

بررسی تأثیر پروبیوتیک‌های بومی ایران بر درماتوفیتوزیس ناشی از میکروسپروم کانیس در رت نر نژاد ویستار در شرایط آزمایشگاه

نیره اکبری فاضلی^{۱*}، حمید آزادگان قمی^۲، امیرحسین مؤمن^۳

۱. دانش آموخته گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان، همدان، ایران

۲. عضو هیات علمی، گروه پرستاری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک، اراک، ایران

۳. عضو هیات علمی، گروه میکروبیولوژی، علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان، همدان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۱۹)

چکیده

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌هایی زنده هستند که اثرات مفیدی بر میزبان اعمال کرده و غالباً به صورت مکمل‌های غذایی یا دارویی استفاده میشوند. امروزه تولید محصولات پروبیوتیک وسعت جهانی یافته و از خصوصیات عملکردی این میکروارگانیسم‌ها تقویت سیستم ایمنی، کاهش کلسترول سرمی، کاهش عفونت‌های گوارشی، کاهش احتمال ابتلا به سرطان، کاهش آلرژی‌های پوستی و غیره است. بیماری‌های قارچی جلدی عفونت‌هایی هستند که در اثر حمله گونه‌های مختلف درماتوفیت‌ها به اپیدرم پوست انسان یا حیوان ایجاد می‌گردد و به نسوج کراتین دار پوست و ضمایم آن حمله کرده که باعث ایجاد عفونت‌هایی با علائم بالینی خفیف یا شدید می‌گردند. در این تحقیق با استفاده از روش‌های هیستوپاتولوژی و بررسی عملکرد پروبیوتیک‌ها بر روی قارچ میکروسپروم کانیس، تأثیر پذیری آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام این آزمون ابتدا پروبیوتیک مناسب را در شرایط آزمایشگاهی انتخاب و در ادامه ۴۰ رت نر نژاد ویستار با وزن و سن یکسان در شرایط استاندارد آزمایشگاه به صورت تصادفی به ۵ گروه کنترل مثبت، منفی و ۳ گروه آزمون تقسیم شد، که روند درمان آن‌ها در بعد از ایجاد آلودگی، بصورت خوراکی (گاواژ) و پماد پس از رسیدن به نهایت آلودگی بررسی گردید، که سوبه‌های زنده پروبیوتیک مقاومت سلول‌های اپیتلیالی را افزایش می‌دهند، فسفوریلاسیون پروتئین‌های سیتواسکتون و اتصالات محکم در سلول‌های HT-29 و Caco-2 را تسهیل می‌کنند. همچنین متابولیت‌های پروبیوتیک‌ها رگزایی را القاء می‌کنند و باعث انباشت پروتئولیکان‌ها می‌شوند و زخم را ترمیم می‌کنند، پروبیوتیک‌ها مکانیزم ضد میکروبی شامل ترشح پپتیدهای ضد میکروبی، مهار هجوم باکتری‌ها و مهار چسبندگی باکتری‌های پاتوژن به سلول‌های اپیتلیالی دارند که مانع ایجاد عفونت در زخم می‌گردند که نتیجه آن تأثیر مثبت پروبیوتیک‌ها بر روی قارچ میکروسپروم کانیس بوده است.

کلیدواژگان

پروبیوتیک، درماتوفیتوزیس، میکروسپروم کانیس.

* نویسنده مسئول، رایانامه: n.fazeli70@yahoo.com



مقدمه

درماتوفیتوز، کچلی یا قارچ پوستی یک بیماری شایع پوستی در سگ و گربه و انسان‌هاست که به وسیله قارچ‌هایی به نام درماتوفیت به وجود می‌آیند. مو و ناخن نیز از کراتین تشکیل شده‌اند به همین دلیل قارچ‌های درماتوفیتی می‌توانند پوست، مو و پنجه‌های حیوان یا انسان را آلوده کنند (جیلی و همکاران^۱، ۱۹۸۴). سه نوع قارچ درماتوفیتی شایع در سگ و گربه به نامهای میکروسپوروم کنیس میکروسپوروم ژئیسوم و تریکوفیتون منتاگروفیس وجود دارند. نوع اول معمولاً از یک حیوان به حیوان دیگر انتقال پیدا می‌کند، نوع دوم از طریق خاک به حیوانات سرایت کرده و سوم از طریق جوندگان مثل موش به حیوان انتقال پیدا می‌کند. درماتوفیت‌ها باعث سست شدن موها شده به طوری که به راحتی موها ریزش پیدا کرده و این ریزش مو باعث ایجاد حالت کچلی معمولاً گرد یا سکه مانند در آن ناحیه می‌شود. اصطلاح پروبیوتیک که ریشه لاتین دارد به معنی «برای زندگی»^۲ است و سازمان جهانی بهداشت، این اصطلاح را به «ارگانسیم‌های زنده‌ای» اطلاق می‌کنند که در صورت مصرف به میزان لازم، اثرات «سلامت‌زایی» موثری برای میزبان خود دارند. مطالعات نشان می‌دهد که مصرف پروبیوتیک‌ها از ابتلا به حساسیت‌های پوستی و غذایی در اطفال، برخی عفونت‌های باکتریایی، زایمان زودرس، بیماری التهابی روده، عفونت‌های رایج مثانه و گوش، خرابی دندان‌ها، اسهال مزمن و اسهال مسافرتی جلوگیری می‌کند. حتی معلوم شده این باکتری‌ها باعث کاهش میزان کلسترول خون شده و با کاهش مواد سرطان‌زا،

