Archive of SID

مجله علمی - پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
پاییز 1389، دوره دوم، شماره ششم، صفحه 6-1

مطالعه اثرات ساکارومایسز بولاردی بر میزان آنزیمهای کبدی تحت مواجهه با *سالمونلا تیفی موریوم* در موش صحرایی

مجید مروتی شریف آباد[1]، الهام صالحی[1]

1- دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر

نویسنده مسؤول: دکتر مجید مروتی شریف آباد، گروه دامپزشکی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر m.morovati@iau-shoushtar.ir

دریافت: 89/5/18 پذیرش: 89/7/12

چکیده

زمینه و هدف: *سالمونلا تیفی موریوم* یکی از گونه های شایع جنس سالمونلا است که در انسان و حیوانات ایجاد عفونت های مختلف می نماید. یکی از ارگان هایی که این باکتری پس از ایجاد سپتسمی مورد حمله قرار می دهد کبد است که تولید ندول های پاراتیفوییدی در کبد می نمایند، از این رو انسان همیشه در تلاش برای پیشگیری و درمان سالمونلوز در حیوانات بوده است. با توجه به اینکه مصرف آنتی بیوتیک ها نیز محدودیت های خاص خود را دارد توجه به استفاده از پروبیوتیک ها جلب شده است. هدف از این مطالعه بررسی اثر *ساکارومایسز بولاردی* بر میزان ضایعات پاتولوژیک ناشی از عفونت تجربی با *سالمونلا تیفی موریوم* در رت به عنوان مدل تجربی، به منظور ارزیابی خواص سالمونلا در پیشگیری از ضایعات کبدی ناشی از *سالمونلا تیفی موریوم* می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تعداد 30 عدد رت نر به سه گروه A,B,C تقسیم شدند. قبل از القاء ساکارومایسز ، آنزیم های کبدیALT وAST اندازه گیری شد. رتهای گروه B وC هر کدام به ترتیب 10^7 و 10^8 cfu/ml مخمر *ساکارومایسز بولاردی* به مدت 5 روز به صورت دهانی دریافت کردند. گروه A به عنوان گروه کنترل ، 1 سی سی سالین نرمال دریافت نمودند. در روز پنجم یک میلی لیتر سوسپانسیون میکروبی حاوی 10^7 cfu/ml باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* به هر سه گروه تجویز شد. در روز دهم بعد از تجویز باکتری مجددا آنزیمهای ALT و AST به منظور ارزیابی عملکرد کبد اندازه گیری شدند. در پایان، نتایج حاصل از بررسی های سرمی گروههای مختلف با استفاده از آزمون آماری T- TEST مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته ها: در گروه A یعنی گروه کنترل، آنزیمهای ALT و AST به طور معناداری افزایش یافته بود($P< 0/001$). اما در گروه های آزمایش B و C چنین افزایشی مشاهده نگردید، که این خود موید اثرات حفاظتی مخمر می باشد. همچنین اختلافات معنی داری در افزایش آنزیمهای ALT و AST بین گروههای B و C مشاهده نگردید که نشان می دهد 10^7 cfu/ml مخمر با 10^8 cfu/ml مخمر در پیشگیری از ضایعات سالمونلا اختلاف چندانی ندارند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان می دهد که *ساکارومایسز بولاردی* در جلوگیری از افزایش آنزیم های کبدی تحت مواجه با *سالمونلا تیفی موریوم* ایفا نقش می کند.

واژه‌های کلیدی: موش صحرایی، آنزیمهای کبدی، *ساکارومایسز بولاردی*، *سالمونلا تیفی موریوم*

