

بررسی آثار مهارکنندگی پروبیوتیک‌ها بر هلیکوباکتریلوری

به روش کشت مخلوط

دکتر سیدرضا حسینی دوست^۱، دکتر اشرف محبتی مبارز^۲، دکتر محسن امینی^۳، فخری حقی
تومتری

۱- دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ... (مؤلف مسؤول) تلفن:
۰۲۱-۸۸۰۳۹۸۸۳ rhdoust@bmsu.ac.ir

۲- استادیار گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۳- دانشیار و متخصص گوارش، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ...

۴- کارشناسی ارشد، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

زمینه و هدف: در این مقاله اثر یک رژیم پروبیوتیکی بر روی *H.pylori* گزارش می‌شود. از عوامل مهم در کاهش موفقیت رژیم‌های درمانی بر ضد عفونت‌های هلیکوباکتریلوری مقاومت و اثرات سوء آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. لذا تلاش‌های عمده در سطح جهان بر روی شناسایی پروتکل‌های درمانی جایگزین و موفق‌تر متمرکز شده است.

روش بررسی: چهل سویه هلیکوباکتریلوری از ۱۴۰ نمونه بیوپسی معده بیماران مبتلا به گاستریت جدا سازی شد. پس از کشت نمونه‌های بیوپسی در محیط اختصاصی بروسلا بلاد آگار و شناسایی باکتری با تست‌های تکمیلی استاندارد، تست‌های حساسیت‌سنجی به دو روش دیسک دیفیوژن اصلاح شده و E. Test انجام شد. مقاومت سویه‌های هلیکوباکتریلوری به مترونیدازول، کلاریترومیسین، آموکسی‌سیلین و تتراسیکلین تعیین شد. سویه‌های هلیکوباکتریلوری در بروسلا برات کشت و سپس اثر آنتاگونیستی لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس جدا شده از ماست بر رشد هلیکوباکتریلوری با روش کشت توام مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: ۲۵ (۵۵/۵ درصد) از ۴۵ سویه هلیکوباکتریلوری جدا شده از بیماران، مقاوم به آنتی‌بیوتیک بودند. میزان مقاومت به مترونیدازول، کلاریترومیسین، آموکسی‌سیلین و تتراسیکلین به ترتیب ۶۵٪، ۳۳٪، ۲۲٪ و ۲۰ درصد بود. لاکتوباسیل اسیدوفیلوس توانست رشد ۲۶ (۵۷/۷٪) سویه‌های هلیکوباکتریلوری را مهار کند. ۱۶ (۶۸/۲٪) از آنها مربوط به سویه‌های حساس و ۱۰ (۳۱/۸٪) مربوط به سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک بودند.

نتیجه‌گیری: هر چند بیش از نیمی از سویه‌های هلیکوباکتر توسط آثار مهارکنندگی لاکتوباسیل در شرایط آزمایشگاهی مهار شدند ولی در صد سویه‌های مهار نشده قابل توجه است. نتایج این بررسی از این نظر با نتایج تحقیقات مشابه بطور صد در صد همخوانی ندارد. دلایل این عدم تأثیر برای ما مشخص نشد و برای درک این موضوع تحقیقات بیشتری نیاز است. ما تصور می‌کنیم با استاندارد کردن شرایط کار و ادامه تحقیقات با استفاده از سویه‌های بیشتر میزان واقعی تأثیر مهارکنندگی تعیین خواهد شد. امروزه اثر مهارکنندگی لاکتوباسیل‌ها بر روی بعضی از پاتوژن‌های انتریک در کل پذیرفته شده است، منتهی ادامه اینگونه تحقیقات برای پی بردن به مکانیسم‌ها و فاکتورهای دخیل در آن برای کاربردی کردن نتایج ضروری است.