از بعضی سرطان‌های خاص هم جلوگیری می‌کنند. این باکتری‌ها می‌توانند با استقرار در محیط روده تعادل میکروبی را در جهت افزایش سودمندی آن‌ها اصلاح کنند و با فعالیت خود مانع از فعالیت میکروارگانسیم‌های غیر مفید و بیماری‌زا می‌گردند. همچنین این باکتری‌ها در روده به صورت رابطه همسفرگی زندگی می‌کنند (استنتون و همکاران^۳، ۲۰۰۱).

مواد و روش

تهیه ی پروبیوتیک

- آماده سازی پروبیوتیک ها و قرار گرفتن در اختیار نمونه ها: برای این منظور ابتدا باکتری‌های پروبیوتیک بومی ایران با توانایی تولید ترکیبات ضد میکروبی از شرکت تک ژن به صورت پودر لیوفیلیزه تهیه شد. ۳۰ نوع نمونه پروبیوتیک با نام های اختصاری زیر تهیه گردید و در محیط MRS^۴ هریک در یکی از لوله ها تلقیح گردید؛ لوله ها را در انکوباتور ۳۷ درجه گذاشته و دو روز به آن اجازه داده شد تا کاملاً رشد نماید کدورت ایجاد نشانه رشد بود.

- تهیه ی کشت تازه: ابتدا محیط کشت SCC (سابروز کلرامفنیکل سیکلوهگزامید) ساخته شد و قارچ میکروسپوروم کانیس دریافتی از مرکز تحقیقات صنعتی ایران را بر روی محیط کشت ساخته شده کشت داده شد. ۷ تا ۱۰ روز زمان نیاز بود تا در دمای ۲۶-۲۸ درجه قارچ ما به نهایت رشد خود برسد. باید از قارچ های رشد یافته لام تهیه نمود تا تاییدی بر صحت نمونه قارچی مورد استفاده باشد. برای تهیه سوسپانسیون قارچی از اسپور قارچ های رشد یافته تراشیده و درون سرم فیزیولوژی حل نمودیم در طول موج ۶۴۰ نانومتر میزان رقت را اندازه گیری نمودیم

3. Stanton, Gardiner et al
4. Man rogosasharpe agar

1. Gillil,etal
2. For life



های مختلف شامل شروع کار و هفته‌های اول، دوم، سوم و چهارم وسعت زخم‌ها در گروه‌های مختلف اندازه‌گیری شد.

- شروع درمان: رت‌ها به صورت تصادفی به ۵ گروه تقسیم شدند. گروه کنترل منفی که در آن‌ها فقط قارچ بیماری‌زا تلقیح شده ولی درمانی صورت نگرفت. گروه کنترل مثبت که در آن پس از ایجاد عارضه بیماری، درمان با پایه پماد (اوسرین) صورت گرفت. رت‌های گروه تجربی ۱ بلافاصله پس از تلقیح سوسپانسیون قارچ میکروسپوروم کانیس توسط پروبیوتیک‌ها ترکیب شده با پایه اوسرین به صورت پماد بر روی سطح ضایعه روزانه مالیده شده است، همچنین رت‌های گروه تجربی ۲ نیز پس از بروز عارضه که حداقل ۷ روز به طول انجامید توسط پماد تهیه شده‌ی پروبیوتیک‌ها دوره‌ی درمان را طی نمودند. گروه تجربی ۳ نیز پس از تلقیح قارچ مذکور و ایجاد عارضه‌ی پوستی توسط پروبیوتیک به مدت ۲۱ روز با ۱ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری به صورت درون معدی گواژ شدند.

