اثر ضد میکروبی پروبیوتیک‌های لاکتیک جدا شده از فلور روده کودکان اصفهان علیه پاتوژن‌های شایع دستگاه گوارش

حسین فاضلی[۱]، آزاده صامتی[۲]

۱. دکتری تخصصی(Ph.D) میکروبیولوژی، استادیار دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
۲. دکترای حرفه ای پزشکی عمومی ، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

* **نشانی برای مکاتبه:** : اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیولوژی تلفن: ۷۹۲۲۴۳۹-۰۳۱۱ ، h_fazeli@med.mui.ac.ir

دریافت مقاله: بهمن هشتاد و شش **پذیرش برای چاپ: اردیبهشت هشتاد و هفت**

چکیده

سابقه و هدف: *امروزه یکی از راه کارهای پیشنهادی جهت پیشگیری و درمان عفونتهای دستگاه گوارش استفاده از پروبیوتیک ها می باشد. از عوامل مهم در اثر بخشی پروبیوتیک ها ، منشا جداسازی(غذایی یا انسانی) ومنطقه جغرافیایی جداسازی پروبیوتیک ها است. پروبیوتیک های موجود در کشور ما اغلب تجاری هستند. لذا این مطالعه با هدف تعیین تاثیر پروبیوتیک های جدا شده از فلور روده کودکان شهر اصفهان علیه پاتوژن های شایع دستگاه گوارش به منظور معرفی پروبیوتیکهای با منشاء داخلی انجام گردید.*

روش کار: *در این مطالعه تجربی اثر ضد میکروبی پروبیوتیکهای لاکتیک رامنوسوس(L519)،اسیدوفیلوس(SH5)،پلانتاروم(A7) جدا شده از فلور روده کودکان علیه پاتوژن های شایع دستگاه گوارش (شیگلا دیسانتری PTCC1188)،سالمونلا تیفی موریوم(PTCC 1622)واشرشیاکلی انتروپاتوژن(PTCC 1270))با روش انتشار در آگار با ایجاد چاهک تعیین گردید.به منظورکاهش خطاهرازمون۳بار تکرارشد و میانگین قطرهاله عدم رشد سه پروبیوتیک با نرم افزارآماری(SPSS(version 13 مقایسه گردید.*

یافته ها: *متوسط قطر هاله عدم رشد برای سه پروبیوتیک (۱/۵۷mm+-۱۳/۴).بود . بیشترین اثر مهاری مربوط به لاکتوباسیلوس پلانتاروم علیه سالمونلا تیفی موریوم ۰/۰۵۷ +/- ۱۶/۳۳ میلی متر (۱۴/۸۹ تا ۱۷/۷۶ میلی متر با حدود اطمینان ۹۵٪) و کمترین اثر مهاری مربوط به لاکتوباسیلوس رامنوسوس علیه اشرشیاکلی انتروپاتوژن بود ۰/۵۷ +/- ۱۱/۳۳ میلی متر (۹/۸۹ تا ۱۲/۷۶ میلی متر با حدود اطمینان ۹۵٪).*

نتیجه گیری: *هر۳ پروبیوتیک لاکتیک دارای اثرمهاری چشمگیری علیه پاتوژنهای شایع دستگاه گوارش بودند. و مقایسه آن با مطالعات بر روی پروبیوتیکهای با منشاغذایی و تجاری نشان دهنده تاثیر بیشتر انهاست. از این روپیشنهاد می گردد درانتخاب وکاربردپروبیوتیک ها به منشاء جداسازی ومنطقه جغرافیایی منطبق با آن توجه گردد.*

واژگان کلیدی : ***لاکتوباسیلوس،پروبیوتیک،پاتوژن های روده ای***

مقدمه

بیماری‌های حاد دستگاه گوارش در سراسر جهان ، دومین رتبه را (تنها پس از بیماری‌های حاد دستگاه تنفس فوقانی) به خود اختصاص داده‌اند. از جمله شایع ترین عوامل باکتریال در عفونت‌های گوارشی شیگلادیسانتری ، سالمونلاتیفی‌موریوم ، اشرشیاکلی (انتروهموراژیک ، انترو پاتوژنیک و ...) ، یرسینیاانتروکولیتیکا و کامپیلوباکترژژونی است(۳-۱).