کلید واژه‌ها: هلیکوباکتریلوری، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، پروبیوتیک

وصول مقاله: ۸۷/۴/۱۲ اصلاح نهایی: ۸۷/۴/۲۷ پذیرش مقاله: ۸۷/۵/۲

(۶). بعضی از محصولات نهایی ناشی از تخمیر لاکتیک اسیدها مثل اسید لاکتیک، اسید استیک و هیدروژن پراکساید نیز اثر ضد باکتری دارند (۷). ایجاد مقادیر نسبتاً زیاد لاکتات می‌تواند مهار *H. pylori* را در پی داشته باشد (۸). از طرف دیگر، اسید لاکتیک باعث کاهش pH محیط می‌شود که می‌تواند بر روی اورآز *H. pylori* تأثیر کرده و از این طریق رشد آنرا مهار کند. با این حال آثار ذکر شده بین استرین‌های مختلف لاکتو باسیل متغیر و متفاوت می‌باشد. برای مثال *L. johnsoni* را در نظر بگیریم که سروتایپ L10 آن هیچگونه اثر مهارکننده‌ای بر روی ندارد هر چند که برابر سروتایپ L1 همین باکتری اسید لاکتیک تولید می‌کند. سایرگونه‌های لاکتوباسیل مثل *L. lactis*، *L. acidophilus*، *L. casei*، *L. johnsoni* از طریق ایجاد اسید لاکتیک و کاهش pH بر روی *H. pylori* اثر مهارکنندگی دارند (۹). تحقیقات متعدد نشان می‌دهند که پروتئین‌های مختلف خاصیت مهارکنندگی دارند (۱۰).

اتصال *H. pylori* با سلول‌های اپیتلیال گوارشی پیش شرط اساسی استقرار عفونت است. ارتباط ابتدایی و کنش‌های متقابل اولیه میان *H. pylori* و سلول‌های اپیتلیال مخاط گوارشی احتمالاً بواسطه مواد ترشحی باکتری و کیفیت اتصال با آن شروع می‌گردد (۱۱). مطالعات آزمایشگاهی نشان می‌دهند که استرین‌های *L. johnsoni*، *L. salivarius*، *L. acidophilus* و *W. confusa* از اتصال *H. pylori* با سلول‌های HT29 روده مانعت می‌کند (۱۲). تحقق این امر منوط به وقوع مکانیسم‌های

مقدمه

عفونت طولانی مدت با هلیکوباکتر پیلوری می‌تواند به گاستریت مزمن (۱) منجر گردد که خود عامل اصلی اولسر پپتیک بوده و فاکتور مستعدکننده برای بدخیمی‌های گاستریک (۲) محسوب می‌گردد. پروبیوتیک عبارت است از میکروارگانیسم‌های زنده‌ای که پس از ورود به سیستم گوارش آثار مثبت بر روی میکرواکولوژی محیط داشته و به بهبود سلامتی فرد کمک می‌کند (۳). امروزه پروبیوتیک‌هایی که بیشتر از همه کانون تحقیقات قرار گرفته‌اند باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک بویژه گونه‌های لاکتوباسیل هستند (۴). تأثیر مثبت پروبیوتیک‌ها بر روی درمان بیماری‌های گاسترواینستینال همچون اسهال‌های حاد به اثبات رسیده است (۵). آثار مفید پروبیوتیک‌ها با مکانیسم‌های متعددی بروز می‌کند که مهمترین آنها عبارتند از: مکانیسم‌های غیر ایمونولوژیک (مواد ضد میکروبی، رقابت برای اتصال به سلول‌های هدف، کمک به تقویت سد مخاطی) و مکانیسم‌های ایمونولوژیک.

ترشح مواد و ترکیبات ضد باکتری توسط پروبیوتیک‌ها باعث مهار رشد و تکثیر *H. pylori* می‌شود. بعضی از لاکتوباسیل‌ها مواد ضد میکروبی شبه باکتریوسین‌ها تولید می‌کنند

