

بررسی اثر ضد باکتریایی ترکیب عصاره سیربا نانوذرات نقره بر اشریشیا کلی جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری

الهویردی قنبری^۱

۱- دانشجوی دکتری تخصص (Ph.D) میکروبیولوژی، گروه علوم پایه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان

Allahverdy1363@gmail.com

چکیده

عفونت دستگاه ادراری UTI یا (Urinary tract infection) نوعی عفونت باکتریایی است که بر بخشی از دستگاه ادراری تأثیر می‌گذارد. عامل اصلی عفونت مذکور/شرشیا کلی است، با این حال ندرتاً باکتری‌های دیگر، ویروسها یا قارچ نیز ممکن است موجب آن شوند. عفونت‌های دستگاه ادراری معمولاً در زنان نسبت به مردان بیشتر رخ می‌دهد.

مواد و روشها:

در مطالعه حاضر ۵۰ نمونه ادرار کشت مثبت از نظر باکتریایی بعد از تعیین نوع باکتری وارد مطالعه شدند. شایان ذکر است تمام جدایه مربوط به/شرشیا کولی بودند که جهت تایید نهایی تستهای افتراقی بیوشیمیایی نیز صورت گرفته، جهت انجام تست آنتی بیوگرام از محیط کشت مولر هینتون اگر استفاده شد.

نتایج تحقیق:

در این مطالعه مشاهده شد که ۳۵ نمونه (۷۰٪) از نمونه‌ها دارای حسایت نسبت به ترکیب عصاره سیربا نانوذرات نقره حساس (Sensitive) بودند. ۱۰ نمونه (۲۰٪) دارای حسایت متوسط (Intermediat) و ۵ نمونه (۱۰٪) مقاوم (Resistance) به ترکیب مورد نظر بودند.

بحث و نتیجه گیری:

امروزه استفاده بی رویه از آنتی بیوتیکها باعث بوجود آمدن مقاومت دارویی باکتریها شده است و یکی از راههای حل این مشکل استفاده از داروهای بر پایه عصاره گیاهان میتواند باشد که ما نیز در این تحقیق بعد از بررسی دریافتیم که عصاره سیر میتواند در کنار سایر داروهای درمانی مورد استفاده قرار بگیرد.

کلمات کلیدی: عصاره سیر، اشریشیاکلی، نانوذرات نقره، عفونت ادراری آنتی بیوگرام

۱. مقدمه

عفونت دستگاه ادراری UTI یا (Urinary tract infection) نوعی عفونت باکتریایی است که بر بخشی از دستگاه ادراری تأثیر می‌گذارد. هنگامی که عفونت، دستگاه ادراری تحتانی را مبتلا می‌کند سیستیت ساده (عفونت مثانه) نامیده می‌شود و هنگامی که بر دستگاه ادراری فوقانی تأثیر می‌گذارد به آن پیلونفریت (عفونت کلیه) گفته می‌شود. عفونت‌های دستگاه ادراری معمولاً در زنان نسبت به مردان بیشتر رخ می‌دهد، نیمی از زنان در طول زندگی خود حداقل به یک عفونت مبتلا می‌شوند. در زنان، عفونت‌های دستگاه ادراری شایع‌ترین شکل عفونت‌های باکتریایی است و هر سال ۱۰٪ به میزان عفونت‌های دستگاه ادراری افزوده می‌شود. بروز مجدد بیماری امری شایع است. علائم مربوط به دستگاه ادراری تحتانی عبارتند از دفع ادرار همراه با درد یا تکرر ادرار یا اضطراب برای ادرار (یا هر دو)، در حالی که علائم مربوط به پیلونفریت عبارتند از تب و درد پهلو به همراه علائم مربوط به عفونت دستگاه ادراری تحتانی (۲). این علائم در افراد مسن یا بسیار کم سن و سال ممکن است مبهم یا نامشخص باشند. عامل اصلی هر دو نوع عفونت مذکور اشرشیا کلی است، با این حال ندرتاً باکتری‌های دیگر، ویروسها یا قارچ نیز ممکن است موجب آن شوند. باکتری که باعث عفونت دستگاه ادراری می‌شود به‌طور معمول از طریق مجرای خروجی مثانه وارد آن می‌شود (۵). با این حال ممکن است عفونت از طریق فیستول‌های روده، خون یا لنف نیز رخ دهد. اعتقاد بر این است که این باکتری معمولاً از روده به مجرای خروجی مثانه منتقل می‌شود، و خطر این مسئله در زنان به علت آناتومی آنها بیشتر است (۶). در موارد روشن، می‌توان تنها بر اساس علائم نسبت به تشخیص و درمان اقدام کرد و نیازی به تأیید بیشتر از طریق آزمون‌های آزمایشگاهی نیست. در موارد پیچیده یا مشکوک، ممکن است تأیید تشخیص از طریق آنالیز ادرار و جستجو به دنبال حضور نیتريت در ادرار، سلول‌های سفید خون (لکوسیت‌ها)، یا لکوسیت استراز باشد. یکی دیگر از آزمایش‌ها، یعنی آزمایش میکروسکوپی ادرار به دنبال حضور سلول‌های قرمز خون، سلول‌های سفید خون، یا باکتری می‌باشد. کشت ادرار در صورتی مثبت تلقی می‌شود که تعداد کلنی‌های باکتریایی بزرگتر یا مساوی به ۱۰۳ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در هر میلی‌لیتر ارگانیسیم متداول در دستگاه ادراری باشد (۴). با توجه به آنچه که درباره بیماری عفونت ادراری ذکر شد این بیماری میتواند عوامل باکتریال و قارچی متفاوتی داشته باشد لذا عامل ایجاد عفونت ادراری برای درمان خیلی مهم میتواند باشد. از میان عوامل باکتریایی، اشرشیا کولی از اهمیت بالایی برخوردار است (۲۲)