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

سالمونلاها باسیل های گرم منفی و متحرک‌اند که 0/5 تا 0/82 میکرون قطر و 1 تا 3/5 میکرون طول آنها است. هوازی و بی‌هوازی اختیاری‌اند. که به طور اختصاصی گلوکز و مانوز را بدون گاز تخمیر می‌کنند و در صورت ورود به دستگاه گوارش غالباً برای انسان و حیوانات بیماری‌زا هستند(1و2). گفته می‌شود که سالمونلاها از طریق جریان خون به کبد منتقل می‌شود و در کیسه صفرا کلونیزه می‌شود و همچنین با ایجاد سپتی سمی خصوصاً در حیوانات جوان‌تر به ارگانهای مختلف منجمله کبد راه یافته و ضایعاتی نیز تولید می نماید. اگر چه این ضایعات پاتوگونومونیک نیستند ولی به هرحال در عفونت سالمونلایی در کبد دیده می‌شوند که عبارتند از نکروزهای کانونی کوچک که در حقیقت همان ندول های پاراتیفوئیدی‌اند. به دنبال آن تجمع سلولهای رتیکولواندوتلیال که شامل هیستوسیت ها و ماکروفاژها می‌باشد که در ارتباط با نکروز کبدی و یا مستقل از نکروز کبدی است رخ می‌دهد. سلول های کوپفر کبدی کاملاً برجسته و مشخص شده و سینوزئیدهای کبدی تعداد زیادی لوکوسیت را در بر می‌گیرند. به علاوه هپاتیت حاد و التهاب کیسه صفرا از عوارض دیگر باکتری هستند(3). پدیده نکروز کبدی که به نوعی تغییر در نفوذپذیری غشاء سلول می انجامد باعث نشت ترکیبات درون سلولی به مایع برون سلولی می شود و در نتیجه آنزیمهای سیتوپلاسمی محلول مانند ALT وAST به راحتی از سلول خارج می شوند و به عنوان شاخص های تشخیصی معمول برای افزایش نفوذ پذیری سلول های کبدی به شمار می روند. فعالیت سرمی آنزیم های نشتی در خلال چند ساعت بعد از آسیب کبدی افزایش می یابد(4و5). از جمله راه هایی که برای کنترل بیماری مطرح است استفاده از پروبیوتیک ها نظیر *ساکارومایسز بولاردی* است که در دو دهه اخیر توجه زیادی را به خود جلب نموده است. این مخمر به راحتی درمحیط های کشت مخمر نظیر سابارو دکستروز آگار رشد می‌کند و به صورت پودر لیوفیلیزه توسط لابراتوار بایکودکس تهیه شده و در کشورهای مختلف موجود است (6و7). *ساکارو مایسز بولاردی* در زیر رده همی آسکومیست ها قرار دارد. در این گروه هیچ آسکوکاربی تشکیل نمی شود. جنس های این تیره همگی از مخمرهای حقیقی هستند *ساکارو مایسز بولاردی* دارای کلونی هایی با رشد سریع و صاف براق یا تیره و خامه ای می باشند، دارای هیف کاذب بوده، بلاستوکندی ها تک سلولی و به شکل بیضی یا کشیده می باشند. خانواده ساکارومایسز را به وفور در میوه های رسیده می توان یافت. این مخمر را اولین بار از میوه لیچی در اندونزی جدا نمودند. که در حقیقت یک مخمر پاتوژن بوده و به عنوان یک عامل پیشگیری کننده و درمانی در درمان بسیاری از انواع اسهال به کار می رود(8و9). گرچه این مخمر جزء فلور نرمال دستگاه گوارش نمی باشد ولی با مصرف خوراکی آن در قسمت پایینی دستگاه گوارش جایگزین می شود و از طریق مدفوع قابل دفع است (10و11). در ایالات متحده ساکارومایسز بولاردی یک داروی جدید مورد تحقیق است که در حال حاضر تحت آزمایشات FDA قرار دارد و البته در فازII آزمایشات بالینی به سر می برد (8).

اطلاعات فارماکوکینیتکی نشان می دهد که *ساکارومایسز بولاردی* بعد از مصرف به یک حالت پایدار رسیده و بعد از قطع دارو نیز از طریق مدفوع دفع شده و هیچ گونه باقیمانده دارویی در بدن ندارد(۲،۸،۱۲). لذا در این مطالعه در نظر است که اثرات پیشگیری کننده *ساکارومایسزبولاردی* از ضایعات احتمالی ایجاد شده توسط *سالمونلا تیفی موریوم* مورد بررسی قرار گیرد تا اولاً خواص ساکارومایسز در پیشگیری از ضایعات کبدی ناشی از سالمونلا تیفی موریم مشخص گردد. ثانیاً مشخص شود که آیا اندازه‌گیری آنزیم های کبد می‌تواند موید اثرات پیشگیری کننده *ساکارومایسز بولاردی* باشد یا خیر. امید است در صورت موفقیت آمیز بودن این مطالعه راهی برای جلوگیری از ضایعات وارده پیشنهاد شود و نیز گامی در جهت آشنایی بیشتر با پروبیوتیک ها برداشته شود.

