

## Original Article

### Assessment of Non-Pylori Helicobacter Species in Stray Dog's Stomach as a Potential Reservoir for Human Infections

Ali Bahadori<sup>1\*</sup>, Seyed Ali Shabestarias<sup>2</sup>, Mahsa Esmacillu<sup>3</sup>, Mohamad Hosein Surush barhagi<sup>4</sup>, Farhad Bahadori<sup>5</sup>,  
Mojtaba Attarhosseani<sup>6</sup>

<sup>1</sup>University Collage of Rab-e rashid, Tabriz, Iran

<sup>2</sup>School of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Tabriz, Tabriz, Iran

<sup>3</sup>Department of Microbiology, School of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran

<sup>4</sup>School of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

<sup>5</sup>Veterinarian, Tabriz branch, Islamic Azad University of Tabriz, Tabriz Iran

<sup>6</sup>National Academies of Sciences Baku, Baku, Azerbaijan

Received: 17 Mar, 2014      Accepted: 29 Apr, 2014

## Abstract

**Backgrounds and Objectives:** Helicobacter is a genus of Gram-negative bacteria with a characteristic helix shape. Today, a large number of non -H. pylori Helicobacter species in a wide variety of animals and humans have been described. Except helicobacter pylori, Non-pylori Helicobacter species has also been associated with some gastric problems such as gastritis, peptic ulceration and Mucosa-Associated Lymphoid Tissue (MALT) lymphoma in the human. However, due to the lack of sufficient researches on this subject in Iran, the main purpose of this study is scrutiny of these microorganisms on human health and the prevalence of Non-pylori Helicobacters in stray dogs as a reservoir for these microorganisms in Iran.

**Materials and Methods:** In this study, 55 healthy stray dogs (randomly) were used. For evaluation of the general health condition of the dogs, 0.5ml of blood collected from the cephalic vein and evaluated after staining. The dogs were anesthetized and samples were collected from stomach by gastroscopy. Infection confirmed by a positive urease test and studied by Giemsa staining and using light microscopic routs.

**Results & Conclusions:** In gastric samples, non-pylori helicobacter spp., have been observed. 87.5% of samples were positive for urease test. In light microscopic studies (we observed some spiral gram negative bacteria with 2-7 coils), 80% of samples were positive. Therefore the prevalence of helicobacter can vary from 80 to 87.5% in stray dogs. Among the investigated specimens, 25 specimens were contaminated along with several species of Helicobacter. It should be noted that, it is not possible to identify the species by using light microscopy.

**Keywords:** Non -H. pylori Helicobacter species, Helicobacter, Gastric Cancer, lymphoma, MALT

\*Corresponding author:

E-mail: Bahadori@yahoo.com

## مقاله پژوهشی

# فراوانی آلودگی سگ های ولگرد به هلیکوباکترهای غیر پیلوری به عنوان مخزنی احتمالی برای آلودگی انسان

علی بهادری<sup>۱\*</sup>، سیدعلی شبستری اصل<sup>۲</sup>، مهسا اسماعیل لو<sup>۳</sup>، محمدحسین سروش برحقی<sup>۴</sup>، فرهاد بهادری<sup>۵</sup>، مجتبی عطارحسینی<sup>۶</sup>

<sup>۱</sup>موسسه آموزش عالی ربع رشید، تبریز، ایران  
<sup>۲</sup>دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاداسلامی تبریز، تبریز، ایران  
<sup>۳</sup>گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران  
<sup>۴</sup>دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران  
<sup>۵</sup>دامپزشک، دانشگاه آزاداسلامی تبریز، تبریز، ایران  
<sup>۶</sup>دانشگاه ملی باکو، باکو، آذربایجان

دریافت: ۹۲/۱۲/۲۶ پذیرش: ۹۳/۲/۹

## چکیده

**زمینه و اهداف:** هلیکوباکترها به شکل ویبروئید یا ماریچی، گرم منفی، کم هوازی و تاژکدار می باشند و در داخل غدد معده، سلول های جداری و مخاطی معده زندگی می کنند. یافته های اخیر بیانگر این نکته هستند که علاوه بر هلیکوباکتر پیلوری، دیگر گونه های هلیکوباکتر نیز با عوارضی مثل گاستریت، زخم های پپتیک، سرطان معده و لمفوم بافت لنفوئید مخاط در انسان ها ارتباط دارند. در سگ ها و گربه ها ارگانسیم های بزرگ هلیکوباکتریایی با اندازه ی بزرگ و خمیده وجود دارند. هدف از اجرای این تحقیق ارائه یک نمای کلی از گونه های هلیکوباکتر غیرپیلوری است که به صورت طبیعی در معده ی انسان، حیوانات خانگی و پستانداران دیگر کلونیزه شده و در مواردی منجر به بیماری های مزمن، تحت حاد و حاد در انسان می شوند. از طرفی به علت عدم وجود کارهای تحقیقی کافی بر روی این موضوع در ایران هدف اصلی این مقاله نگاهی دقیق تر به اهمیت این میکروارگانسیم ها در سلامت انسان و بررسی میزان آلودگی سگ های ولگرد به عنوان مخزنی برای این میکروارگانسیم ها در ایران است.

