OipA در بررسی‌های انجام پذیرفته روی ایزوله‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از مواد غذایی، گاستروانتریت، زخم معده، لنفوم معده و سرطان معده رنجی معادل ۱۰ تا ۸۰ درصد داشته است (Gilani, et al., 2017; Talimkhani and Mashak, 2017; Asl, et al., 2020; Xue, et al., 2021). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ژنوتیپ‌های VacA s1a، m1a ، s2 و m2 و cagA بیشترین فراوانی را در بین ایزوله‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از نمونه‌های شیر داشتند. به صورت مشابه، Saeidi و Sheikhshahrokh (۲۰۱۶) (Saeidi and Sheikhshahrokh, 2016) فراوانی ژنوتیپ‌های VacA s1a، s1b، s1c، s2، m1a، m1b و m2 را در ایزوله‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از شیر خام به ترتیب ۸۵/۸۶ درصد، ۶۸/۴۷ درصد، ۴۶/۷۳ درصد، ۳۸/۰۴ درصد، ۷۲/۸۲ درصد، ۶۱/۹۵ درصد و ۲۶/۰۸ درصد، گزارش نمودند که نشان‌دهنده فراوانی بالاتر ژنوتیپ‌های s1a، s2، m1a و m2 می باشد. Ghorbani و همکاران (۲۰۱۶) (Ghorbani, et al., 2016) فراوانی ژنوتیپ‌های VacA s1a (۶۶/۶۶ درصد)، s2 (۶/۶۶ درصد)، m1a (۵۱/۶۶ درصد) و m2 (۵۶/۶۶ درصد) را در ایزوله‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از نمونه‌ها مواد غذایی، بیشتر از سایر ژنوتیپ‌ها گزارش نمودند. Hemmatinezhad و همکاران (۲۰۱۶) (Hemmatinezhad et al., 2016) ضمن گزارش بالاتر فراوانی ژنوتیپ‌های VacA s1a (۷۸/۳۷ درصد)، s2

(۸/۱۰ درصد)، m1a (۵۱/۳۵ درصد) و m2 (۷۵/۶۷ درصد)، شیوع ژنوتیپ‌های cagA، iceA1، iceA2 و oipA را به ترتیب ۴۱/۸۹ درصد، ۱۳/۵۱ درصد، ۴/۰۵ درصد و ۱۸/۹۱ درصد گزارش نمودند که با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد. در بین ژنوتیپ‌های ترکیبی ردیابی شده در مطالعه حاضر، VacA s1am1a، s2m1a، s1am2 و s2m2 و cagA- و oipA-، بیشترین فراوانی را داشتند. Talimkhani و Mashak (۲۰۱۷) (Talimkhani and Mashak, 2017) ژنوتیپ‌های s1am1a (۶۲/۵۰ درصد)، s1am2 (۵۰ درصد)، s2m1a (۵۵ درصد)، s2m2 (۴۵ درصد) و cagA+ (۸۰ درصد) را به عنوان فراوان ترین ژنوتیپ‌های ترکیبی ردیابی شده در ایزوله‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از شیر خام، گوشت و سبزیجات، معرفی نمودند. Khaji و همکاران (۲۰۱۷) (Khaji, et al., 2017) فراوان‌ترین ژنوتیپ‌های ترکیبی ردیابی شده در ایزوله‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از نمونه‌های شیرخام و فراورده‌های لبنی را به ترتیب s1am1a (۴۱/۶۶ درصد)، s2m1a (۲۵ درصد)، s1am2 (۱۶/۶۶ درصد) و s2m2 (۱۳/۳۳ درصد)، گزارش نمودند. در سایر مطالعات انجام شده توسط Gilani و همکاران (۲۰۱۷) (Gilani, et al., 2017b)، Ranjbar و همکاران (۲۰۱۸) (Ranjbar, et al., 2018a,b) و Mashak و همکاران (۲۰۲۰) (Mashak, et al., 2020)، s1am1a، s2m1a، s1am2، s2m2، cagA- و oipA- فراوان‌ترین ژنوتیپ‌های ترکیبی ردیابی شده در ایزوله‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از نمونه‌های شیر و گوشت، بودند. فروانی ژنوتیپ ترکیبی iceA1/iceA2 در جدایه های مطالعه حاضر، ۱/۸۸ درصد که در مقایسه با نتایج مطالعات Ranjbar و همکاران (۲۰۱۸) (Ranjbar, et al., 2018a,b) (به ترتیب ۶/۴۵ درصد و ۱۰/۴۴ درصد) و Mashak و همکاران (۲۰۲۰) (Mashak, et al., 2020) (۵/۷۶ درصد)، کمتر بود. از جمله دلایل احتمالی وجود تفاوت در فراوانی ژنوتیپ‌های مورد بررسی در مطالعات مختلف می توان به تفاوت در نوع نمونه‌ها و منبع آلودگی اشاره نمود. به نظر می‌رسد سویه‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از منابع یکسان، الگوی ژنوتایپینگ مشابهی با یکدیگر دارند. هرچند تایید این موضوع نیازمند مطالعات بیشتری است. نتیجه‌گیری در این مطالعه شیوع نسبتا بالای هلیکوباکترپیلوری در نمونه‌های شیر خام گاو، گوسفند و بز و همچنین فراوانی بالای ژنوتیپ‌هایVacA، CagA، IceA و OipA گزارش گردید. بر طبق نتایج این بررسی، شیر خام می‌تواند به عنوان یک حامل برای انتقال سویه‌های حدت دار هلیکوباکترپیلوری در نظر گرفته شود. در بین نمونه‌ها، شیر خام گوسفند بیشترین آلودگی و همچنین تنوع ژنوتیپی را به خود اختصاص داد که می تواند بیانگر اهمیت بالاتر این نوع شیر در انتقال سویه‌های هلیکوباکترپیلوری باشد. حضور ژنوتیپ‌های مورد بررسی که اغلب در ایزوله‌های هلیکوباکترپیلوری جدا شده از نمونه‌های عفونت بالینی، ردیابی شده‌اند، می تواند نشان دهنده حدت بالای سویه‌های جداسازی شده از نمونه‌های شیر در مطالعه حاضر باشد. از آنجایی که تنوع ژنوتیپی در نمونه‌های مختلف تقریبا یکسان بود، می‌توان نتیجه گرفت که منبع آلودگی نمونه‌ها به هلیکوباکترپیلوری مشابه بوده است. هرچند هیچ تفسیری برای این موضوع که آیا آلودگی به شکل اولیه از نمونه‌های شیر خام بوده یا توسط کارکنان مراکز شیردوشی، به آن انتقال یافته است، وجود ندارد. با این وجود، احتمالا جوشش کامل شیر قبل از مصرف و استفاده از شیر پاستوریزه و استریلیزه می‌تواند از انتقال هلیکوباکترپیلوری به انسان جلوگیری کند.