- روش تولید و استفاده از پماد پروبیوتیک: ۰/۱ گرم از پروبیوتیک مصرفی را در یک گرم پایه پماد (اوسرین) ترکیب نموده و روزی یکبار به محل عارضه مالیده شد.

- کشتن رت‌ها و تهیه بافت از آن‌ها: در پایان مرحله رسیدن به نهایت آلودگی نمونه‌ها و در پایان درمان توسط پروبیوتیک رت‌ها توسط کلروفرم کشته شدند و از محل ایجاد عارضه بافت جدا شده و آن را برای ادامه کار که شامل تهیه لام و رنگ نمودن آن بود درون فرمالین نگهداری شد. روش مورد مطالعه روش هیستوپاتولوژی می‌باشد.

که میزان مشاهده شده بین ۰/۱ - ۰/۰۸ بود در این حالت در ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون سلول قارچ خواهد بود.

- تعیین حداقل غلظت مهارتی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC): جهت انجام آزمایشات کمی برای تعیین (MIC)^۱ و (MFC)^۲ از پروبیوتیک‌ها رقت‌های ۱۰-۰/۱ درصد در محیط ساپرو دکستروز برآش تهیه گردید. سپس به هر کدام از رقت‌ها ۱۰۰ لاندا قارچ فعال اضافه گردید. در کنار لوله‌ها از کنترل مثبت (محیط کشت حاوی قارچ) و کنترل منفی (محیط کشت بدون قارچ) استفاده گردید. در نهایت لوله‌ها به مدت ۴۸ ساعت در ۲۵ درجه سانتیگراد انکوبه و سپس نتایج قرائت گردید و تمام لوله‌های بدون کدورت بر روی محیط ساپرو دکستروز آگار کشت داده شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت انکوباسیون در ۲۵ درجه سانتیگراد آخرین رقتی از عصاره‌ها که قادر به مرگ ۹۹٪ درصد از قارچ‌های زنده اولیه بود به عنوان MFC در نظر گرفته شد.

مرحله Invitro تأثیر پروبیوتیک بر میکروسپوروم کانیس و ایجاد ضایعه

پس از یافتن پروبیوتیک مناسب و اطمینان از این موضوع که پروبیوتیک‌ها بر قارچ میکروسپوروم کانیس موثر می‌باشند ابتدا موهای روی سر رت‌ها را تراشیده شد در ادامه توسط یک پارچه زبر در سطح منطقه فوق خراش ایجاد و قارچ میکروسپوروم کانیس به میزان 10^8 cfu/ml در منطقه مورد نظر تلقیح شد. برای آلوده نمودن سوسپانسیون قارچی را با اوسرین (پایه پماد با عدم عوارض جانبی) ترکیب نموده و بر روی محل تراشیده شده مالش داده و روی آن را به مدت ۴۸ ساعت پوشاندیم پس از یک هفته اولین علائم آلودگی نمایان شد که پس از آن در زمان

1. Minimum inhibitory concentration
2. Minimum fungicidal concentration



یافته ها

مرحله Invivo تحقیق

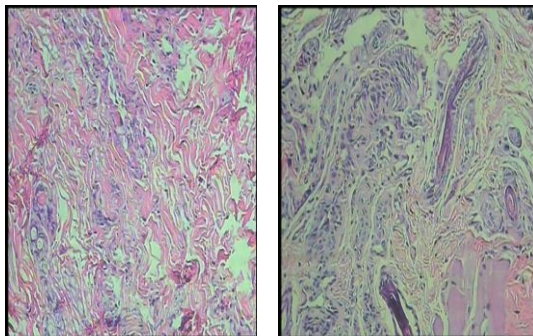
جدول ۱- مقایسه هاله عدم رشد قارچ میکروسپوروم کانیس در برابر پروبیوتیک های موثر

ردیف	نام پروبیوتیک	میانگین قطر هاله	MIC (my/ml)	MFC (my/ml)
۱	S9	8/5mm	2/9	4/9
۲	T16	6mm	5/7	8/7
۳	60M-1	6mm	7/7	9/7
۴	Y10	5/6mm	9/6	2/7
۵	Y2 F3	5mm	7/6	7
۶	Cb-z	4/5mm	2/6	4/6
۷	H13-L1	3mm	8/4	2/5