**مواد و روش ها:** به منظور انجام این بررسی از ۵۵ قلاده سگ سالم ولگرد (به طور تصادفی) استفاده گردید. به منظور بررسی سلامت کلی سگ های مورد مطالعه، از هر کدام به منظور انجام آزمایش CBC، نیم میلی لیتر خون از ورید سفالیک اخذ و بعد از انجام گسترش و رنگ آمیزی مورد بررسی قرار گرفت. سپس سگ های مورد مطالعه بیهوش و با روش گاستروسکوپی نمونه ها از معده اخذ و با روش های شیمیایی و میکروسکوپی (رنگ آمیزی گیمسا) مورد مطالعه قرار گرفتند.

**یافته ها و نتیجه گیری:** براساس نتایج این مطالعه ۸۷/۵ درصد از نمونه های اخذ شده از معده، اوره آز مثبت بوده و در لام های مستقیم (اسمیر فشاری) اخذ شده از بافت معده، از مجموع ۵۵ لام رنگ آمیزی شده به روش گیمسا در ۱۱ لام هلیکوباکتر مشاهده نشد ولی ۴۴ لام باقی مانده از لحاظ مشاهده و حضور هلیکوباکترها مثبت بوده اند (۸۰٪). از بین لام های بررسی شده تعداد ۲۵ لام دارای آلودگی همزمان با چند گونه بودند که اکثر آن ها باکتری های ماریچی فشرده با تعداد هلیکس زیاد و زاویه دار (اشکال شبیه به هلیکوباکتر فلیس) همراه با باکتری های ماریچی فشرده ولی لبه هلیکس ها به صورت غیر زاویه دار یا گنبدی (اشکال شبیه به هلیکوباکتر بیزاررونی) مشاهده گردید (لازم به ذکر است که شناسایی گونه ها با استفاده از میکروسکوپ نوری ممکن نیست و در اینجا فقط تشبیه اشکال به گونه های مشابه جهت تجسم اشکال فضایی صورت می گیرد).

**کلید واژه ها:** هلیکوباکترهای غیر از پیلوری، هلیکوباکتر پیلوری، سرطان معده، لنفوما، MALT

\* ایمیل نویسنده رابط: Dr\_Ali\_Bahadori@yahoo.com

## مقدمه

ست (Seth) گزارش کردند که در معده ی انسان فعالیت اوره آزی شدید وجود دارد و در سال ۱۹۵۹ نشان داده شد که این فعالیت

زخم معده برای اولین بار در سال ۱۵۸۶ توسط یک پزشک ایتالیایی گزارش گردید و پس از آن در سال ۱۹۲۴، لاک (Luck) و

هلیکوباکترها به شکل خمیده (ویروئید) یا مارپیچی، گرم منفی، کم هوازی و تاژکدار می باشند و در داخل غدد معده، سلول های جداری و مخاطی معده زندگی می کنند. این باکتری ها با تولید آنزیم هیدروژناز ملکول هیدروژن را تجزیه نموده و انرژی مورد نیاز خود را از آن طریق کسب می کنند. بعلاوه این دسته از باکتری ها تعدادی آنزیم تولید می کند که از مهم ترین آن ها می توان به سه آنزیم اکسیداز، کاتالاز و اوره آز اشاره کرد که از این میان آنزیم اوره آز جهت شناسایی هلیکوباکترها مورد استفاده قرار می گیرد. سوش های هلیکوباکتر با داشتن فعالیت بالای آنزیمی اوره آز و کاتالاز و فقدان کوئینون تنفسی یا مناکوئینون-۶ متیله از گونه های کمپیلوباکتر متمایز می شوند (برخی از خصوصیات فوق در برخی از گونه های هلیکوباکترها دیده نمی شوند). یافته های اخیر بیانگر این نکته هستند که علاوه بر هلیکوباکتر پیلوری، دیگر گونه های هلیکوباکتر نیز با عوارضی مثل گاستریت، زخم های پپتیک، سرطان معده و لمفوم بافت لنفوئیدی مخاط در انسان ها ارتباط دارند (۱). عفونت های هلیکوباکتریایی با هلیکوباکترهای غیر پیلوری در معده انسان عمدتاً با گاستریت مزمن فعال همراه هستند ولی با این وجود، گزارش هایی مبنی بر ارتباط عفونت های هلیکوباکتری غیرپیلوری با آسیب های التهابی اولیه معده که عمدتاً در ناحیه آنتروم و زخم های دئودنوم قرار دارند وجود دارد. در سگ ها و گربه ها ارگانسیم های بزرگ هلیکوباکتریایی با وجود اندازه ی بزرگ و خمیده (۵ الی ۱۲ میکرون) توسط میکروسکوپ نوری قابل تفکیک از همدیگر نمی باشند ولی می توان آنها را با استفاده از کشت، توالی ژنی، هیبریداسیون DNA، نقشه ی پروتئینی و خواص میکروسکوپ الکترونی طبقه بندی کرد. امروزه طیف وسیعی از هلیکوباکترهای غیرپیلوری در انسان و سایر موجودات شرح داده شده است. هلیکوباکتر شامل حداقل ۳۲ گونه می باشد هلیکوباکتر فلیس، هلیکوباکتر بیزارزونی، هلیکوباکتر سالمونیس، هلیکوباکتر هیلمانی (که به نام گاسترو سپوریلوم هومینیس نامیده شد و بعد از تغییر نام به هلیکوباکتر هیلمانی آن نیز با آنالیزهای ژنی ۱۶ s rRNA به دو سروتایپ I و II طبقه گردید). هلیکوباکتر هیلمانی از معده ی سگ ها، هلیکوباکتر فلیس، هیلمانی و پیلوری از معده ی گربه ها جدا سازی شده است. هلیکوباکتر بیلیس و هلیکوباکتر پامه تنسیس به ندرت از معده ی سگ ها و گربه ها گزارش شده است. کونراد هیلمان (Konrad Heilmann) اولین کسی بود که مطالعات آسیب شناسی بر روی بافت های مبتلا به هلیکوباکتر هیلمانی را مورد مطالعه قرار داد (۴). هلیکوباکتر هیلمانی به طور مستقیم با گاستریت، گاستریک اولسر و لنفوم MALT معده در ارتباط است. با دانش امروزی فقط دو سویه از هلیکوباکتر هیلمانی از بافت های انسانی جداسازی شده است. هدف از اجرای این تحقیق ارائه ی یک نمای کلی از گونه های هلیکوباکتر غیر پیلوری که به صورت طبیعی در معده ی انسان، حیوانات خانگی و پستانداران دیگر کلونیزه شده و در مواردی منجر به بیماری های مزمن، تحت حاد و حاد در انسان می شوند است و از طرفی به علت عدم وجود کارهای تحقیقی بر روی این موضوع در ایران هدف اصلی این مقاله نگاهی دقیق تر به اهمیت این میکروارگانسیم ها در سلامت