منابع

1. Ahmed K.S., Madompoyil B., Ahi J.D., Khan A.A., Tiwari S.K. and Habeeb M.A. 2014. A study on the transmission of Helicobacter pylori from food prepared and consumed under hygienic and unhygienic conditions: A first study using biopsy samples. Health. 6:274-83.
2. Alexander S.M., Retnakumar R.J., Chouhan D., Devi T.N.B., Dharmaseelan S., Devadas

3. K., Thapa N., Tamang J.P., Lamtha S.C. and Chattopadhyay S. 2021. Helicobacter pylori in human stomach: the inconsistencies in clinical outcomes and the probable causes. Front Microbiol. 12:713955.
4. Asl H.M., Badamchi A., Javadinia S., Khaleghi S., Tehraninia L., Saedi S. and Tabatabaei A. 2020. Prevalence of Helicobacter pylori vacA, cagA, cagE1, cagE2, dupA and oipA genotypes in patients with gastrointestinal diseases. Acta Medica Iranica. 58:310-317.
5. Baj J., Forma A., Sitarz M., Portincasa P., Garruti G., Krasowska D. and Maciejewski R. 2021. Helicobacter pylori virulence factors—mechanisms of bacterial pathogenicity in the gastric microenvironment. Cells. 10:27.
6. Chang W.L., Yeh Y.C. and Sheu B.S. 2018. The impacts of H. pylori virulence factors on the development of gastroduodenal diseases. J Biomed Sci. 25:1-9.
7. Ding S.Z., Du Y.Q., Lu H., Wang W.H., Cheng H., Chen S.Y., Chen M.H., Chen W.C., Chen Y., Fang J.Y. and Gao H.J. 2022. Chinese Consensus Report on Family-Based Helicobacter pylori Infection Control and Management (2021 Edition). Gut. 71:238-53.
8. Dore M.P., Pes G.M., Sanna G., Sepulveda A.R. and Graham D.Y. 2020. Helicobacter pylori infection in shepherds, sheep and sheep-dogs. Microb Health Dis. 2:e306.
9. Elhariri M., Hamza D., Elhelw R. and Hamza E. 2018. Occurrence of cagA+ vacA s1a m1 i1 Helicobacter pylori in farm animals in Egypt and ability to survive in experimentally contaminated UHT milk. Sci Report. 8:1-13.
10. Ghorbani F., Gheisari E. and Dehkordi F.S. 2016. Genotyping of vacA alleles of Helicobacter pylori strains recovered from some Iranian food items. Trop J Pharm Res. 15:1631-36.
11. Gilani A., Razavilar V., Rokni N. and Rahimi E. 2017a. VacA and cagA genotypes status and antimicrobial resistance properties of Helicobacter pylori strains isolated from meat products in Isfahan province, Iran. Iran J Vet Res. 18:97.
12. Gilani A., Razavilar V., Rokni N. and Rahimi E. 2017b. VacA and cagA genotypes of Helicobacter pylori isolated from raw meat in Isfahan province, Iran. Vet Res Forum. 8:75.
13. Guessoum M., Guechi Z. and Adnane M. 2018. First-time serological and molecular detection of Helicobacter pylori in milk from Algerian local-breed cows. Vet World. 11:1326.
14. Hemmatinezhad B., Momtaz H. and Rahimi E. 2016. VacA, cagA, iceA and oipA genotypes status and antimicrobial resistance properties of Helicobacter pylori isolated from various types of ready to eat foods. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 15:1-9.
15. Hooi J.K., Lai W.Y., Ng W.K., Suen M.M., Underwood F.E., Tanyingoh D., Malfertheiner P., Graham D.Y., Wong V.W., Wu J.C. and Chan F.K. 2017. Global prevalence of Helicobacter pylori infection: systematic review and meta-analysis. Gastroenterol. 153:420-429.
16. Huang X., Deng Z., Zhang Q., Li W., Wang B. and Li M. 2016. Relationship between the iceA gene of Helicobacter pylori and clinical outcomes. Ther Clin Risk Manage. 12:1085.
17. Keikha M., Ali-Hassanzadeh M. and Karbalaei M. 2020. Association of Helicobacter pylori vacA genotypes and peptic ulcer in Iranian population: a systematic review and meta-analysis. BMC Gastroenterol. 20:1-11.
18. Khaji L., Banisharif G. and Alavi I. 2017. Genotyping of the Helicobacter pylori isolates of raw milk and traditional dairy products. Microbiol Res. 8:43-46.
19. Mashak Z., Jafariaskari S., Alavi I., Shahreza M.S., Dehkordi F.S. 2020. Phenotypic and genotypic assessment of antibiotic resistance and genotyping of vacA, cagA, iceA, oipA, cagE, and babA2 alleles of