اسلاید های تهیه شده از بافت ها

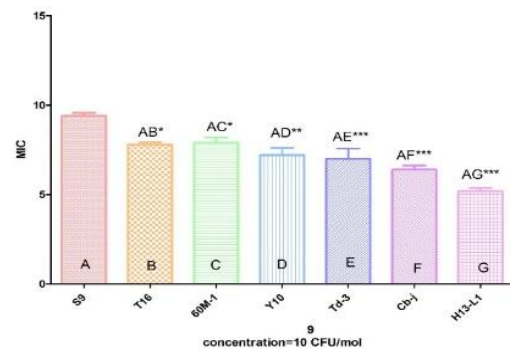
در راستای تایید نتایج حاصل از تحقیق در سه مرحله از رت ها بافت تهیه شد که نتایج آن به شرح زیر می باشد :

- سری اول: رت های آلوده (پس از سه هفته و رسیدن به اوج آلودگی): بررسی لام تهیه شده از برش پوستی در سری دوم رت ها که مشتمل بر اپیدرم، درم و فولیکول های مو بود؛ نشان دهنده آثاری از جای زخم، تشکیل بافت گرانوله و نفوذ سلول های التهابی می باشد . این لام که به روش H & E (هماتوکسیلین وائوزین) رنگ آمیزی شده بود نشان داد که آلودگی با قارچ میکروسپوروم کانیس به درستی صورت پذیرفته و عناصر قارچی در اپیدرم یا فولیکول های مو دیده شد.



شکل ۲- لام های تهیه شده از برش پوستی رت های درمان شده

- سری دوم: رت های درمان شده (پس از چهار هفته درمان): بررسی لام تهیه شده از برش پوستی که مشتمل بر اپیدرم، درم و فولیکول های مو بود؛ نشان دهنده عدم آثاری از جای زخم، بدون حضور نوتروفیل هایی با هسته های چند شکل در استراتوم کورنیوم، بدون تشکیل بافت گرانوله و هیچ ویزیکول یا فولیکولی و یا نفوذ سلول های التهابی می باشد.



شکل ۱- مقایسه حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد (MFC) ایجاد شده توسط سوش های مختلف پروبیوتیک در غلظت 10^8 cfu/mol

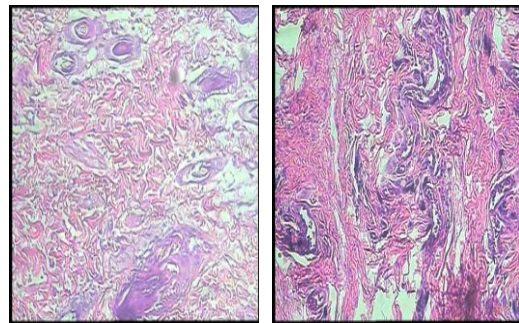
نتایج مرحله Invitro

جدول ۲- میانگین وسعت زخم ایجاد شده در گروه های مختلف طی زمان های مختلف

گروه ها	شروع کار	هفته اول	هفته دوم	هفته سوم	هفته چهارم
۱. کنترل منفی	1/5 cm	1/5 cm	1/5 cm	1/5 cm	1/5 cm
۲. کنترل مثبت	1/5 cm	1/3 cm	1/0 cm	0/7 cm	0/15 cm
۳. گروه تجربی ۱	1/5 cm	1/2 cm	0/9 cm	0/4 cm	0/04 cm
۴. گروه تجربی ۲	1/5 cm	1/2 cm	0/7 cm	0/1 cm	0/0 cm
۵. گروه تجربی ۳	1/5 cm	1/3 cm	0/92 cm	0/5 cm	0/15 cm