کموکین‌ها Chemokines مشخص می‌گردند. البته در مجموع، این پاسخ‌ها قادر به برطرف کردن عفونت و تخفیف التهاب‌های ناشی از آن نمی‌باشند. پروبیوتیک‌ها از طریق واکنش با سلول‌های اپیتلیال و تحریک ترشح سیتوکین‌های ضد التهاب، که خود کاهش فعالیت گاستریک و التهاب‌ها را در پی دارد پاسخ‌های ایمنی را تقویت می‌کنند (۲۲). آثار پروبیوتیک‌ها احتمالاً نتیجه فرایندهای ایمونورگولاسیون بخصوص کنترل توازن سیتوتوکسین‌های پرو اینفلاماتوری و آنتی‌اینفلاماتوری است که نتیجه آن کاهش فعالیت گوارشی و التهابی می‌باشد (۲۳). در پاره‌ای تحقیقات، کاهش IgG اختصاصی *H.pylori* متعاقب مصرف پروبیوتیک‌ها بموازات کاهش التهاب گوارشی ملاحظه شده است (۲۴). پروبیوتیک‌ها از طریق تحریک پاسخ‌های ایمنی محلی و ترشح IgA قدرت سد دفاعی را مستحکم کرده و آثار ناشی از آنرا تثبیت می‌کنند (۲۵). در این تحقیق اثر مهارکنندگی بعضی از پروبیوتیک‌های موجود ماست بر روی هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از نمونه‌های بالینی و مقاوم به آنتی‌بیوتیک، در شرایط آزمایشگاهی بررسی شده است.

روش بررسی

جدا سازی لاکتوباسیل از نمونه‌های ماست: برای جداسازی لاکتوباسیل‌های موجود در ماست، نمونه‌های ماست موجود در بازار تهیه و مطابق روش‌های استاندارد (۲۶) برای کشت آماده شدند. برای کشت از محیط

متفاوتی است. بعضی از پروبیوتیک‌ها مثل *L. johnsoni* توسط ترشح مواد ضد میکروبی (۱۳) و بعضی دیگر مثل *L. ruteri* از طریق رقابت بر سر محل اتصال (۱۴)، مانع اتصال می‌شوند. *L. ruteri* از اتصال با asialo-GMI و sulfatide بعضی از گیرنده‌های گلیکولیپیدی ممانعت می‌کنند (۱۵). در کل انسداد و یا اشغال غیر اختصاصی گیرنده‌ها، حتمل‌ترین مکانیسم است زیرا لاکتوباسیل می‌تواند اتصال طیف وسیعی از باکتری‌های پاتوژن را مهار نماید، هرچند هرکدام از باکتری‌ها به گیرنده ویژه‌ای بر سطح سلول متصل می‌گردد (۱۶). کلونیزاسیون قبلی موش‌های آزمایشگاهی با پروبیوتیک‌ها، عفونت *H.pylori* را مهار و یا کاهش داده است (۱۷). بنابراین قطع نظر از مکانیسم‌های درگیر در مهار اتصال *H.pylori* به سلول‌های اپیتلیال، پروبیوتیک‌ها از طریق اتصال به سلول‌های اپیتلیال می‌توانند مانع از استقرار عفونت *H.pylori* گردند. تحقیقات نشان داده که *L. plantarum* و *L.rhamnosus* باعث افزایش بیان ژن‌های MUC2 و MUC3 شده (۱۸) و ترشحات خارج سلولی موسین، متعاقب کلون آن شدند (۱۹). این ویژگی بواسطه توانایی باکتری‌های مذکور در امر بازآرایی قدرت نفوذ مخاط گوارشی (۲۰) و یا مهار اتصال باکتری‌های پاتوژن همچون *H.pylori* قلمداد شده است (۲۱). پاسخ‌های ایمنی مربوط به (گاستریک) با آزاد شدن مدیاتورهای التهابی گوناگون مثل سیتوکین‌ها Cytokines و

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی: دو روش دیسک دیفیوژن اصلاح شده (Modified disk diffusion Method) و E test مورد استفاده قرار گرفت و حساسیت سویه‌ها نسبت به مترونیدازول (5gμ)، کلاریترومایسین (2μg)، آموکسی سیلین (30μg) و تتراسیکلین (10gμ) (Mast, UK) بررسی شد. سپس MIC سویه‌های مقاوم برای آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر تعیین گردید.