پس از تجویز تتراسیکلین کاهش می یابد، ولی ارتباط این آنزیم و باکتری های موجود در معده تا سال ۱۹۸۴ مشخص نگردید. اولین بار در سال ۱۹۸۴ گزارش گردید که علت اصلی ابتلا به زخم و ناراحتی های معده در انسان ابتلا به عفونت های باکتریایی است (۱ و ۲). پیش از آن تصور می شد که محیط معده محیطی کاملاً استریل است و هیچ میکروارگانسمی قدرت کلونیزاسیون در این محیط اسیدی را ندارد و تلاش های انجام گرفته برای کشت این باکتری ناموفق بود، تا این که باری مارشال (Barry Marshall) به گونه ای غیرمترقبه موفق به این کار شد. هلیکوباکتر پیلوری (که ابتدا با نام کمپیلوباکتر پیلوریدیس شناسانده شد)، اولین باکتری بود که به عنوان عامل اصلی زخم معده، گاستریک آدنوکارسینوما و سرطان های معده و دئودنوم شناخته شد (۲). علاوه بر هلیکوباکتر پیلوری، دیگر گونه های هلیکوباکتر نیز با گاستریت، زخم های پپتیک، سرطان معده و لمفوم بافت لنفوئیدی مخاط در انسان ها مرتبط می باشند. در سال ۱۹۸۷ دکتر دنت و همکاران، وجود باکتری جدید را در ۳ مورد از حدود ۱۳۰۰ نمونه معده ی بیوپسی شده گزارش نمودند. اختلاف اصلی در شکل باکتری یافته شده بود زیرا باکتری جدید بر خلاف هلیکوباکتر پیلوری که شکلی شبیه به S دارد، دارای خم های متعدد و به شکل کاملاً مارپیچ مشاهده می گردید. بعد از انجام بررسی های تکمیلی تعلق این باکتری به جنس هلیکوباکتر مشخص شده و بعدها به نام هلیکوباکتر هیلمانی نامیده شد. مطالعات بعدی نشان داد که هلیکوباکتر های غیر از هلیکوباکتر پیلوری (NHPH) در حیوانات و اکثر پستانداران از جمله سگ، گربه، خوک و پریمات ها به وفور دیده می شوند ولی وقوع آن ها در انسان نسبت به وقوع گونه ی پیلوری کم تر بوده و بر این اساس پیشنهاد شده است که عفونت NHPH در مخاط معده انسان، از طریق تماس انسان و دام رخ می دهد (۴). بررسی های فراوانی بر روی باکتری های مارپیچی معده، در نمونه های اخذ شده از سگ ها و گربه ها انجام گرفته و بعدها با انتشار اولین میکروگراف الکترونی از این باکتری ها، مشخص شد که در این رده از ارگانسیم ها بیش از یک فرم مورفولوژیکال می توان یافت (جدول ۱). هلیکوباکترها اصولاً باکتری های مارپیچی می باشند، اما می توانند به شکل کروی هم تغییر شکل پیدا کنند و با وجودی که این اشکال هم قابلیت بقا داشته و هم دارای قدرت بیماری زایی هستند ولی غیر قابل کشت (در محیط آزمایشگاهی) بوده و به مخاط معده متصل می شوند. مطالعات بعدی نشان داد که این باکتری ها قادر هستند در معده ی انسان ها نیز کلونیزه شده و منجر به بیماری شوند.

جدول ۱: بررسی های فراوانی بر روی باکتری های مارپیچی معده

تاکسون	تعداد فلاژل	فیبرهای پری پلاسمیک	توزیع ناژک
*H.pylori	۸-۴	-	دوقطبی
*H.bizzozeronii	۱۰-۲۰	-	دوقطبی
*H.felis	۱۴-۲۰	+	دوقطبی
*H.heilmannii	۱۴-۲۲	-	دوقطبی
*H.salmonis	۱۰-۲۳	-	دوقطبی
H. suncus	۲-۴	-	قطبی

\*مهمترین سویه های هلیکوباکتر که دارای بیشترین احتمال انتقال به انسان می باشند (برای مشاهده سایر گونه های شناخته شده هلیکوباکتر می توان از سایت اینترنتی <http://www.bacterio.net/helicobacter.html> استفاده نمود).