Helicobacter pylori bacteria isolated from raw meat. Infect Drug Res. 13:257.
20. Momtaz H., Dabiri H., Souod N. and Gholami M. 2014. Study of Helicobacter pylori genotype status in cows, sheep, goats and human beings. BMC Gastroenterol. 14:1-7.
21. Mousavi S. Dehkordi F.S. and Rahimi E. 2015. Virulence factors and antibiotic resistance of Helicobacter pylori isolated from raw milk and unpasteurized dairy products in Iran. J Venom Anim Tox incl Trop Dis. 20:1-7.
22. Osman E.Y., El-Eragi A.M.S., Musa A.M. and El-Magboul S.B. 2015. Detection of Helicobacter pylori glmM gene in bovine milk using nested polymerase chain reaction. Vet World. 8:913.
23. Peek Jr R.M., Thompson S.A., Donahue J.P., Tham K.T., Atherton J.C., Blaser M.J., Miller G.G. 1998. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a Helicobacter pylori gene, iceA, that is associated with clinical outcome. Proce Assoc Am Physic. 110:531-544.
24. Quaglia N.C. and Dambrosio A. 2018. Helicobacter pylori: A foodborne pathogen?. World J Gastroenterol. 24:3472.
25. Rahimi E. and Kheirabadi E.K. 2012. Detection of Helicobacter pylori in bovine, buffalo, camel, ovine, and caprine milk in Iran. Foodborne Pathog Dis. 9:453-456.
26. Ranjbar R., Farsani F.Y. and Dehkordi F.S., 2018. Phenotypic analysis of antibiotic resistance and genotypic study of the vacA, cagA, iceA, oipA and babA genotypes of the Helicobacter pylori strains isolated from raw milk. Antimicrob Res Infect Control. 7:1-14.
27. Ranjbar R., Khamesipour F., Jonaidi-Jafari N. and Rahimi E. 2016a. Helicobacter pylori in bottled mineral water: genotyping and antimicrobial resistance properties. BMC Microbiol. 16:1-10.
28. Ranjbar R., Khamesipour F., Jonaidi-Jafari N. and Rahimi E. 2016. Helicobacter pylori isolated from Iranian drinking water: vacA, cagA, iceA, oipA and babA2 genotype status and antimicrobial resistance properties. FEBS Open Bio. 6:433-441.
29. Ranjbar R., Yadollahi Farsani F. and Safarpoor Dehkordi F. 2019. Antimicrobial resistance and genotyping of vacA, cagA, and iceA alleles of the Helicobacter pylori strains isolated from traditional dairy products. J Food Safety. 39:e12594.
30. Ruangwittayanusorn K., Promket D. and Chantiratikul A., 2016. Monitoring the hygiene of raw milk from farms to milk retailers. Agric Agric Sci Proc. 11:95-99.
31. Saeidi E. and Sheikhshahrokh A. 2016. VacA genotype status of Helicobacter pylori isolated from foods with animal origin. BioMed Res Int. 2016:1-6.
32. Sedaghat H., Moniri R., Jamali R., Arj A., Zadeh M.R., Moosavi S.G.A. and Rezaei M. 2014. Prevalence of Helicobacter pylori vacA, cagA, cagE, iceA, babA2, and oipA genotypes in patients with upper gastrointestinal diseases. Iran J Microbiol. 6:14.
33. Šťástková Z., Navrátilová P. and Gřondělová A. 2021. Milk and dairy products as a possible source of environmental transmission of Helicobacter pylori. Acta Vet Brno. 90:365-373.
34. Stefano K., Marco M., Federica G., Laura B., Barbara B. and Gioacchino L. 2018. Helicobacter pylori, transmission routes and recurrence of infection: state of the art. Acta Bio Medica. 89:72.
35. Talaei R., Souod N., Momtaz H. and Dabiri H. 2015. Milk of livestock as a possible transmission route of Helicobacter pylori infection. Gastroenterol Hepatol Bed Bench. 8:S30.
36. Talimkhani A. and Mashak Z. 2017. Prevalence and genotyping of Helicobacter pylori isolated from meat, milk and vegetable in Iran. Jundishapur J Microbiol. 10:1-6.
37. Vale F.F. and Vítor J.M. 2010. Transmission pathway of Helicobacter pylori: does food play a role in rural and urban areas? Int J Food Microbiol. 138:1-12.
38. Velázquez-Ordoñez V., Valladares-Carranza B., Tenorio-Borroto E., Talavera-