کشت توام لاکتوباسیل اسیدوفیلوس و هلیکوباکترپیلوری: بمنظور تعیین اثر مهارکنندگی لاکتوباسیل از محیط برات استفاده شد. ابتدا دو سوسپانسیون کشت تازه هلیکوباکتر پیلوری در ۵ میلی لیتر بروسلا برات غنی شده با سرم جنین گوساله و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در ۵ میلی‌لیتر محیط MRS تهیه و بمدت ۴۸ ساعت در دمای میکروآنروفلیک در انکوباتور شیکردار انکوبه شدند. سپس خلوص و عدم آلودگی آنها کنترل و OD هر دو نمونه در طول موج ۶۲۵ نانومتر معادل یک مک فارلند (#108cfu) تنظیم گردید. در این مطالعه از سوش استاندارد هلیکوباکتر پیلوری (ATCC26695) بعنوان کنترل استفاده شد هر چند هدف اصلی تحقیق، بررسی اثر پروبیوتیک‌ها بر روی ایزوله‌های بالینی بود. از هر کدام از دو میکروارگانیسم که بدین ترتیب آماده شدند به نسبت مساوی در لوله آزمایش استریل منتقل شده و بدین ترتیب کشت همزمان تهیه و بمدت صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و شرایط میکروآنروفلیک انکوبه

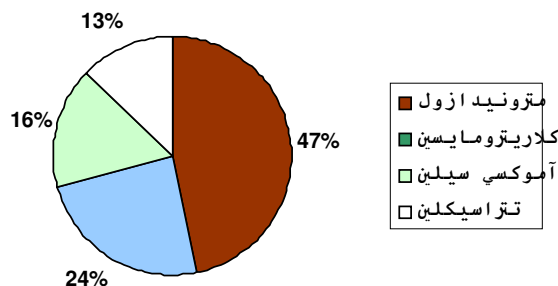
اختصاصی (MRS (Rogosa & Sharpe medium) استفاده شد (۲۷). این محیط مطابق دستورالعمل شرکت سازنده (Merck) تهیه گردید. در ابتدا نمونه با استفاده از محلول رینگر و هموژیناتور بصورت کاملاً یکنواخت در آمد. سپس هر پلیت با ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه تلقیح گردید. پلیت‌های تلقیح شده سپس بمدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در داخل جار بی‌هوازی (Anaerocult A, Merck) با استفاده از گاز پک انکوبه شدند. کلی‌های رشد کرده با استفاده از مرفولوژیک، آزمایش گرام و تست‌های بیوشیمیایی مثل تست کاتالاز و تخمیر قندها در دمای انکوباتور تعیین هویت شدند. جداسازی هلیکوباکترپیلوری: بیماران مراجعه‌کننده به بخش فوق تخصصی گوارش در خلال شش ماه، توسط پزشک معاینه شده و پس از انجام تست اوراز سریع، بررسی‌های لازم برای انجام اندوسکپی و نمونه‌گیری انجام گردید. تعداد ۱۴۰ نمونه بیوپسی از آنتروم معده بیماران تهیه و در محیط انتقالی تیوگلیکولات به آزمایشگاه منتقل گردید. هر نمونه بلافاصله هموژن شده (۲۸) و بر روی محیط بروسلا بلاد آگار کشت و در شرایط میکروآنروفلیک (10%, CO2) بمدت ۶-۸ روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از این مدت، پلیت‌های مثبت بر اساس مرفولوژی، رنگ گرام و تست‌های اختصاصی (کاتالاز، اکسیداز و اوره‌آز) تعیین هویت و شناسایی شدند.

اثر ضد میکروبی آن با کشت ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه بر روی بروسلا بلاک آگار تعیین گردید.

یافته‌ها

از مجموع نمونه‌های بیوپسی مشکوک (۱۴۰ نمونه) مجموعاً ۴۰ نمونه (۲۸/۶٪) از نظر کشت هلیکوباکتر پیلوری مثبت شدند. در کل تا حدود ۵۰ درصد هلیکوباکترهای جدا شده حداقل به یکی از آنتی‌بیوتیک‌های آزمایش شده مقاومت نشان دادند. در صد مقاومت ایزوله‌های هلیکوباکتر پیلوری نسبت به هر یک از آنتی‌بیوتیک‌ها در نمودار ۱ ملاحظه می‌گردد.