روش بررسی

تعداد 30 عدد رت نر تهیه و به سه گروه تقسیم شدند. گروه A به عنوان گروه کنترل وگروه های B و C دریافت کننده *ساکارومایسز بولاردی* بودند. قبل از شروع کار ابتدا پس از بیهوشی، از سینوس غاری چشم تمام رتها با کمک لوله میکروهماتوکریت خون گیری به عمل آمد. پس از خونگیری، خون ها در لوله اپندرف قرار گرفت. سپس لوله ها به مدت 10 دقیقه در 2000 دور سانتریفوژ شده و سرم آن جدا شد و سرم ها نیز در لوله اپندرف جمع آوری شده و بعد لوله‌های حاوی سرم تا زمان انجام آزمایش در فریزر قرار داده شدند.

پس از خونگیری از تمام رت ها، به موش های گروه B 10^7 cfu/ml و به موش های گروه C 10^8 cfu/ml مخمر

www.SID.ir

Archive of SID

خورانده شد. این مخمر در ساشه های 250 میلی گرمی به صورت تجاری در بازارهای دارویی اروپا ارائه گردیده است. یک ساشه از مخمر در 20 میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل حل گردید و سپس در محیط سابارو دکستروز آگار به صورت انبوه کشت داده شد. برای رشد کامل به مدت 48 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد انکوبه شد. برای تهیه سوسپانسیون به میزان 5 میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل به پلیت ها اضافه گردید و پس از حل کردن کامل، شیرابه حاصل داخل یک ارلن جمع آوری شد. به کمک لام نئوبار تعداد مخمر در هر میلی لیتر از این شیرابه غلیظ شمارش شد. تعداد مخمر در هر میلی لیتر معادل 10^8 cfu/ml بود و چون در این تحقیق نیاز به دوزهای 10^7و 10^8 cfu/ml مخمر داشتیم با رقیق سازی قسمتی از سوسپانسیون تعداد 10^7 cfu/ml مخمر نیز تهیه گردید. همانطور که گفته شد سوسپانسیون به گونه ای تهیه شده بود که هر میلی لیتر آن حاوی این مقدار مخمر بود. لذا به هر موش 1 میلی لیتر از سوسپانسیون مذکور خورانده شد برای دادن سوسپانسیون به رت ها میزان 1 میلی لیتر سوسپانسیون باتوجه به دوز مربوط به گروه در پیپت کشیده و به صورت دهانی با پیپت به رت ها خورانده شد و با این عمل اطمینان حاصل شد که میزان دوز دارو دقیقا توسط رت دریافت شده است. به موش های گروه شاهد A هم یک میلی لیتر سرم فیزیولوژی خورانده شد. با این روش عمل تلقیح مخمر به مدت 5 روز انجام شد. در روز پنجم موش های تمام گروه ها علاوه بر مخمر با یک دوز حاوی 10^7 cfu/ml باکتری *سالمونلاتیفی موریم*(TA-100) مواجه شدند نحوه مواجه رت ها با باکتری به صورت دهانی مانند خوراندن مخمر بود، برای تهیه باکتری سویه مورد نظر از مجموعه باکتری های آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه شهرکرد برداشت شد. برای اطمینان بیشتر از سویه باکتری، ابتدا رنگ آمیزی گرم بر روی باکتری انجام شد و باکتری باسیلی شکل گرم منفی مشاهده شد و بعد از آن، آزمایش های بیوشیمیایی شامل کشت در محیط های مک کانکی، اوره، TSI و محیط های قندی گلوکز،گالاکتوز، مالتوز،لاکتوز و ژلاتین انجام شد. نتایج به دست آمده با خواص *سالمونلا تیفی موریوم* همخوانی داشت. در روز دهم بعد از مواجه باکتری از موش ها به روش ذکر شده خونگیری به عمل آمد و پس از جدا کردن سرم ، نمونه ها به آزمایشگاه میکروبیولوژی بیمارستان خورشید اصفهان انتقال داده شدند. در آنجا با استفاده از کیتهای مخصوص(کیت آنزیم ساخت کارخانه زیست شیمی) و دستگاه تکنیکوم RA-1000 میزان آنزیمهای موجود در سرم اندازه گیری شد.