Rojas M., Varela-Guerrero J.A., Acosta-Dibarrat J., Puigvert F., Grille L., Revello Á.G. and Pareja L. 2019. Microbial contamination in milk quality and health risk of the consumers of raw milk and dairy products. In Nutrition in Health and disease-our challenges now and forthcoming time. London, UK: IntechOpen.

39. Wang J., Chi D.S., Laffan J.J., Li C., Ferguson D.A., Litchfield P. and Thomas E. 2002. Comparison of cytotoxin genotypes of Helicobacter pylori in stomach and saliva. Digest Dis Sci. 47:1850-1856.
40. Xue Z., Yang H., Su D., Song X., Deng X., Yu C., Sun C., He L., You Y., Gong Y. and Fan D. 2021. Geographic distribution of the cagA, vacA, iceA, oipA and dupA genes of Helicobacter pylori strains isolated in China. Gut Pathog. 13:1-11.
41. Zamani M., Vahedi A., Maghdouri Z. and Shokri-Shirvani J. 2017 Role of food in environmental transmission of Helicobacter pylori. Caspian J Intern Med. 8:146.

Prevalence and genotyping of Helicobacter pylori strains isolated from raw milk samples

Hojat S.M.H[1], Merhamatizadeh M.H[1]*

1. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran.

Received: 24 February 2022 Accepted:18 June 2022

***Corresponding author**: *Mhmarhammatizadeh@yahoo.com*

Abstract

Despite the high importance of Helicobacter pylori, the main source of the bacterium and the habits of its transmission to human populations have not been determined yet. The present study was performed to evaluate the prevalence and genotyping of Helicobacter pylori strains isolated from raw milk samples. A total of 180 raw bovine, ovine and caprine milk samples were randomly collected from Fars province. The presence of Helicobacter pylori in raw milk samples were was studied using the microbial culture. Genomic DNA was extracted from Helicobacter pylori isolates and the frequency of VacA, CagA, IceA and OipA genotypes was evaluated using polymerase chain reaction. In total, 53 out of 180 (29.44%) raw milk samples were contaminated with Helicobacter pylori. The prevalence of contamination in raw milk samples of bovine, ovine and caprine was 20, 38.33 and 30%, respectively. VacA s1a (69.71%), m1a (67.92%), s2 (62.26%) and m2 (58.49%) and cagA (50.94%) were the most abundant detected genotypes. The rarest detected genotypes were VacA s1c (7.54%), s1b (16.98%), m1b (18.86%) and iceA2 (7.54%), respectively. S1am1a (39.62%), s2m1a (32.07%), s1am2 (28.30%) and s2m2 (26.41%) were the most commonly detected combined genotypes. Raw milk, especially raw sheep milk, was considered as a carrier for transmission of virulent strains of Helicobacter pylori. The similarity in the genotyping pattern of the isolates probably indicates the similarity in the source of infection of the samples with Helicobacter pylori.

Keywords: Helicobacter pylori, Prevalence, Genotyping, Raw milk.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited Copyright © 2022 Shahrekord Branch, Islamic Azad University