شدند. پس از انکوباسیون، ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه کشت همزمان به پلیت‌های بروسلا بلاک آگار و MRS تلقیح و مجدداً بمدت ۴۸ ساعت و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط میکروآئروفیلیک انکوبه می‌شدند. برای تعیین اثر مهارکنندگی سوپر ناتانت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ابتدا هیدروژن پراکساید موجود در آن به کمک ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کاتالاز خنثی شده و بوسیله فیلتراسیون خنثی گردید. یک میلی‌لیتر از این مایع با یک میلی‌لیتر سوسپانسیون هلیکوباکتر پیلوری بمدت ۹۶، ۷۲ و ۴۸ ساعت تحت شرایط ذکر شده انکوبه شده و



نمودار ۱: درصد مقاومت ایزوله‌های هلیکوباکتر پیلوری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها

کشت توام بر روی محیط بروسلا آگار غنی شده بررسی شد معلوم گردید که از رشد ۲۶ سویه (۵۷/۷٪) از هلیکوباکترها در کشت توام با لاکتوباسیلوس بکلی ممانعت بعمل آمد.

بحث

عفونت هلیکوباکتر پیلوری از جمله عوامل مهم بیماری‌های گوارشی است. بعضی از

پس از تهیه کشت توام (coculture) از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و هلیکوباکتر پیلوری و در پایان دوره انکوباسیون مقایسه OD زمانهای مختلف انکوباسیون نشانگر سرعت رشد ۱۰ برابری لاکتوباسیل در ۲۴ ساعت اول و حدوداً ۲۵ برابری آن پس از ۴۸ ساعت می‌باشد. وقتی نتیجه این

استفاده شد. این اثر مهاری حداقل بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون معلوم گردید. کاهش رشد هلیکوباکتر پیلوری در کشت مخلوط با اسیدی شدن محیط (pH 6.2) همراه بود با اینحال وقتی این مسئله با تغییرات بوجود آمده در محیط بروسلا برات کنترل شد، مشخص گردید که این مقدار اسیدی شدن محیط به تنهایی تأثیری در کاهش رشد هلیکوباکتر پیلوری ندارد. بنابراین فاکتورها و عوامل دیگر همچون رقابت بین دو باکتری در مصرف مواد غذایی، تولید اسیدهای چرب و باکتریوسین‌ها می‌توانسته در این امر دخیل باشد که عمدتاً مربوط به اثر پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس می‌باشند (۹). در این تحقیق اثر مهارکنندگی در مایع سوپرناتانت لاکتوباسیلوس (در غیاب هیدروژن پراکساید) نیز مشاهده گردید که در اینصورت تأثیر باکتریوسین‌ها را نمی‌توان نادیده گرفت. در مطالعه مشابهی که با استفاده از لاکتوباسیلوس سالیواریوس انجام گرفت با توجه به تولید مقادیر قابل توجه اسید لاکتیک، اثر مهارکنندگی به رشد هلیکوباکتر ارتباط داده شد (۳۰). تحقیق مشابهی نیز با استفاده از لاکتوباسیلوس شیروتا و با متد کشت مخلوط صورت گرفت که نتایج آن حاکی از تأثیر مهارکنندگی بر روی هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد (۳۱). آثار مهارکنندگی سوپرناتانت کشت لاکتوباسیل بر روی هلیکوباکتر پیلوری نیز قبلاً گزارش شده (۳۲) که نتایج تحقیق حاضر تاییدی است بر یافته‌های آنها است.

پروبیوتیک‌ها در شرایط آزمایشگاهی آثار مهارکنندگی خوبی بر روی *H.pylori* نشان داده و حتی توانسته‌اند عوارض ناشی از عفونت هلیکوباکترپیلوری را در بیماران تخفیف دهند (۲۹). در این مقاله در ابتدا مقاومت سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری جدا شده از نمونه‌های بالینی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج و در حال تجویز نشان داده شد. با توجه به اینکه سویه‌های هلیکوباکترپیلوری بطور