شده توسط سوش های مختلف پروبیوتیک در غلظت 10^8 cfu/mol نشان می دهد بالاترین MFC بدست آمده در اثر سویه S₉ ایجاد شده است. مقایسه حداقل غلظت کشندگی (MFC) ایجاد شده توسط سوش های مختلف پروبیوتیک در غلظت 10^8 cfu/mol حاصله نشان می دهد بالاترین MFC بدست آمده در اثر سویه S₉ ایجاد شده است. بنابراین پس از انجام محاسبات آماری سویه S₉ مناسب ترین و موثرترین پروبیوتیک شناخته شد که برای مراحل بعدی تحقیق مورد استفاده واقع گردید. مقایسه اندازه زخم در گروه های مختلف در ابتدای شروع آزمایش نشان داد که در اندازه زخم ها و با روند بهبود و کاهش اندازه زخم تفاوت معنی داری دیده نمی شود. مقایسه اندازه زخم در گروه های مختلف در پایان هفته اول آزمایش نشان داد در اندازه زخم ها و یا روند بهبود و کاهش اندازه زخم ها تفاوت معنی داری دیده نمی شود یا به عبارت دیگر درمان در پایان هفته اول نتایج موثری نداشته است. مقایسه اندازه زخم در گروه های مختلف در پایان هفته دوم نشان داد که تنها در گروه چهارم کاهش معنی دار اندازه زخم ایجاد شده با گروه کنترل مشاهده شد. مقایسه اندازه زخم در گروه های مختلف در پایان هفته سوم نشان داد که در کلیه گروه ها نسبت به گروه کنترل کاهش معنی دار اندازه زخم مشاهده می شود. مقایسه اندازه زخم در گروه های مختلف در پایان هفته چهارم نشان داد که در کلیه گروه ها نسبت به گروه کنترل کاهش معنی دار اندازه زخم ایجاد شده مشاهده شد. اثرات مفید پروبیوتیک ها که باکتریهای مقیم در لوله گوارش هستند، بر ترمیم زخم های گوارشی به اثبات رسیده است و تحقیقات اندکی بر روی اثربخش بودن این باکتریها بر ترمیم زخم های پوستی صورت گرفته است (زارعی و همکاران^۱، ۲۰۰۶). پروبیوتیک ها، میکروارگانسیم های موجود در دستگاه گوارش هستند که از خصوصیات عملکردی



شکل ۳- لام های تهیه شده از برش پوستی رت های درمان شده

بحث

امروزه همگام با پیشرفت علم و کشف داروهایی موثرتر در درمان بیماریها، نیاز به دارویی که توسط آن بتوان روند ترمیم زخم پوستی را نیز سرعت بخشید بسیار مورد توجه میباشد که درماتوفیتوزیس و زخم های پوستی حاصل از عفونت های قارچی از موارد مورد توجه بوده و هست. سویه های زنده پروبیوتیک مقاومت سلولهای اپی تلیالی را افزایش می دهند، فسفوریلاسیون پروتئین های سیتواسکلتون و اتصالات محکم در سلولهای HT-29 و Caco-2 را تسهیل می کنند. همچنین متابولیت های پروبیوتیک ها رگرایی را القاء می کنند و باعث انباشت پروتئوگلیکان ها می شوند و زخم را ترمیم می کنند که با نتایج ما همخوانی دارد. پروبیوتیک ها مکانیزم ضد میکروبی شامل ترشح پپتیدهای ضد میکروبی، مهار هجوم باکتری ها و مهار چسبندگی باکتریهای پاتوژن به سلولهای اپی تلیالی دارند که مانع ایجاد عفونت در زخم میگردند. (سالی هاران^۱، ۲۰۱۰). نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد مقایسه قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط سوش های مختلف پروبیوتیک در غلظت 10^8 cfu/mol، بزرگترین هاله عدم رشد ایجاد شده در اثر سویه S₉ ایجاد شده و همچنین مقایسه حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد (MIC) ایجاد



این است که این باکتری می‌تواند درمان جایگزین یا مخلوط با باکتری‌های که در مطالعات قبلی اثر ترمیمی شان به اثبات رسیده کمکی در درمان زخم معده و زخم‌های ایجاد شده در پوست باشد که مشابه با نتایج پژوهش حاضر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که مقایسه نتایج در پایان هفته اول آزمایش در اندازه زخم‌ها و یا روند بهبود و کاهش اندازه زخم‌ها تفاوت معنی‌داری دیده نشد یا به عبارت دیگر درمان در پایان هفته اول نتایج موثری نداشته ($P > 0.05$)، اما با گذشت زمان مقایسه بین گروه ۱ (کنترل) و گروه ۲-۳-۴-۵ در پایان هفته چهارم نشان دهنده کاهش معنی‌دار اندازه زخم ایجاد شده در رت‌های گروه ۴ در پایان هفته چهارم است ($P = 0.0043$). مقایسه قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط سوش‌های مختلف پروبیوتیک در غلظت 10^8 cfu/mol، بزرگترین هاله عدم رشد ایجاد شده در اثر سویه S_9 ایجاد شده و همچنین مقایسه حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد (MIC) ایجاد شده توسط سوش‌های مختلف پروبیوتیک در غلظت 10^8 cfu/mol نشان می‌دهد بالاترین MFC بدست آمده در اثر سویه S_9 ایجاد شده است. مقایسه حداقل غلظت کشندگی (MFC) ایجاد شده توسط سوش‌های مختلف پروبیوتیک در غلظت 10^8 cfu/mol حاصله نشان می‌دهد بالاترین MFC بدست آمده در اثر سویه S_9 ایجاد شده است. بنابراین پس از انجام محاسبات آماری سویه S_9 مناسب‌ترین و موثرترین پروبیوتیک شناخته شد نتایج حاصل شده از این تحقیق نشان‌دهنده تأثیرپذیری درماتوفیتوزیس ناشی از میکروسپوروم کانیس نسبت به درمان پروبیوتیک در مقابل درمان‌های روتین درماتوفیتوزیس می‌باشد.