غیرپیلوری، شدت کمتری نسبت به پیلوری داشته باشد (۹)، گاستریت حاد و مزمن در افراد مبتلا مشاهده شده است (۱۰) و نیز در آلودگی با این میکروارگانیسم‌ها آتروفی معده اغلب در قسمت آنتروم مشاهده شده و همچنین زخم عثنی عشر نیز در این موارد گزارش گردیده است (۱۳-۱۱). علاوه بر این، عفونت با هلیکوباکترهای غیرپیلوری، موجب ایجاد لنفوم MALT در معده می‌شود که شدت این بیماری ابتلا به غیر پیلوری‌ها بالاتر از خود عفونت با هلیکوباکترپیلوری است (۱۵-۱۴). قابل ذکر است که زخم معده با شانس بیشتری نسبت به زخم دئودنوم باعث بدخیمی معده خواهد شد (۱۶). ارگانسیم‌های هلیکوباکتریایی حساس به اسید بوده و به این دلیل به شکل لایه‌ای در عمق ترشحات موکوسی معده جایگزین می‌شوند. این میکروارگانیسم‌ها در نواحی اتصالات بین سلولی مخاط معده اثر نموده و مقادیر زیادی از یون-های آمونیوم و دی اکسید کربن را (با تجزیه اوره) تولید می‌کنند. حضور ارگانسیم‌ها در سطح مخاط در حد فاصل سلول‌های آنتروسیست، در عمق شکاف‌های آنتر (antral pits) و درون آنتروسیست‌ها موجب بروز یک پاسخ آماسی در ناحیه می‌شود که در آن گلبول‌های سفید چند هسته‌ای (پلی مورفونوکلئور) وجود دارند. شایان ذکر است که در برخی از بیماران مبتلا به گاستریت مزمن، در اثر عفونت با هلیکوباکترهای غیرپیلوری، تخریب میکروویلی‌ها نیز دیده می‌شود. آنزیم اوره آز یکی از آنزیم‌های مهمی است که توسط سوبه‌های هلیکوباکتر تولید و به محیط پیرامون ترشح و با تولید آمونیاک از اوره باعث خشی‌سازی اسید معده (جهت در امان ماندن از اثرات کشنده آن) می‌شود. با وجود این که این آنزیم در دسته‌ی توکسین‌های هلیکوباکتریایی قرار نمی‌گیرد ولی دارای اثرات توکسیک بر روی سلول‌های اپیتلیال بافت معده بوده و همچنین باعث ایجاد اختلال در اتصالات محکم سلولی شده و یکی از فاکتورهایی است که گفته می‌شود در ایجاد نئوپلازی در سلول‌های معدی نقش دارد. از دیگر عوامل بیماری‌زای هلیکوباکترها می‌توان به توکسین‌های باکتری اشاره کرد، که از مهم-ترین این توکسین‌ها می‌توان به Vac A و CagA اشاره کرد (۱۷). (عوامل ویروالانس در جدول ۲ به اختصار شرح داده شده است).

### مواد و روش‌ها

به منظور انجام این بررسی از ۵۵ قلابه سگ سالم ولگرد (به طور تصادفی) استفاده گردید. تمامی سگ‌ها به منظور پایش عدم وجود علایم بیماری‌های گوارشی مانند اسهال و ... به مدت سه روز نگهداری و مورد ارزیابی قرار گرفتند. به منظور بررسی سلامت کلی سگ‌های مورد مطالعه، از هر کدام به منظور انجام آزمایش CBC، نیم میلی لیتر خون از ورید سفالیک اخذ و بعد از انجام گسترش و رنگ‌آمیزی مورد بررسی قرار گرفت. به منظور جلوگیری از ایجاد موارد مثبت کاذب در تست اوره آز (ناشی از واکنش سایر باکتری‌های اوره آز مثبت مثل پروتئوس در معده) تمامی سگ‌ها حداقل به مدت دوازده ساعت به شکل ناشتا نگهداشته و سپس مورد گاستروسکوپی (اندوسکوپی) قرار گرفتند.