امروزه بدلیل دسترسی آسان ، قیمت نسبتا ارزان و بروز بیماری‌های مختلف مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها چنان فراوان و وسیع انجام می‌گیرد که منجر به شکل‌گیری جمعیت‌های باکتریایی مقاوم و متعاقب آن مشکلات درمانی حتی در مواردی که بیماری بنظر ساده می‌آید و همینطور بروز عوارض جانبی بر میزبان و ضرر و زیان اقتصادی شده است . طبق تعریف WHO پروبیوتیک‌ها عبارتند از میکروارگانیسم‌های زنده که وقتی در مقادیر متعادل مورد استفاده قرار بگیرند در سلامتی میزبان مفید خواهند بود. شرایط انتخاب پروبیوتیک طبق توصیه FAO/WHO این است که پروبیوتیک‌ها باید قادر به اعمال اثرات مفید خود بر روی میزبان به واسطه رشد و فعالیت در بدن انسان باشند (۴). ایده پروبیوتیک‌ها به دهه اول قرن بیستم برمی‌گردد.وقتی که باکتریولوژیست اوکراینی Elie Metehnikof برنده جایزه نوبل (۱۹۰۸) طی مطالعه فلور روده انسان این فرضیه را ارائه کرد که طول عمر و سلامتی مردم بلغار نتیجه مصرف فراورده‌های لبنی می‌باشد. وی مدتها بعد ثابت کرد که ماست حاوی ارگانیسم‌های ضروری جهت محافظت روده از اثرات مخرب سایر باکتری‌های خطرناک می‌باشد(۷-۵).

داده‌های علمی‌اخیر از نقش مهم پروبیوتیک‌ها به عنوان بخشی از یک رژیم غذایی سالم برای انسان جهت جلوگیری از عفونت‌های میکروبی به شدت حمایت می‌کنند(۸) و از جمله مهمترین کاربردهای پروبیوتیک‌ها می‌توان به نقش آنها در پیشگیری و درمان اسهال عفونی حاد اشاره کرد.

اکثر پروبیوتیک‌های موجود ، منشا تجاری داشته و تحقیقات بر روی آنها در کشور ما تنها محدود به مطالعات پایه بوده است . این گونه تحقیقات در جوامع دیگر به لحاظ ویژگی و اهمیتی که در موضوع حس می‌شود سال‌هاست که در حال پیگیری می‌باشد اما در کشور ما کاملا نوپا بوده و زمینه برای تحقیقات گسترده و منطبق بر شرایط بهداشتی ، جغرافیایی ، اپیدمیولوژیک ، اقتصادی ، اجتماعی و فرهنگی بر روی این مساله مهم مهیا می‌باشد. علیرغم تمام مطالعات انجام شده برای تاثیر بیشتر پروبیوتیک‌ها بر روی عوامل مولد اسهال باید در هر منطقه مطالعاتی از این دست بصورت جداگانه و منطبق بر شرایط آن منطقه صورت پذیرد(۹). این مطالعه با هدف تعیین اثر ضد میکروبی پروبیوتیک‌های لاکتیک جدا شده از فلور روده کودکان اصفهان علیه پاتوژن‌های شایع دستگاه گوارش انجام شد.

روش کار

این مطالعه از نوع تجربی بوده که برروی باکتری‌های لاکتیک جدا شده از فلور روده کودکان شهر اصفهان (طی مطالعه قبلی) انجام گردید(۱۰).

۳ سویه شایع پاتوژن دستگاه گوارش شامل شیگلادیسانتری (PTCC 1188) ، سالمونلاتیفی موریوم (PTCC 1622) و اشرشیاکلی انتروپاتوژنیک (EPEC) (PTCC 1270) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران بصورت لیوفیلیزه تهیه گردید و برطبق دستورالعمل همراه آن بر روی محیط Nutriant Broth(NB) و Nutriant Agarاحیاء گردید . سپس هر ۳ پاتوژن تحت بررسی با تست ها بیوشیمیایی استانداردقرار گرفتند. تست SIM,TSI ، آزمون MR , VP و تست سیترات و تولید اندول در مورد هر ۳ سویه انجام گرفت تا مطمئن شویم که این باکتری‌ها سویه‌های مورد نظر ما می‌باشند.