آنها می‌توان به تقویت سیستم ایمنی، کاهش کلسترول سرمی، کاهش عفونت‌های گوارشی و اسهال‌های مزمن و مسافرتی اشاره کرد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد (سلمین و همکاران^۱، ۲۰۰۸). میزان تولید اگزوپلی ساکارید در باکتری‌های پروبیوتیک اهمیت بسیار زیادی دارد، برخی از این باکتری‌ها اگزوپلی ساکارید فراوانی ترشح می‌کنند که ممکن است از طریق ایجاد چسبندگی و نیز ایجاد بستر و زمینه برای حرکت سلول‌های اپی تلیال موجب التیام و بسته شدن سریعتر زخم گردد (لاو و همکاران^۲، ۲۰۰۶). که با نتایج این پژوهش مشابه است. در زمستان ۸۲ دکتر وجدانی و دکتر زالی در تهران پروبیوتیک‌ها و مکانیسم اثر آنها را در پیشگیری و درمان بیماری‌های انسان بررسی کردند و نشان دادند که پروبیوتیک‌ها با تولید ترکیبات مهارکننده باکتری‌ها و تعدیل PH روده و تقویت سیستم ایمنی و... اثر خود را القا می‌کنند. (وجدانی ر، ۱۳۸۲) مطالعات انجام گرفته بر روی باکتری‌های پروبیوتیک حاکی از این است که شیر حاوی *plantarum Lactobacillus* فعالیت ترمیمی بالایی نسبت به زخم معده حاد ناشی از اسیداستیک در موش‌های صحرایی دارد. (ابوطالبی، ف. ۱۳۸۹) همچنین بررسی انجام گرفته بر روی باکتری پروبیوتیک *Lactobacillus gasseri* نیز حاکی از این است که این باکتری فعالیت محافظتی بر ضد زخم معده حاد ناشی از اسیداستیک در موش‌های صحرایی دارد (چیدا^۳، ۲۰۰۴). که با نتایج این تحقیق تشابه دارد. غنی‌سازی با سویه‌های *acidophilus Lactobacillus* و *Bifidobacterium adolescentis* مانع از تشکیل زخم‌های روده شده است (حاگی و ارا^۴، ۲۰۰۵). یافته‌های بدست آمده از *Lactobacillus casei* حاکی از

1. Salminen et al
2. Low et al
3. Uchida, M., Kurakazu, K
4. Hagiwara M, Kataoka K, Arimochi H, O



منابع و مأخذ

1. Alexander, M. (1999). "Persistence of Colonization of Human Colonic Mucosa by a Probiotic Strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after Oral Consumption." *Applied and environmental microbiology*: 351-354.
2. Allison, G. E., C. Fremaux, et al. (2009). "Expansion of bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon." *Journal of bacteriology* 176(8): 2235-2241.
3. Ambado, Y. G. (2004). "Probiotic and Technological Properties of Enterococci Isolates from Infants and Cheese." *Food Biotechnology* 18(3): 307-325.
4. Armuzzi, A., F. Cremonini, et al. (2010). "The effect of oral administration of *Lactobacillus* GG on antibiotic-associated gastrointestinal side-effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy." *Alimentary pharmacology & therapeutics* 15(2): 163-169.
5. Arunachalam K, Gill HS, Chandra RK (2000). Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Eur J Clin Nutr*; 54(3): 263-7.
6. Bancroft JD, Stevens A (1977), *Theory and Practice of Histological Techniques* Churchill Livingstone.
7. Bauer ME, Perks P, Lightman SL, Shanks N (2001). Restraint is associated with changes in glucocorticoid immunoregulation. *Physiol Behav*. 22(9):44-45.
8. Beerens, H., C. Romond, et al. (2000). "Influence of breast-feeding on the bifida flora of the newborn intestine." *medical bacteriology*.
9. Benno, Y. and T. Mitsuka (2009). "Impact of *Bifidobacterium longum* on human fecal microflora." *Microbiol Immunology*.
10. Bezkorovainy, A. (2001). "Determinants of survival and growth in the gut." *American Journal of Clinical Nutrition* 73: 399-405.
11. Boirivant M, Strober W. (2007). The mechanism of action of probiotics. *Gastroenterology*; 23: 679-692.
12. Bottazzi V (2010). Food and feed production with microorganisms. *Biotechnology*. 112:34-44
13. Collins, J. K., G. Thornton, et al. (2006). "selection of probiotics strains for human applications." *International Dairy product* 8: 478-490.
14. decreasing intracellular reactive oxygen species. *Apoptosis*; (2005). 10: 569-81.
15. Deepika T. (2010). Lakshmi pathy, Krishnan Kannabiran. Review on dermatomycosis: pathogenesis and treatment. *Natural Science*; Vol.2, No.7, 726-731.
16. Dewulf J, Bereton J, Claisse O, Pot B. (2010). properties of non-conventional lactic acid bacteria: Immuno modulation by *Oenococcus oeni*. *Int Food Microbiol*; 140: 136-145.
17. Erkkila S and Petaja E (2000). Screening of commercial meat starter cultures at low pH in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science* 55:297-300.
18. Falahati M, Omid Tabrizi N, Jahaniani F. (2005) Anti Dermatophyte Activities of *Eucalyptus camaldulensis* in Comparison with Griseofulvin. *IRANIAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS*; 4:80-83.