روزمره نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دهند بنابراین باید این واقعیت در درمان عفونت ناشی از آن برای هر بیمار در نظر گرفته شود. در این تحقیق نیمی از سویه‌های آزمایش شده حداقل به یکی از آنتی‌بیوتیک‌های مترونیدازول، کلاریترومایسین، آموکسی‌سیلین و تتراسیکلین مقاومت نشان دادند. بررسی‌ها نشان داده که لاکتوباسیل‌ها و یا محصولات متابولیک آنها در پیشگیری از عفونت و یا به تأخیر انداختن کلونیزه شدن مخاط گوارشی با هلیکوباکتر پیلوری مؤثر هستند. یافته‌های ارائه شده در این مقاله بخوبی این واقعیت را نشان می‌دهند. اکنون مشخص شده به تولید اسیدهای آلی، اسیدهای چرب آزاد، آمونیاک، اتانول، هیدروژن پراکساید و باکتریوسین‌ها مربوط می‌باشد (۱۰). در تحقیق حاضر از روش کشت مخلوط (mixed culture) برای تعیین اثر مهارکنندگی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر روی هلیکوباکتر پیلوری

لاکتوباسیلوس در محصولات تخمیری شیر (ماست و ..) خود بخود در مصرفکنندگان بنوعی باعث محافظت آنها در برابر عفونت هلیکوباکتر پیلوری می‌شود و باید مصرف عام اینگونه محصولات بیش از پیش مورد تشویق قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

از دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) و دانشگاه تربیت مدرس (دانشکده علوم پزشکی) برای همکاری‌های همه جانبه در انجام این پروژه قدردانی می‌نماییم.

لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس جزء باکتری‌های فلور نرمال دستگاه گوارش انسان است که قادر است شرایط اسیدی محیط معده را تحمل کرده و زنده بماند بنابراین همواره بعنوان یک پروبیوتیک قابل توجه از آن یاد شده و در تحقیقات زیادی مورد استفاده قرار گرفته است. در این تحقیق نیز ابتدا یک گروه از محصولات تخمیری شیر موجود در بازار مورد آزمایش قرار گرفت و لاکتوباسیلئس اسیدوفیلوس از آن ایزوله شد. ادامه این پروژه با استفاده از همین سویه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس انجام گردید. بنابراین می‌توان استنتاج نمود وجود این

References

1. Dooley CP, Cohen H, Fitzgibbons PL, Bauer M, Appleman MD, Perez-Prez GI, and et al. Prevalence of helicobacter pylori infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. *N Engl J Med* 1989; 321: 1562-6.
2. Kashiwagi H. Ulcers and gastritis. *Endoscopy* 2003; 35: 9-14.
3. Plummer M, Franceschi S, Munoz N. Epidemiology of gastric cancer. *IARC Sci Pub1* 2004; 157: 311-26.
4. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Hungin AP, Jones R, Axon A, and et al. Current concepts in the management of helicobacter pylori infection-the Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 167-80.
5. Perri F, Qasim A, Marras I, O' Morain C. Treatment of helicobacter pylori infection. *Helicobacter* 2003; 8 (suppl 1): 53-6.
6. Lesbros-Pantoflickova D, Corthesy-Theulaz I, Andre LB. helicobacter pylori and probiotics. *The J Nutr* 2007; 137: 612s-818s.
7. Ernst PB, Golod BD. The disease spectruam of H pylori: The immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 615-40.
8. Tokumaga Y, Shirahaze H, Hoppu T, Kitaoka A, Obsumi K. Density of helicobacter pylori infection evaluated semiquantitatively in gastric cancer. *J clin Gastronterol* 2000; 31: 217-21.
9. Jack Rw, Tack JR, Ray B. Bacteriocin of gram positive bacteria. *Microbiol Rev* 1995; 59: 171-200.
10. Vanderbergh PA. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Mirobiol Rev* 1993; 12: 39-85.
11. Michetii P, Dorta G, Wiesel PH, Brassart D, Verdu E, Herranz and et al. Effect of wheybased culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (johnsoni) L1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Digestion* 1999 ; 60 : 203-9.
12. Cats A, Kuipers EJ, Bosschaert MA, Pot RG, Vandenbroucke-Grauls CM, Kusters JG. Effect of frequent consumption of a *Lactobacillus casei*-containing milk drink in helicobacter pylori-colonized subjects. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 429-35.
13. Lorca GL, Wadstrom T, Valdez GF, Ljungh A. *Lactobacillus acidophilus* autolysins inhibit helicobacter pylori in vitro. *Curr Microbiol* 2001; 42: 39-4.