۳ سویه لاکتوباسیلوس متعلق به گونه‌های رامنوسوس (L_{519}) ، اسیدوفیلوس (SH_5) و پلانتاروم (A_7) که طی مطالعه قبلی در دانشگاه صنعتی اصفهان از فلور روده کودکان شهر اصفهان جداسازی شده بود برای بررسی اثر آنتاگونیستی انتخاب گردید و برای انجام مطالعه سوپر ناتانت (عصاره) این لاکتوباسیلوس‌ها از دانشگاه فوق الذکر با حفظ دمای ۴ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انتقال یافت .

تهیه سوسپانسیون میکروبی استاندارد به روش رشد (Growth method)انجام شد و طی آن ۴-۳ کلنی مشابه و یکسان باکتری رشد یافته روی محیط جامد به ۵-۴ میلی‌لیتر محیط NB اضافه کرده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۶-۲ ساعت قرار دادیم تا به کدورت حدود ۰/۵ مک فارلند برسد(۱۵-۱۱).

برای بررسی اثر ضد میکروبی از سوسپانسیون باکتری‌های پاتوژن با سواپ سر پنبه استریل به محیط کشت مولر هینتون به طور یکنواخت تلقیح گردید. پلیت‌های حاوی کشت مولر هینتون به ضخامت ۶میلی متر و کاملا استریل آ ماده گردید. مکان چاهک‌ها در پشت پلیت مشخص گردید تا فاصله بین آن‌ها یکسان باشد. سپس در هر پلیت از پاتوژن مورد نظر کشت صورت گرفت و بعد به کمک پیپت پاستور استریل که برای هر پلیت جداگانه استفاده می‌شد چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر ایجاد کرده و سپس ته چاهک‌ها را برای جلوگیری از انتشار محلولی که بعدا در آن می‌ریزیم ، با محلول مولتن آگار مذاب کاملا مسدود کرده و سپس از محلول رویی پروبیوتیک‌های فیلترشده (سوپرناتانت) مورد مطالعه به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر در داخل هر چاهک ریخته شد بطوری که سطح محلول با سطح محیط کشت در یک خط قرار بگیرد. پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. قطر هاله عدم رشد از پشت پلیت به وسیله خط کش و بر حسب میلی‌متر خوانده و گزارش شد. برای افزایش دقت و حساسیت ، هر آزمون حداقل ۳ بار تکرار گردید و از میانگین ۳ آزمون برای ارزیابی نتایج استفاده گردید. نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (Version 13) و آزمون ANOVA مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها

پس از ۳ بار آزمون و گزارش نتایج ، داده‌ها توسط نرم افزار آماری SPSS (Version 13) ، (آزمون ANOVA)آنالیز شد. همه پروبیوتیک‌ها اثر مهاری بر رشد پاتوژن شیگلا دیسانتری داشت و میانگین مجموع قطر هاله عدم رشد در مواجهه با هر پروبیوتیک برابر ۱/۴۵ -/+ ۱۳/۸۸ میلی متر(۱۲/۷۷ تا ۱۵ میلی متر با حدود اطمینان ۹۵٪) بود. مقایسه بین داده‌ها حاکی از آن است که لاکتوباسیلوس پلانتاروم بیشترین اثر مهارکنندگی را بر رشد این پاتوژن اعمال کرده و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس دارای کمترین اثر مهاری بوده است (جدول ۱). مقایسه‌ای که بین میانگین‌های حاصل از قطر هاله عدم رشد این پاتوژن در مواجهه با سه پروبیوتیک مورد نظر به عمل آمد نشان دهنده معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها بود($P < ۰/۰۰۲$).