19. Fennema, R. and P. Walstra (2004). "lactic acid bacteria." *Applied Microbiology*: 407-419.
20. Freter, R. and R. Fuller (2002). " factors affecting the microecology of the gut." *probiotics the scientific basis*.
21. Fuller R(2001). *Probiotics in human medicine* (2005). *Gut* 66:55-56.
22. Garrity, George M. Boone, David R.; Castenholz, Richard W, (2004). *Bergy`s Manual of systematic Bacteriology*. 4th Ed. Springer pub. Mishigan. 45:40-44.
23. Gilliland SE, Staley TE and Bush LJ. (1984). Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *Journal of Dairy Science* 67:3045-3051.
24. Goktepe, I., V. K. Juneja, et al. (2005). *Probiotics in food safety and human health*, CRC Press. Holzapfel, W., P. Haberrer, et al. (1998). " Overview of gutflora and probiotics." *International Journal of Food Microbiology* 41: 85-101.
25. Graff LA , WALKER jr , Bernstein CN (2009) .Depression and anxiety in inflammatory bowel disease a review of comorbidity and management . *Inflamm bowel dis*.44(7):11-13.
26. Guarner, F. and G. J. Schaafsma (1998). "Probiotics." *International Journal of Food Microbiology* 39(3): 237-238.
27. Hagiwara M, Kataoka K, Arimochi H, Ohnishi Y. (2005) , Inhibitory effect of fluvastatin on ileal ulcer formation in rats induced by nonsteroidal anti-inflammatory drug. *World j Gastroentrol*, 11(7): 1040-43.
28. Halper J, Leshin LS, Lewis SJ, Li WI . (2003) Wound healing and angiogenic properties of supernatants from *Lactobacillus* cultures. *Exp Biol Medicine*;. 228:1329-37.
29. Hart, A. L., A. J. Stagg, et al. (2003). "Use of probiotics in the treatment of inflammatory bowel disease." *Journal of clinical gastroenterology* 36(2): 111-119.
30. Haung MT , Wood AW , Newmark JL (2008) , et al . Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by polyphenolic plant flavonoids *Carcinogenesis* 76:81-86.
31. Heller, K. J., W. Bockelmann, et al. (2003). "Cheese and its potential as a probiotic food." *Hands book of fermented functional foods*: 203-226.
32. Holzapfel, W., P. Haberrer, et al. (1998). " Overview of gutflora and probiotics." *International Journal of Food Microbiology* 41: 85-101.
33. Huang, M. T., A. W. Wood, et al. (2008). "Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by polyphenolic plant flavonoids *Carcinogenesis*." *Chemical research in toxicology*.
34. Jibsong, F. W. (2002). "Guidelines for evaluation probiotics in food." *Food and agriculture organization of united nations*.
35. Jibsong, F. W. (2002). "Guidelines for evaluation probiotics in food." *Food and agriculture organization of united nations*.
36. Knipp U, Birkholz S, Kaup W, (1996) Opferkuch W. Partial characterization of a cell proliferation-inhibiting protein produced by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*;. 64: 3491-96.
37. Kopp, H. L. (2001). "prophylactic and therapeutic role of probiotics." *Journal of Am Diet Association* 101: 229-241.