انسان و بررسی میزان آلودگی سگ‌های ولگرد به عنوان مخزنی برای این میکروارگانیسم‌ها در ایران است. هلیکوباکترهای غیر پیلوری، از حیوانات مختلفی مانند سگ، گربه، موش و... جدا شده‌اند (انواع هلیکوباکترها از ۴۱٪ الی ۹۱٪ گربه‌های سالم و ۵۷٪ الی ۷۶٪ گربه‌های مبتلا به استفراغ جدا شده‌اند). شیوع هلیکوباکترها در سگ‌های اهلی سالم حدود ۶۷٪ الی ۸۶٪ در سگ‌های مبتلا به استفراغ ۷۴٪ الی ۸۰٪ و در حدود ۱۰۰٪ سگ‌های بیگل آزمایشگاهی گزارش گردیده است. آلودگی همزمان با هلیکوباکتر فلیس، هلیکوباکتر بیزارزونی و یا سالمونیس در سگ‌ها مشاهده گردیده و هلیکوباکتر پیلوری بجز انسان از گربه‌ها نیز جداسازی شده است. دژنراسیون غدد معدی و سلول‌های جداری، هایپرپلازی فولیکولار لنفوییدی، آماس ملایم سلول‌های تک هسته‌ای و ایجاد تپتر مثبت سرمی توسط عفونت هلیکوباکتریایی در سگ‌ها و گربه‌ها مشاهده گردیده و برخی از مطالعات در گربه‌ها بیانگر وجود ارتباط بین حضور هلیکوباکتر و التهاب معده و دژنراسیون غده‌ای می‌باشد. تا به حال مدارکی مبنی بر ارتباط بین عفونت هلیکوباکتریایی با حضور تغییرات مخاطی، زخم و یا نئوپلاسم معده‌ای در سگ‌ها و گربه‌ها در دسترس نمی‌باشد. نظر بر این است که ترشح اسید معده و گاسترین سرم نیز متأثر از آلودگی با هلیکوباکترها نمی‌باشد. عفونت با هلیکوباکترهای غیرپیلوری در معده‌ی انسان به طور مداوم با گاستریت مزمن فعال همراه است. تشخیص سریع ضایعات معده و دئودنوم مرتبط با هلیکوباکترها بسیار مهم است، زیرا در این صورت شانس ایجاد بدخیمی در معده بعد از درمان کاهش می‌یابد. وجود گاستریت منتشر با سرطان معده در ارتباط بوده و در نتیجه مطالعه و بررسی بر روی شیوع این نوع عفونت که با گاستریت مزمن ارتباط تنگاتنگی دارد در مناطقی از ایران که میزان شیوع سرطان معده در آن‌ها بالاست (نظیر نواحی آذربایجان و خراسان) از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. عارضه اولسر پپتیک (peptic ulcer disease) به معنی نوعی آسیب خوش‌خیم در مخاط و زیرمخاط دستگاه گوارش می‌باشد (در اینجا هدف معده و دئودنوم است). امروزه عامل اصلی این زخم‌ها را وجود و تکثیر باکتری‌های متعلق به جنس هلیکوباکتر می‌دانند (گروهی تنها بر تشدید زخم و عوارض حاصله در حضور ارگانسیم‌های هلیکوباکتریایی عقیده دارند) که از راه‌های مختلفی از جمله آسیب به لایه محافظ مخاط معده موجب ایجاد اولسر پپتیک در آن می‌شوند، لذا درمان اصلی یک درمان آنتی بیوتیکی است (۵). شیوع این بیماری ۶٪ تا ۱۵٪ است. اگرچه در مواردی آلودگی حیواناتی نظیر گربه با هلیکوباکتر پیلوری دیده شده است. گروهی از دانشمندان بر این عقیده هستند که انتقال مستقیم این میکروارگانیسم‌ها به انسان بعید به نظر می‌رسد (۸-۶) اما تقریباً در میان گروه‌های مختلف بر روی این موضوع اتفاق نظر وجود دارد که این حیوانات نقش مهمی را در انتقال باکتری به انسان به طور غیرمستقیم مثلاً از طریق مواد غذایی ایفا می‌کنند. با این حال، عفونت انسانی با هلیکوباکترهای غیرپیلوری به احتمال زیاد از حیوانات سرچشمه می‌گیرد. هر چند به نظر می‌رسد ضایعات ایجاد شده در ارتباط با هلیکوباکترهای

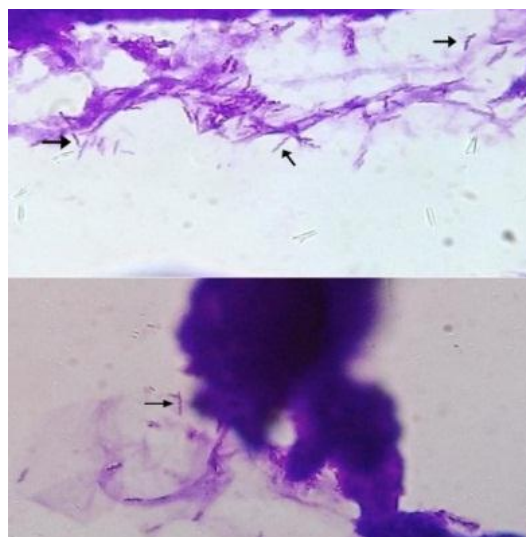
جدول ۲: عوامل ویروالانس کشف شده در هلیکوباکترها

عوامل ویروالانس	اثرات
فلاژل	حرکت فعال در موسین - نقش آنتی ژنیک
اوره آز (Urease)	اثر سمی روی سلول های اپیتلیال، مختل کردن اتصالات محکم سلولی، خشی سازی اسید
سوپراکسید دیسموتاز (Superoxide dismutase)	جلوگیری از فاگوسیتوز و کشته شدن سلول باکتری
کاتالاز (Catalase)	جلوگیری از فاگوسیتوز و کشته شدن سلول باکتری
فسفولیپاز آ (Phospholipase A)	هضم فسفولیپیدهای غشای سلول میزبان
الکل دهیدروژناز (Alcohol dehydrogenase)	آسیب مخاطی معده
آنزیم های پروتولیتیک (Proteolytic enzymes)	کاهش آنزیم گلوکوسولفاتاز موسین
سایتوتوکسین ۱۲۰-کیلودالتونی (Cag A)	مربوط به زخم و التهاب معده شدید
سایتوتوکسین (Vac A)	آسیب به اپیتلیوم

جدول ۳: تست های بیوشیمیایی در هلیکوباکتر های قابل کشت

تاکسون	تولید کاتالاز	تست نیترات	تولید اوره آز	هیدرولز آلکالین فسفاتاز
<b>H.pylori</b>	+	-	+	+
<b>H.bizzoeronii</b>	+	+	+	+
<b>H.felis</b>	+	+	+	+
<b>H.heilmanii</b>	+	+	+	+
<b>H.salmonis</b>	+	+	+	+

• + واکنش مثبت ؛ - واکنش منفی.



تصویر ۱: اشکال مارپیچی از هلیکوباکترهای غیرپیلوری در مقاطع بافتی مورد مطالعه، با رنگ آمیزی گیمسا، یافت شد.