هم چنین همه پروبیوتیک‌ها اثر مهاری بر رشد پاتوژن سالمونلا تیفی موریوم داشته‌اند و میانگین مجموع قطر هاله عدم رشد در مواجهه با هر پروبیوتیک ۲/۱۷ -/+ ۱۳/۶۶ میلی متر (۱۱/۹۹ تا ۱۵/۳۴ میلی متر با حدود اطمینان ۹۵٪) بود. مقایسه بین داده‌ها حاکی از آن است که لاکتوباسیلوس پلانتاروم بیشترین اثر مهارکنندگی را بر رشد این پاتوژن اعمال کرده و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس دارای کمترین اثر مهاری بوده است(جدول۲). مقایسه‌ای که بین میانگین‌های حاصل از قطر هاله عدم رشد این پاتوژن در مواجهه با سه پروبیوتیک مورد نظر به عمل آمد نشان دهنده معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها بود($P < ۰/۰۰۱$).

همه پروبیوتیک‌ها اثر مهاری بر رشد پاتوژن اشرشیا کلی داشته‌اند و میانگین مجموع قطر هاله عدم رشد در مواجهه با هر پروبیوتیک برابر ۱/۱۱ -/+ ۱۲/۶۶ میلی متر (۱۱/۸ تا ۱۳/۵۲ میلی متر با حدود اطمینان ۹۵٪) بود. مقایسه بین داده‌ها حاکی از آن است که لاکتوباسیلوس پلانتاروم بیشترین اثر مهارکنندگی را بر رشد این پاتوژن اعمال کرده و لاکتوباسیلوس رامنوسوس دارای کمترین اثر مهاری بوده است(جدول۳).

جدول ۱: میانگین قطر هاله‌ای عدم رشد شیگلادیسانتری در مواجهه با سه پروبیوتیک

پروبیوتیک‌ها	تعداد	میانگین	انحراف معیار	ضریب اطمینان ۹۵٪ برای میانگین		حداقل قطر (میلی‌متر)	حداکثر قطر (میلی‌متر)
				حد پایین	حد بالا		
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	۳	۱۲/۷	۰/۶	۱۱/۲	۱۴/۱	۱۲/۰	۱۳/۰
لاکتوباسیلوس رامنوسوس	۳	۱۳/۳	۰/۶	۱۱/۹	۱۴/۸	۱۳/۰	۱۴/۰
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	۳	۱۵/۷	۰/۶	۱۴/۲	۱۷/۱	۱۵/۰	۱۶/۰
میانگین مجموع	۹	۱۳/۹	۱/۵	۱۲/۸	۱۵/۰	۱۲/۰	۱۶/۰

Pvalue=۰/۰۰۲

جدول ۲: میانگین قطر هاله‌ای عدم رشد سالمونلا تیفی موریوم در مواجهه با سه پروبیوتیک

پروبیوتیک‌ها	تعداد	میانگین	انحراف معیار	ضریب اطمینان ۹۵٪ برای میانگین		حداقل قطر (میلی متر)	حداکثر قطر (میلی‌متر)
				حد پایین	حد بالا		
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	۳	۱۱/۷	۰/۶	۱۰/۲	۱۳/۱	۱۱/۰	۱۲/۰
لاکتوباسیلوس رامنوسوس	۳	۱۳/۰	۱/۰	۱۰/۵	۱۵/۵	۱۲/۰	۱۴/۰
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	۳	۱۶/۳	۰/۶	۱۴/۹	۱۷/۸	۱۶/۰	۱۷/۰
میانگین مجموع	۹	۱۳/۷	۲/۲	۱۲/۰	۱۵/۳	۱۱/۰	۱۷/۰

Pvalue=۰/۰۰۱

جدول ۳: میانگین قطر هاله‌ای عدم رشد اشرشیاکلی انتروپاتوژن در مواجهه با سه پروبیوتیک