به این صورت که آنزیم های موجود در سرم در مجاورت سوبسترای مربوط به خود قرار می گیرند و پس از واکنش، محصولات تولیدی با NADH موجود در محیط واکنش می دهند و آن را به NAD اکسید می نمایند و به این ترتیب از جذب نوری آن در طول موج 340 نانومتر می‌کاهند. بر این اساس، فعالیت آنزیم های ALT وAST با تغییر شدت جذب نوری نسبت معکوس خواهند داشت و سپس یافته ها با کمک نرم افزارSPSS و روش آماری T-testو Anova مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته ها

در مورد بررسی آنزیمی نتایج حاصله در جدول (1) بیان شده است. در این جداول میزان آنزیمهای ALT و AST قبل از انجام آزمایش و بعد از انجام آزمایش ثبت گردیده است. Reference value برای آنزیم های کبدی، AST 42/9±10/1Iu/ml و برای آنزیم 35/1±13/3 ALT Iu/ml در رت می باشد. همچنان که مشخص است میزان آنزیم های ALT وAST در گروه A بعد از مصرف سالمونلا افزایش چشمگیری را نشان می دهد. اما در گروه هایB و C میزان آنزیمها در قبل و بعد از آزمایش تقریبا در محدوده نرمال باقی مانده است. پس از ثبت نتایج آنزیمی، از روش های آماری t-test و Anova برای مقایسه تغییرات ایجاد شده در گروه های مختلف استفاده گردید که نتایج حاصل از بررسی t-test در نمودارهای (1و2) نشان داده شده است. بر اساس تست آماری t-test افزایش آنزیم ALT در گروه A بعد از آزمایش نسبت به قبل از آزمایش معنادار می باشد. (P<0/001) اما در گروه B (P=0/612) وگروه C (P=0/652) این افزایش غیر معنادار می باشد در مورد آنزیمAST نیز در گروه A افزایش آنزیم بعد از آزمایش نسبت به قبل از آن معنادار می باشد(P<0/001). اما در گروه B (P=0/305) وC (P=0/827) این افزایش غیر معنادار می باشد. بر اساس تست آماری Anova نیز، افزایش آنزیمAST در گروه A نسبت به گروه هایB و C معنادار می باشد(P=<0/001) همچنین افزایش آنزیم ALT درگروه A نسبت به گروههایB وC معنادار می باشد (P=0/001). برای مقایسه تغییرات ایجاد شده در گروه های

www.SID.ir

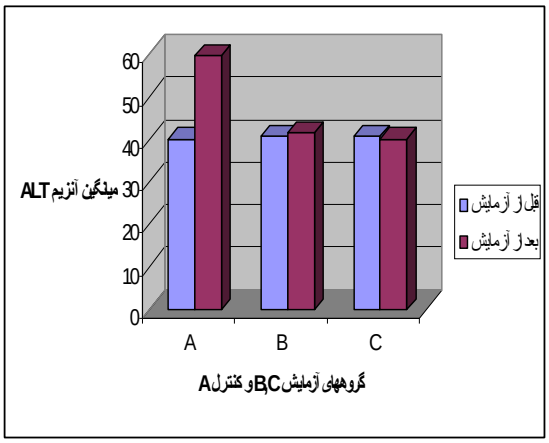
Archive of SID

آزمایش B و C مجددا از تست آماری t-test استفاده گردید. بر اساس این تست افزایش آنزیم ALT بین گروه B و C غیر معنادار می باشد (P= 0/8). همچنین افزایش آنزیمAST بین دو گروه مذکور نیز غیر معنادار می باشد (P=0/ 8).