38. Korakli M.(2006) Structure/function relationship of homopolysaccharide producing glycanucrases and therapeutic potential of their synthesisedglycans. *ApplMicrobiolBiotechnol.* 71:790-803.
39. Lilley, D. M. and R .H. Stillwell (1965). "probiotic:growth promoting factors." *Science*_ 147: 747-748.
40. Lilly, D. M. and R. H. Stillwell (1996). "probiotics : Growth Promoting factors produced by microorganisms." *science*.
41. Liu GY, Hung YC, Hsu PC, Liao YF, Chang WH, Tsay GJ, et al. Ornithine decarboxylase preventstumor necrosis factor alpha-induced apoptosis by Mack, D. R., s. Michael, et al. (2009). "probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression." *American Journal of Physiology*.
42. Metchnikoff, E. (1989). "The prolongation of life;Optimistic studies." *Applied Bacteriology*.
43. Metchnikoff, E. (1989). "The prolongation of life;Optimistic studies." *Applied Bacteriology*.
44. Mitsuoka, T. (1992). "The human gastrointestinal tract The lactic acid bacteria." *applied fields in microbiology* 1: 96-114.
45. Orhage, K., B. Brismer, et al. (2004). "Effect of supplementwith Bifidobacterium longum and Lactobacillus acidophilus in the intestinal microflora during administration of clindamycin." *Microbial Ecology Health*.
46. Parker, R. B. (1994). " Probiotics , the other half of the antibiotic story." *Animal Nutrition & Health*.
47. Pires C, Lobato A, Carneiro F. (2014) Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. *An Bras Dermatol*; 89(2):259-64.
48. Reid, G. (2011). " Probiotics for urogenital health." *Nutrition Clinical Care*.
49. Ricci V, Ciacci C, Zarrilli R, Sommi P. (2010) Effect of Helicobacter pylori on gastric epithelial cell migration and proliferation in vitro: role of VacA and CagA. *Infect Immun*, 64: 2829-33.
50. Rolfe, R. D. (2000). "The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health." *The Journal of nutrition* 130(2): 396S-402S.
51. Saavedra, L., M. P. Taranto, et al. (2009). "Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic< i> Enterococcus faecium</i> strains." *International Journal of Food Microbiology* 88(2): 241-245.
52. Salminen S, Nybom S, Meriluoto J, Carmen Collado M, Vesterlund S, El-Nezami H. (2010)Interaction of probiotics and pathogens-benefits to Micro human health *Current OpinBiotechnol*,; 21: 157-167.
53. Salminen, s. and J. Seppo (1998). "Adhesion of some probiotic and dairy< i> Lactobacillus</i> strains to Caco-2 cell cultures." *International Journal of Food Microbiology* 41(1): 45-51.
54. Salminen, S., M. A. Dighton, et al. (1998). " Lactic acid bacteria health and disease." *Microbiology and Functional aspects* 2: 211-253.
55. Schrezenmeir, J. and M. De Verse (2001). "Probiotics, and synbiotics –approaching a definition." *American Journal of Clinical Nutrition*.
56. Shirota, M. and K. Aso (1966). "Study of microflora of human intestine." *Journal of Bacteriology* 21: 274-283.
57. Silveira-Gomes F, Oliveira E, Nepomuceno L.(2013) Dermatophytosis diagnosed at the Evandro Chagas Institute, Pará, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*; 44(2): 443-446.



58. Stanton, C., G. Gardiner, et al. (2001). "Market potential for probiotics." *American Journal of Clinical Nutrition* 73: 476-483.
59. Stanton, S., C. Desmond, et al. (2003). "Challenges of facing development of probiotic." *Hands book of fermented functional foods*: 27-58.
60. Street J, Lenehan B. (2009) Vascular endothelial growth factor regulates osteoblast survival –evidence for an autocrine feedback mechanism. *J OSR*;4(19): 1-9.
61. Touré, R., E. Kheadr, et al. (2003). "Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*." *Journal of Applied Microbiology* 95(5): 1058-1069.
62. Uchida, M., Kurakazu, K. (2004) , Yogurt containing *Lactobacillus gasseri* OLL2716 exerts gastroprotective action against acute gastric lesion and antral ulcer in rats. *J Pharmacol Sci*, 96:84-90 .
63. Vergio, F. (1954). probiotic: 116-119.
64. Zareie M, Johnson-Henry K, Jury J, Yang PC, Ngan BY, McKay DM, Soderholm JD. (2006) Perdue MH, Sherman P.M. Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. *Gut*; 55: 1553–1560.