پروبیوتیک‌ها	تعداد	میانگین	انحراف معیار	ضریب اطمینان ۹۵٪ برای میانگین		حداقل قطر (میلی متر)	حداکثر قطر (میلی‌متر)
				حد پایین	حد بالا		
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	۳	۱۳/۰	۰/۰	۱۳/۰	۱۳/۰	۱۳/۰	۱۳/۰
لاکتوباسیلوس رامنوسوس	۳	۱۱/۳	۰/۶	۹/۹	۱۲/۸	۱۱/۰	۱۲/۰
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	۳	۱۳/۷	۰/۶	۱۲/۲	۱۵/۱	۱۳/۰	۱۴/۰
میانگین مجموع	۹	۱۲/۷	۱/۱	۱۱/۸	۱۳/۵	۱۱/۰	۱۴/۰

Pvalue=۰/۰۰۲

بحث

مطالعات متعددی درباره تاثیرپروبیوتیک در سلامت دستگاه گوارش صورت گرفته است(۱۶) و بیانگر این امر می باشد که عواملی چون نوع پروبیوتیک،منشا جدا سازی آن و منطقه جغرافیایی که پروبیوتیک جدا سازی شده است،می تواند بر میزان اثر بخشی پروبیوتیک موثر باشد. این مطالعه با هدف تعیین تاثیر پروبیوتیک های لاکتیک جدا شده از فلور روده کودکان در شهر اصفهان بر روی پاتوژن های شایع دستگاه گوارش صورت گرفته است. نتایج حاصل از مطالعه فوق نشان داد که هر سه پروبیوتیک مورد مطالعه اثر مهاری بسیار چشمگیری بر رشد پاتوژن های مورد نظر داشته است که قابل مقایسه با مطالعات سایر همکاران می باشد.

فعالیت ضد میکروبی و تولید باکتریوسین لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس برویس بوسیله Ogunbanw و همکاران مورد بررسی قرار گرفت .آنها توانستند با کمک روش چاهک نشان دهند که این دو لاکتوباسیلوس از رشد اشرشیاکلی (۸-۶$_{mm}$) و باسیلوس سرئوس (۱۰-۸$_{mm}$) و یرسینیاانتروکولیتیکا(۷-۶$_{mm}$) جلوگیری می‌کنند (۱۷). Conconnier و همکاران گزارش کردند که مصرف محلول روئی کشت لاکتوباسیلوس فرمنتوم و لاکتوباسیلوس کازئی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس لاکتیس اثر باکتریسیدالی برضد طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی پاتوژن ایجاد می‌کند (۱۸).

در مطالعه فوق نیز آنچه در نتایج به صورت مشخص به چشم می‌خورد اثر مهاری قوی‌تر لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر روی هر سه پاتوژن شیگلادیسانتری، سالمونلا تیفی موریوم و اشرشیاکلی انتروپاتوژن میباشد.

در متاآنالیز حاصل از ۱۲ مطالعه بر روی پروبیوتیک‌ها برای جلوگیری از اسهال مسافران نشان داده شد که پاکتری های لاکتیک خطر بروز اسهال مسافران را بدون عوارض جدی بر میزبان کاهش دادند(خطر نسبی برابر ۰/۸۵، ۰/۹۱ تا ۰/۹۷ با حدود اطمینان ۹۵٪) (۱۹). در مطالعه ما هر ۳ پروبیوتیک بر هر ۳ پاتوژن اثر مهاری خود را با ایجاد هاله عدم رشد نشان دادند . اگرچه اثر مهاری لاکتوباسیلوس پلانتاروم دارای اختلاف معنی‌داری با ۲ پروبیوتیک دیگر در مواجهه با هر پاتوژن و در مقایسه بین ۳ پاتوژن بود . نتایج شاخصی که در مطالعه ما به چشم می‌خورد حاکی از آن است که احتمالا منشا تهیه پروبیوتیک‌ها در مهار رشد پاتوژن تاثیر بسزائی دارد .یعنی نتایج حاصل از پروبیوتیک‌های مطالعه ما که از فلور روده کودکان جدا شده‌اند نسبت به مطالعاتی که منشا پروبیوتیک‌های آنان از ماست و سایر فراورده‌های لبنی بوده ، بهتر می‌باشد. دلایل دیگری که برای این اثر مهاری مناسب مطرح است تولید اسید لاکتیک بیشتر ، بهتر عمل کردن باکتریوسین و انزیم های حاصل از پروبیوتیک های فلور نرمال روده می‌باشد که تایید این احتمالات مستلزم مطالعات بیشتر و دقیق‌تر در آینده است.