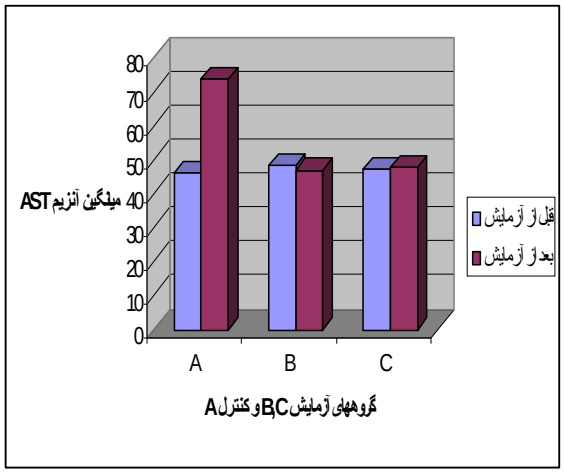
جدول 1. مقایسه میانگین آنزیم های کبدیALT و ALS در حالت نرمال و بعد از انجام آزمایش در گروهA,B,C

گروه	آنزیم	میانگین	p
A	AST قبل از آزمایش	46/5	P</001
	AST بعد از آزمایش	72/62	
	ALT قبل از آزمایش	40/125	P</001
	ALT بعد از آزمایش	59/625	
B	AST قبل از آزمایش	48/2	P =. /305
	AST بعد از آزمایش	47	
	ALT قبل از آزمایش	40/8	P =. /612
	ALT بعد از آزمایش	41/5	
C	AST قبل از آزمایش	47/3	P =. /827
	AST بعد از آزمایش	47/7	
	ALT قبل از آزمایش	40/8	P =. /652
	ALT بعد از آزمایش	40/1	

بر اساس t-test (یافته ها با p<./.5 معنادار و با p>./.5 غیر معنادار) می باشد.



نمودار 1. مقایسه میانگین آنزیم های کبدیALT و ALS در حالت نرمال و بعد از انجام آزمایش در گروهA,B,C



نمودار2. مقایسه میانگین آنزیم های کبدیALT و ALS در حالت نرمال و بعد از انجام آزمایش در گروهA,B,C

بحث

در مطالعه حاضر تجویز خوراکی مخمر *ساکارومایسزبولاردی* به عنوان یک پروبیوتیک به تعداد 10^7 و 10^8cfu/ml توانست از استقرار و سیطره باکتری سالمونلا پس از عفونت تجربی به مقدار زیادی جلوگیری نماید. همچنین از بروز عفونت کلینیکی و مرگ کاست. در یک بررسی که در سال 2002 انجام گرفت بعد از خوراندن *ساکارومایسز بولاردی* و *سالمونلاتیفی موریوم* به گروهی رت مشخص شد که این مخمر نقش به سزایی در کاهش رشد سالمونلا داشته است. که البته مکانیزم این کاهش رشد هنوز به طور کامل شناخته نشده است(13) ولی محققین بر این عقیده اندکه تولید مواد ضد میکروبی یکی از مکانیسم های محتمل عملکرد این مخمر در شرایط محیطی بدن می باشد. تاثیر دیگر این مخمر مکانیسم رقابتی متابولیت های حاصل از آن با باکتری های بیماری زا برای اتصال به گیرنده های سطح سلول های میزبان می باشد که این مکانیسم به عنوان یکی از عملکرد های مهم این مخمر می تواند مطرح باشد (14و1). در شرایط آزمایشگاه *ساکارومایسز بولاردی* به طور مستقیم سیستم کمپلمان را فعال کرده وC3b را تثبیت می کند و افزایش فاگوسیتوز ناشی از *ساکارومایسز بولاردی* توسط سلول های تک هسته ای وابسته به کمپلمان است (8 و12). خوردن *ساکارومایسز بولاردی* باعث افزایش IgA ترشحی در روده کوچک رتها می شود(2). باتز و همکاران دریافتند که موش های شیرخواره تازه از شیر گرفته شده که 5/. میلی گرم به ازاء هر گرم وزن بدن *ساکارومایسز*

www.SID.ir

Archive of SID

بولاردی دریافت کرده بودند 80% افزایش در جزء ترشحی در سلول های کریپتی نسبت به گروه کنترل داشتند. در انسان های داوطلب که به میزان 1 گرم در هر روز و به مدت 7 روز *ساکارومایسز بولاردی* دریافت کرده بودند سلول های دفاعی خون محیطی افزایش یافت که نشانگر یک فرایند التهابی بود (12و8و15). ولی افزایش قابل توجهی در تعداد میانگین ائوزینوفیل ها، لنفوسیت ها، مونوسیت ها و پلاکت ها دیده نشد(16).