اتاق، توسط الکل (متانول) فیکس و در پایان با استفاده از رنگ گیمسا رنگ آمیزی گردیده و توسط میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفت. هدف از تست اوره آز سریع (Rapid Urease Test) یافتن شواهدی دال بر وجود آلودگی با هلیکوباکترها در دستگاه گوارش است. مزیت این روش سریع بودن و راحتی انجام آن است به طوری که حتی در اتاق آندوسکوپی و بلافاصله بعد از اخذ نمونه از معده قابلیت انجام دارد. آنزیم اوره آز یک آنزیم هیدرولیتیک بوده که با اتصال به پیوند کربن-نیتروژن در ترکیبات آمیدی همانند اوره سبب گسستن این پیوند می گردد و محصولات نهایی مانند آمونیاک و CO<sub>2</sub> را ایجاد می نماید. در این محیط کشت از اوره به عنوان سویسترای اصلی و از (فنل سولفون فتالین) فنول رد به عنوان معرف pH استفاده می شود. جواب مثبت (تغییر رنگ از زرد به قرمز) بعد از حداقل ۳۰ دقیقه تا حداکثر ۲ ساعت (گاهها برای مثبت شدن تست به ۲۴ ساعت زمان نیاز است) قابل رویت

پس از دوازده ساعت ناشتا بودن، سداسیون و بیهوشی خفیف (غیر جراحی) در سگها توسط ترکیبی از داروهای اسپرومازین و کتامین القا گردیده و سپس اقدام به آندوسکوپی از معده آنها گردید. در طول گاستروسکوپی وضعیت مخاط نواحی مختلف معده از لحاظ وجود یا عدم وجود هرگونه موارد غیر طبیعی مانند وجود پرخونی، پتشی، اروزیون، زخم، آتروفی و... مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از بررسی کامل مخاط معده توسط آندوسکوپ، اقدام به نمونه برداری گردید (در صورت وجود موارد غیرطبیعی اولویت اخذ نمونه به این نواحی داده شد). نمونه ها از مناطق فوندوس و آنتروم معده اخذ و سپس با استفاده از روش اسمیر فشاری (نمونه اخذ شده بین دو لام تمیز قرار داده شده و با قرار دادن این دو لام بین انگشت شست و اشاره بر روی آنها فشار وارد کرده و همزمان کمی دو لام را روی هم به طرفین می لغزانیم) بافت را له می کنیم، لام های تهیه شده پس از خشک شدن در هوای



نوری نمی‌توان با قطعیت این امر را ثابت نمود و استفاده از روشهای اختصاصی‌تر مانند PCR و سایر روش‌های مولکولی مورد نیاز است. از بین لام‌های بررسی شده به روش فوق از ۵۵ لام، تعداد ۲۵ لام دارای آلودگی همزمان با چند گونه بودند که اکثراً در این‌ها اشکال شبیه به هلیکوباکتر فلیس همراه با اشکال شبیه به هلیکوباکتر بیزارونی مشاهده گردید (لازم به ذکر است که شناسایی گونه‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری ممکن نیست و در اینجا فقط تشبیه اشکال به گونه‌های مشابه جهت تجسم اشکال فضایی صورت می‌گیرد). با توجه به نتایج آزمایشات تست اوره آز و لام مستقیم به این نتیجه می‌رسیم که آلودگی سگهای ولگرد می‌تواند بین ۸۰ الی ۸۷/۵ درصد باشد (گاهی عدم مشاهده میکروارگانیسم در لام مستقیم می‌تواند ناشی از مواردی مثل عدم نمونه‌گیری از محل مناسب و یا خطاهای آزمایشگاهی باشد).

### بحث

شواهد بیانگر این موضوع هستند که هلیکوباکترهایی به جز هلیکوباکتر پیلوری می‌توانند موجب بیماری در انسان شوند. تعداد قابل توجهی از گزارشاتی که در سال‌های اخیر منتشر شده‌اند به درک بهتری از عفونتهای انسان و حیوان با گونه‌های غیر پیلوری هلیکوباکتر (NHPH) کمک کرده است (۱۸). سگ‌ها و گربه‌ها می‌توانند توسط گونه‌های مختلف هلیکوباکترها آلوده شوند و به عنوان منبعی برای آلودگی انسان مطرح گردند. زئونوز بودن این ارگانیسم‌ها، ممکن است پیامدهای بالینی در زیر مجموعه‌ای از بیماران مبتلا به بیماری‌های معده داشته باشد. در مطالعاتی که توسط Amorim و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام گرفت، مخاط معده‌ی سگ و انسان از لحاظ امکان جایگزینی گونه‌های مختلف هلیکوباکتر آزمایش شدند و نشان داده شد که مخاط معده‌ی سگ مشخصات گلیکوزیلاسیون متفاوتی از مخاط معده‌ی انسان نشان می‌دهد که گیرنده‌های اسکلت گلابیکان ممکن است در استقرار گونه‌های هلیکوباکتر نقش داشته باشد و نیز توانایی اتصال سوبیه-های مختلف هلیکوباکترها در انسان و سگ متفاوت است و کلونیزه شدن باکتری هم در معده‌ی سگ و هم در معده‌ی انسان می‌تواند خطری احتمالی برای آلودگی انسان باشد (۱۹). همچنین در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۵ توسط De Groote و همکاران انجام گرفت، گونه‌های هلیکوباکتر حیوانات در معده تعداد زیادی از بیماران مبتلا به ناراحتی‌های معده شناسایی شد (۲۰). با وجود این که در کشور ما درصد واقعی شیوع عوامل مختلف هلیکوباکتریایی مشخص نگردیده است ولی با این حال، این پژوهش می‌تواند گزارشی از رخداد و فراوانی این اجرام در سگ‌ها و بالخصوص سگ‌های ولگرد باشد. این میکروارگانیسم‌های ماریچ، دست کم حدود پنج گونه از هلیکوباکترها را شامل می‌شوند و همانگونه که ذکر گردید عقیده بر این است که آلودگی با این میکروارگانیسم‌ها می‌تواند منجر به گاستریت مزمن، زخم معده، لنفوم MALT و غیره در انسان گردد.