تشکر و قدردانی

در این تحقیق حوزه معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ما را همراهی و پشتیبانی نمودند که بدینوسیله از آنها کمال تشکر و قدردانی را داریم.

REFERENCES

1. Talan D, Moran GJ, et al. Etiology of bloody diarrhea among patients presenting to united states emergency departments : prevalence of Escherchia Coli o 157 : H7 and other enteropathogens . Clin Infect Dis, 2001 ; 32: 573.

2. Premliminary Foodnet data on the incidence of food borme illness—selected sites united states , 2002 . MMWR More Mortal Wkly rep, 2003 ;P52 :340.

3. Ray SM, Ahuga SD,et al. Population, based, surveillance for yersinia entro colitica infections in foodnet – sites, 1996-1999 : higher risk of disease in infants and minority populations. Clin Infect Dis, 2004 ;38 suppl3 : 5181

4.Food and Agriculture Organization Expert Consultation. Evaluation of health and nutritional properties of powdr milk and live lactic acid bacteria. Cordoba,Argentina : Food and Agriculture Organization of the united Nations and World Health Organization ; 2001. Available from : ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf (Accessed 27 Octobr 2006).

5. Silva M, Jacobus NV, et al.Antimicrobial substance from human lactobacillus strain.Antimicrob Agents Chemother ,1987 ;31: 1231-1233.

6. Lewis SJ ,Freedman AR.The use of biotherapeutic agents in the prevention and treatment of gastrointestinal disease.Aliment Pharmacol Ther ,1998;12:807-822.

7. Isolauri E , et al. Probiotics: effects on immunity.Am J Clin Nutr 2001 ;73(Suppl. 2): S444-S450.

8. Parvez S, et al. Probiotics & their fermented food products are beneficial for health. Journal of Applied Microbiology, 2006; 100: 1171-1185.

9.Huebner ES,Surawicz CM.Probiotics in the prevention and treatment of gastrointestinal infections.Gastroenteral Clin North Am,2006;35(2):355-365.

10.Mirlohi M,Fazeli H, Soleimanian S. Lactobacillus Isolation , Identification and spesies distribution in Iranian infant feaces . The first congress of clinical Microbiology . Shiraz-Iran (unpublished) . 2007.10.23.

11. Baily and Scotts . Diagnostic microbiology . W.B.Sanders companym , Philadelphia, 2000;P:613-618

12. Cohnie R.Mahon. Grorge Mannselis. Text book of diagnostic microbiology sec edit . W.B.Sanders company .2004;81-82,330-341.

13. Gerald.L.Mandell. John E. Benett. Raphael Dolin .Principle and practice of infectious disease. 5th edit. Vol.4.philaDELPHIA, Churchill livingtone; 2000;2068-2098.

14. National committee for clinical laboratory standards. Methods for dilution-antimicobial susceptibility testing for bacteria that growth aerobically. 5th ed.Approved standard M7-A5 . national committee for clinical laboratory standards ;2000.

15. Topply willson.Microbiology and microbial infectiona, vol.2, Arnold, New York;2000.

16. Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases : Antibiotics , Probiotics & prebiotics. Gastroenterology 2004 ;126 : 1620.

17. Ogunbanwo ST. Sanni AI, Onilude A A. Characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum Fl and Lactobacillus brevis OGI. African Journal of Biotechnology. 2003;2(8): 219-227 .

18. Coconnier MH, Lievin V,Hemery E, Servin AL. Antagonistic activity against Helicobacter infection in vitro and in vivo by the human Lactobacillus acidophilus strain LB.Appl Environ Microbiol. 1998;64 : 4537-4580.

19. McFarland LV. Meta-analysis of Probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. Travel MFed infect Dis 2007 ; 5:97.