گالین و همکاران پروتئینی را که دارای فعالیت پروتئازی است گزارش نمودند که به وسیله *ساکارومایسز بولاردی* تولید می شود این پروتئین اگزوژن و درشت، ترشح مایعات را در قسمتی از روده رت که دو سر آن بسته شده کاهش می دهد. محصول شبه پروتئاز از اتصال انتروتوکسین به لبه های مسواکی ایلئوم رت کم کرده و تراوایی مانیتول را در لوپ های ایلئوم رت تا 93% کاهش می دهد(17و5). این پروتئاز گیرنده های سموم را می کاهد(17). *ساکارومایسز بولاردی* غلظتCAMP ناشی از آندوتوکسین باکتری های گرم منفی را کاهش می دهد. این مخمر در یکی از مراحل فعال شدن آدنیلات سیکلاز وارد شده و مکانیسم فعال شدن را بلوکه می کند و از عبور الکترولیتها از غشاء جلوگیری می نماید (7). زروکا پیشنهاد نمود *ساکارومایسز بولاردی* از راه تاثیر بر گیرنده های مخاطی عمل می نماید(7) در تحقیقات دیگر به اثر آنتاگونیستی و مهاری مخمر بر روی میکروارگانیزم ها اشاره می شود و می گویند مخمر می تواند متابولیتهایی تولید نماید که بر باکتریها اثر گذاشته و باعث مرگ آنها شود. همچنین این مخمر قادر است که فعالیت ضد لیزوزومی را در باکتری های لاکتوز + و لاکتوز ـ روده ای کاهش دهد. بنابراین به عنوان یک عامل مفید در درمان باکتری های بیماری زای روده ای می تواند مطرح شود (18).

در مورد آنزیم های کبدی ALT وAST نیز محققین مختلف ثابت می کنند که گونه‌های مختلف سالمونلا در افزایش آنزیم های ALT, AST و غیره می‌توانند ایفای نقش کنند. از جمله دادرس و همکاران در سال 2002 طی تحقیقی به این نتیجه رسیدند که بعد از آلودگی تجربی جوجه بلدرچین به سالمونلا پولوروم تغییرات معناداری در مقادیر پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون جوجه‌ها مشاهده شد. از جمله افزایش معناداری در مقدار آنزیم AST مشاهده گردید(5). محققین معتقدند فعالیت این آنزیم و ALT با تغییر در نفوذپذیری سلول های کبدی افزایش می‌یابد که بیماری های مختلفی می توانند چنین تغییراتی را ایجاد نمایند. از جمله می توان به هپاتیت های عفونی، سیروز کبدی، یرقان های انسدادی و لپتوسپیروز اشاره نمود که سبب افزایش آنزیمALT می شوند. همچنین سیروز کبدی، کارسینومای متاستاتیک، هپاتیت های ویرال و بیماری های عفونی کبد می توانند سبب افزایش آنزیم AST شوند(6و19). با توجه به اینکه باکتری سالمونلا نیز قادر به حمله به هپاتوسیت ها نیز می باشد بنابراین می‌توان ارتباطی منطقی بین افزایش آنزیم های فوق و ضایعات سلول های کبدی حاصل از باکتری برقرار نمود از سوی دیگر برخی محققین معتقدند که این مخمر قادر به راه یافتن به خون می باشد (8). به عبارت جامع تر حضور سلول های آماسی به دلیل نقش مخمر در تحریک سیستم ایمنی و ایجاد فرایندهای التهابی بوده است(20). همچنین احتمال وجود عفونت های دیگر به غیر از باکتری سالمونلا در کبد که به طور همزمان روی داده نیز بعید نمی باشد.