است. با استفاده از بافر می‌توان پایداری محیط را افزایش داده و از جواب هاب مثبت کاذب کاست. هرچند سوبیه‌های مختلف از نظر خصوصیات بیوشیمیایی مانند مثبت بودن کاتالاز و اکسیداز هوموژن‌اند ولی در سطح ژنتیکی تنوع فراوانی در بین آنها گزارش شده است. در چندین نمونه که موفق به کشت آن شدیم (به عنوان بخش دیگری از تحقیق)، وجود موارد مشابه بیوشیمیایی که در همه‌ی گونه‌های مهم هلیکوباکتر ثابت است مورد تایید قرار گرفت و تعلق باکتری‌های بدست آمده به دسته‌ی هلیکوباکترها اثبات گردید (جدول ۳). همچنین شکل ۱ اشکال ماریچی از هلیکوباکترهای غیرپیلوری در مقاطع بافتی مورد مطالعه، با رنگ-آمیزی گیمسا با استفاده از میکروسکوپ نوری را نشان می‌دهد (شکل ۱).

### یافته‌ها

در زمان گاستروسکوپی سطح مخاط معده ارزیابی و هرگونه مورد غیرطبیعی ثبت گردید. ۱۳ مورد از سگ‌ها دارای اروزیون، پتشی و یا زخم در سطح مخاط معده بوده و در ۹ مورد، پرخونی مخاطی مشاهده گردید. پرخونی از حالات ملایم تا متوسط در تغییر بوده است. در آزمایشات هیستوپاتولوژیک انجام شده تعداد ۲۱ قلاده دارای التهاب معده بوده‌اند که از این تعداد در ۱۰ مورد زخم و در ۳ مورد اروزیون و پتشی در معده مشاهده گردید. با توجه به نمودارهای ارائه شده مشاهده گردید که از تعداد ۵۵ نمونه‌ی اخذ شده از معده جهت انجام آزمایش اوره آز ۷ مورد اوره آز منفی بودند (تا ۲۴ ساعت پاسخی مشاهده نشد) و از ۴۸ مورد باقی مانده که اوره آز مثبت بودند ۱۵ مورد در ساعت اول (تا ۱ ساعت)، ۱۸ مورد در ساعت دوم، ۸ مورد در ۱۲ ساعت اول و ۷ مورد در ۲۴ ساعت اول پاسخ مثبت نشان دادند. در مورد بررسی-های انجام شده بر روی لام‌های مستقیم (اسمیر فشاری) اخذ شده از معده، از مجموع ۵۵ لام تهیه و رنگ‌آمیزی شده به روش گیمسا، در ۱۱ لام هلیکوباکتر مشاهده نشد ولی ۴۴ لام باقی مانده همگی از لحاظ مشاهده و حضور ارگانیسم‌های هلیکوباکتریایی مثبت بودند. در لام‌های مثبت با توجه به خصوصیات ظاهری میکروارگانیسم‌ها در زیر میکروسکوپ نوری (با استفاده از عدسی ۱۰۰) نظیر اندازه میکروارگانیسم، تعداد هلیکس‌ها، فشردگی هلیکس‌ها، زاویه‌دار بودن یا نبودن آنها، حضورگونه‌های مختلف از هلیکوباکترها مورد مشاهده قرار گرفت. باکتری‌های ماریچی فشرده با تعداد هلیکس زیاد و زاویه‌دار (اشکال شبیه به هلیکوباکتر فلیس) همراه با باکتری‌های ماریچی فشرده ولی دارای لبه هلیکس‌هایی به صورت غیر زاویه‌دار یا گنبدی (اشکال شبیه به هلیکوباکتر بیزارونی) مشاهده گردید و نیز هلیکوباکترهایی شبیه به هلیکوباکترسالومونیس (باکتری‌های فریه خمیده با موج‌های باز و کمتر فشرده) (به تعداد کم) و هلیکوباکترهایی شبیه به هلیکوباکتر هیلمانی (دارای هلیکس‌های زیاد و بسیار به هم فشرده و دارای طول بیشتری نسبت به سایرین) مورد مشاهده قرار گرفت، ولی با این حال با توجه به امکانات موجود و استفاده از میکروسکوپ

## نتیجه گیری

توصیه می شود، در برخورد با بیماران احتمال وجود این عوامل نیز جدی تلقی شود. با توجه به اینکه احتمال اکتساب عفونت های هلیکوباکتریایی (پیلوری و غیرپیلوری) از طریق تماس مستقیم با حیوانات وجود دارد. بنابراین، مطالعات بیشتر بر روی بیمارانی که حیوانات خانگی نگه می دارند شاید بتواند اطلاعات بیشتری در خصوص نقش این ارگانیسم ها در بیماری های انسانی فراهم آورد و با توجه به گزارشاتی مبنی بر انتقال برخی از گونه های هلیکوباکتر توسط سگها و گربه ها به انسان، به نظر می رسد که در ایران نیز باید تحقیقات وسیعی جهت یافتن ارتباط منطقی بین نگهداری سگ و گربه و همراهی آنها با انسان انجام شود. لذا این امر نیاز به بررسی های گذشته نگر و حتی بررسی های همه جانبه خواهد داشت.