14. Kim TS, Hur JW, Yu MA, Cheigh CI, Kim KN, Hwang JK, and et al. Antagonism of helicobacter pylori by bacteriocins of lactic acid bacteria. *J Food Prot* 2003; 66: 3-12.
15. Pinchuk IV, Bressollier P, Verneuil B, Fenet B, Sorokulova IB, Megraud F, and et al. In vitro anti-helicobacter pylori activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 3156-61.
16. Smoot DT. How does helicobacter pylori cause mucosal damage? Direct mechanisms. *Gastroenterology* 1997; 113 (suppl 6): S31-4.
17. Mukai T, Asasaka T, Sato E, Mori K, Matsumoto M, Otori H. Inhibition of binding of helicobacter pylori to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 32: 105-10.
18. Johnson-Henry KC, Mitchell DJ, Avitzur Y, Galindo-Mata E, Jones NL, Sherman PM. Probiotics reduce bacterial colonization and gastric inflammation in *H. pylori*-infected mice. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1095-102.
19. Byrd JC, Yunker CK, Xu QS, Sternberg LR, Bresalier RS. Inhibition of gastric mucin synthesis by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2000; 118: 1072-9.
20. Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth MA. Probiotics inhibit enteropathogenic *E coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol* 1999; 276: G941-G50.
21. Gotteland M, Cruchet S, Verbeke S. Effect of *Lactobacillus* ingestion on the gastrointestinal mucosal barrier alterations induced by indomethacin in humans. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 7-11.
22. Harris PR, Smith PD. The role of the mononuclear phagocyte in *H. pylori*-associated infection. In: Ernst PB, Michetti P, Smith PD, editors. *The immunology of H. pylori: From pathogenesis to prevention*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997. p. 127-37.
23. von Der WT, Bulliard C, Schiffrin EJ. Induction by a lactic acid bacterium of a population of CD4⁺ T cells with low proliferative capacity that produce transforming growth factor beta and interleukin 10. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 695-701.
24. Vitini E, Alvarez S, Medina M, Medici M, de Budeguer MV, Perdigon G. Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. *Biocell* 2000; 24: 223-32.
25. Gill HS. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17: 755-73.
26. Batdorj B, Trinetta V, Dalgalarondo M, Prévost H, Dousset X, Ivanova I, and et al. Isolation, taxonomic identification and hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* T31, isolated from Mongolian yoghurt: inhibitory activity on food-borne pathogens. *J Appl Microbiol* 2007; 103(3): 584-93.
27. Mobarez AM, Hosseini Doust R, Sattari M, Manteghi N. Antimicrobial effects of bacteriocin- like substances produced by *L acidophilus* from traditional yoghurt on *P aeruginosa* and *S aureus*. *J Biologica Sciences* 2008; 8 (1): 221-224.
28. Boyanova L. Influence of transport conditions and media on *H pylori* isolation. *J Med Microbiol* 2003; 52: 1120-30.
29. Miki K, Urita Y, Ishikawa F, Iino T, Shibahara-Sone H, Akahoshi R, and et al. Effect of *Bifidobacterium bifidum* fermented milk on helicobacter pylori and serum pepsinogen levels in humans. *J Dairy Sci* 2007; 90(6): 2630-40.
30. Aiba Y, Suzuki N, Kabir AM, Takagi A, Koga Y. Lactic acid-mediated suppression of helicobacter pylori by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am J Gastroenterol* 1998; 93(11): 2097-2101.
31. Sgouras D, Maragkoudakis P, Petraka K, Martinez-Gonzalez B, Eriotou E, Michopoulos S, and et al. In vitro and in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 518-526.

32. Coconnier MH, Lievin V, Hermery E, and Servin AL. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection in vitro and in vivo by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 4373-4380.