همان طور که در بخش نتایج ذکر شد افزایش آنزیمهایAST وALT بعد از آزمایش در مقایسه با قبل از آزمایش با استفاده از تست آماری t-test وAnova سنجیده شد و مشخص گردید این افزایش در گروه کنترل نسبت به گروه های آزمایش معنادار است و این خود موید تاثیرات مفید مخمر در جلوگیری از ضایعات کبدی می باشد. در مورد مقایسه نتایج آنزیمی گروه های آزمایش B وC با استفاده از تست آماری t-test مشخص شد که اختلاف معناداری بین دو گروه وجود ندارد و این یافته حاکی از این است که احتمالا 10^7 cfu/ml مخمر با 10^8 cfu/ml مخمر در جلوگیری از ضایعات پاتولوژیک اختلاف چندانی ندارند. به عبارت جامع تر 10^7 cfu/ml مخمر نیز قادر به محافظت از سلول های کبدی بوده است و اما اینکه حداقل مقدار محافظت کننده مخمر چه میزان می باشد نیاز به بررسی های بیشتری دارد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده *ساکارومایسز بولاردی* در پیشگیری از ضایعات کبدی ناشی از تخریب هپاتوسیت ها که منجر به آزادسازی بیش از حد آنزیم های کبدی می شود می تواند ثمر بخش واقع شود.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1- Bronet M, Bergogne E. *Bacterial growth in entermination value of the addition of Saccharomyces boulardii*. SCI Aliments.1986;20:63-73.

2- Carter G, Changappa M. *Essential of veterinary bacteriology and mycology*. 4th ed. Lea & febiger. 1991.pp:327-331.

3- William C.*Thomson ṡpecial veterinary pathology*. 2nd edition. Mosby company.1995.pp:345-348.

4- Brown HB. *Tylosin and cholertetracyclin for the prevention of liver abscecces*. Journal of animal scince. 2005; 40(2):207-213.

5- Dadras H, Nazifi S. *Changes of blood biochemical parameteres in experiment contamination of young coturrnix quail by S.pullurom*. abstracts of 3rd congress of pultry health and disease Shiraz university iran.2002;pp:37-38.

6- Kirollov DA, Peronova NB. *Modifying action of S.boulardii on the biological properties of enterobacteria*. Zh Microbiol Epidemiol Immunobiol. 2002; 4:57-59.

7- Czerucka D, Roux I. I*nvitro antidiarrheic effecct of yeasts, S.boulardii.*Gastroenterology.1992;102:207-9.

8- MachadoCaetano JA, Parames MT. *Immno pharmacological effect of S.boulardii in healthy volanteers*. International journal of immuno pharmacology. 1986;8:245-249.

9- Sharma SN, Idlakha SC. *Text book of Veterinary Microbiology*. Firsted edition. Vilkas publishing house.1997;pp:311-315.

10- Tang P, Foubister V. *Methods to study bacterial invasion*. J Microbiol Meth. 1999;18:.227-240

11- Mc Cullough M J.*Species identification and virolencce attributes of S.boullardii*. Journal of clinical Microbiology . 2005;36:2613-2617.

12- Macfarland LV, Bernasconis P. *Saccharomyces boulardii a review of an innovative biotherapeutic agent*. Microbial ecology in health and disease.1993;6 :157-171.

13- Gedek BR. *Adherence of Escherichia coli serogroup O 157 and S.typhimurium mutant DT 104 O to the surface of S.boulardii*. Mycoses. 2002;42:261-264.

14- Brandao R ,Lcastro IM. *Intracellular signal triggered by cholera toxin in S.boulardii and S.cerevisiae.*,Applied and environmental Microbiology.2002;64:564-568.

15- Buts JP, Dekeyser NS. *Boulardii up grade cellular adaptation after proximal enterectomy in rats*.International journal of immunopharmacology. 1999;45(10):89-96.

16- Body A,V Elmer GW. *Influence of antibiotics on the recovery and kinetics of S.boulardii in rats*.Pharmaceatical search.2006;8:786-800.

17- Gulin PA, Danbara H. *Molecullar analysis of SPV Virolence gene of the Salmonella virollence plasmid*. Molecullar Microbiology.2010;7:825-830.

18- Rigothier MC, Maccario J. *Reports on individual drugs ,S.boullardii:avaluable adjunet in recurrent clostridium difficile disease*. drug information. 2001; 9(1):12-14

19- Ghoshs MA, Vorha H, Ganguly NK. *Interaction of a rat liver and intestinal brush border membrane glycoprotein with type-1 fimbriae of S.typhimurium*. Mol Cell Biochem.1999;24:125-131.

20- Rodrigues AC, Nardi RM. *Effect of S.boulardii against experimental oral infection with Salmonella typhimurium and SHigella flexneri in conventional and gnotobiotic mice*. J APPL Bacterial.1996;81:251-256.

www.SID.ir