این مطالعه به منظور تعیین وضعیت آلودگی معده ی سگ های ولگرد اطراف شهر تبریز به گونه های مختلف هلیکوباکترهای غیرپیلوری صورت گرفت. با توجه به گزارشات معتبر موجود، هلیکوباکتر هیلمانی عامل حدود ۱ الی ۱/۵ درصد از گاستریت های انسانی بوده و به طور کلی ۰/۲ الی ۶ درصد از گاستریت های انسانی با منشاء هلیکوباکترهای حیوانی (غیر پیلوری) ایجاد می شوند. بنابراین لازم و ضروری است این عوامل نه تنها به علت زئونوز بودن و ایجاد گاستریت بلکه به علت دارا بودن پتانسیل بالقوه در ایجاد نئوپلازی های معدی (و بخصوص دوازدهه) در انسان مورد توجه قرار گرفته و از نظر اپیدمیولوژی نیز تحقیقات وسیعی برای اثبات این امر صورت گیرد. در پایان با توجه به خطر عفونت و ارتباط آن با بدخیمی معده که امری ثابت شده است

## References

- Mandell G, Dolin R, Benntts J. *Principles and Practice of Infectious Disease*. 5<sup>th</sup> ed. New York, Churchill Livingstone, 2000; PP: 2285-2291.
- Marshall B.J, Warren J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; **7**: 1311-1315.
- Kusters J.G, Van Vliet A.H.M, Kuipers E.J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbial Rev* 2006; **19**: 449-490.
- Stolte M, Wellens E, Bethke B, Ritter M, Eidt H. *Helicobacter heilmannii* (formerly *Gastrospirillum hominis*) gastritis: an infection transmitted by animals? *Scand J Gastroenterology* 1994; **29**: 1061-1064.
- Hellemans A, Chiers K, Maes D, De Bock M, Decostere A, Haesebrouck F, et.al. Prevalence of "Candidates *Helicobacter suis*" in pigs of different ages. *Vet Rec* 2007; **161**: 182-192.
- Dore M.P, Bilotta M, Vaira D, Manca A, Massarelli G, Leandro G, et.al. High prevalence of *Helicobacter pylori* infection in shepherds. *Digest Dis Sci* 1999; **44**: 1161-1164.
- Fox J.G. Non-human reservoirs of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; **9**(Suppl2): 93-103.
- Thomson M.A, Storey P, Greer R, Cleghorn G.J. Canine-human transmission of *Gastrospirillum hominis*. *Lancet* 1994; **343**: 1605-1607.
- Stolte M, Kroher G, Meining A, Morgner A, Bayerdorffer E, Bethke B. A comparison of *Helicobacter pylori* and *H. heilmannii* gastritis. *Scand J Gastroenterology* 1997; **32**: 28-33.
- Yoshimura M, Isomoto H, Shikuwa S, Osabe M, Matsunaga K, Omagari K, et.al. A case of acute gastric mucosal lesions associated with *Helicobacter heilmannii* infection. *Helicobacter* 2002; **7**: 322-326.
- Schildt J, Grimm T, Radke M, Lobeck H. Akute Oberbauchschmerzen und Ha'matemesis. *Monatsschr. Kinderheilkd* 2000; **148**: 900-901.
- Jhala D, Jhala N, Lechago J, Haber M. *Helicobacter heilmannii* gastritis: association with acid peptic diseases and comparison with *Helicobacter pylori* gastritis. *Mod Pathol* 1999; **12**: 534-538.
- Borody T.J, George L.L, Brandl S, Andrews P, Ostapowicz N, Hyland L, et.al. *Helicobacter pylori*-negative duodenal ulcer. *Am. J. Gastroenterol* 1991; **86**: 1154-1157.
- Morgner A, Bayerdorffer E, Meining A, Stolte M, Kroher G. *Helicobacter heilmannii* and gastric cancer. *Lancet* 1995; **346**: 551-552.
- Morgner A, Lehn N, Andersen L.P, Thiede C, Bennedsen M, Trebesius K, et.al. *Helicobacter heilmannii*-associated primary gastric low-grade MALT lymphoma: complete remission after curing the infection. *Gastroenterology* 2000; **118**: 821-828.
- Uemura N, Okamoto SH, Solchiro Y. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *The new England Journal of Medicine* 2001; **345**(11): 784-789.
- Palfaman SL, Kwok T, Gabriel K. Vacillating cytotoxic A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis, 2012.

18. Flahou B, Haesebrouck F, Smet A, Yonezawa H, Osaki T, Kamiya S. (2013 *John Wiley & Sons Ltd.*)
19. Amorim I, Freitas DP, Magalhães A, Faria F, Lopes C, Faustino AM, Smet A, et.al (2014 *John Wiley & Sons Ltd* PMID: 24689986.) A comparison of *Helicobacter pylori* and non-*Helicobacter pylori* *Helicobacter* spp. binding to Canine Gastric Mucosa with Defined Gastric Glycophenotype.
20. De Groote, Van Doorn LJ, Van den Bulck K, Vandamme P, Vieth M, Stolte M, et.al. Detection of non-pylori *Helicobacter* species in "*Helicobacter heilmannii*"-infected humans. *Helicobacter* 2005; **10**(5): 398-406.