در سال ۱۸۸۵، اولین بار تئودور اش‌ریخ این باکتری را در مدفوع افراد سالم پیدا کرد و آن را *Bacterium coli commune* نامید. سپس در سال ۱۸۹۵ می‌گولا این باکتری را باسیلوس کلی نامید. بعدها در جنس اش‌ریشیا طبقه‌بندی شد *E. coli*، باسیل گرم منفی، متحرک، هوازی بی‌هوازی اختیاری و بدون اسپور است. رشد بهینه باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد است اما تا دمای ۴۳ درجه را نیز تحمل کرده و به رشد خود ادامه می‌دهند. *E. coli* یکی از متنوع‌ترین گونه‌های باکتریایی است بطوریکه ۲۰ درصد از ژنوم آن بین سویه‌های مختلف، مشترک است (۱۰). اش‌ریشیا کولی نخستین ارگانیسمی بود که با روش‌های مهندسی ژنتیک مورد دست‌ورزی ژن قرار گرفت. از *E. coli* برای کلونینگ و بیان بسیاری از ژن‌ها و تولید محصولات نو ترکیب استفاده شده‌است به عنوان مثال، با استفاده از مهندسی ژنتیک، دانشمندان توانسته‌اند از اش‌ریشیا کلی، انسولین تولید کنند. اش‌ریشیا کلی‌های باتولید سم‌های LT یا ST موجب مسمومیت غذایی می‌شود. اش‌ریشیا کلی انتروپاتوژن با آسیب مستقیم به بافت روده موجب اسهال در کودکان می‌شود (۲۶). اش‌ریشیا کولی انتروهموراژیک با ترشح توکسین شبیه شیگا موجب اسهال خونی می‌شود. اش‌ریشیا انترواینویزیوهمانند شیگلا بطور مستقیم با تهاجم بافتی به سلول‌های روده آسیب می‌رساند. اش‌ریشیا اوروپاتوژنیک در ایجاد عفونت مجرای ادراری بویژه سیستمیت نقش دارد (۸) سروتیپ‌های اش‌ریشیا کلی بر اساس آنتی‌ژن‌های (O) سوماتیک، فلاژل و K کپسولی انجام می‌گیرد. آنتی ژن O، قسمتی از لیپو پلی ساکارید، به طور مخفف LPS است. در واقع، قسمت‌های قندی تکراری (از ۱ تا ۴۰ تکرار) و ایمونولوژیک است که در سطح LPS قرار می‌گیرد. آنتی ژن K مربوط به کپسول است که باکتری را دربر گرفته‌است. آنتی ژن H مربوط به فلاژل باکتری است که از جنس پروتئین می‌باشد. تعداد سروتیپ‌های آنتی ژن O، از ۱ تا ۱۸۱ می‌باشد. تعداد سروتیپ‌های آنتی ژن H از ۱ تا H56 است (۴). تشخیص معمولاً از طریق علائم بیماری و همچنین آزمایش‌های کشت میکروبی قابل انجام می‌باشد. با توجه به این که امروزه در بحث درمان پدیده مقاومت دارویی خیلی مهم است لذا انتخاب نوع دارو می‌تواند تعیین کننده باشد. در حال حاضر با توجه به استفاده بی‌رویه از آنتی بیوتیک‌ها، مقاومت باکتری‌ها به این ترکیبات روز به روز در حال افزایش است که این مسأله باعث می‌شود تا بشر به فکر جایگزین کردن عوامل ضد میکروبی مؤثر و با عوارض جانبی کمتر به جای مواد ضد میکروبی با اثر کمتر و عوارض ناخواسته بیشتر باشد (۲۳). امروزه شیوع نسبتاً بالای عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس و سودوموناس آئروژینوزا، اش‌ریشیا کلی و همچنین اثرات جانبی آنتی بیوتیک‌های رایج، علاوه بر ظهور سویه‌هایی با مقاومت‌های چند گانه، استفاده از روش‌های نوین در درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها را توصیه می‌شود. در حال حاضر، گسترش مقاومت دارویی در میان عوامل بیماری‌زای باکتریایی از یک سو و افزایش تمایل پزشکان به تجویز داروهای بی‌خطر از سوی دیگر، منجر به ابداع عوامل ضد میکروبی جدید و طبیعی گردیده است (۲۸). مطالعات گسترده‌ای بر روی انواع عصاره‌های گیاهان در چند سال گذشته صورت گرفته است. در میان مطالعات صورت گرفته خواص ضد باکتریایی عصاره سیر به علت دارا بودن ترکیبات خاص خیلی با اهمیت می‌باشد. سیر با نام علمی *Allium sativum* گیاهی متعلق به خانواده لیلیاسه بوده و بومی آسیای مرکزی می‌باشد، هر چند امروزه در تمام نقاط دنیا یافت می‌شود. در طول قرن‌های متمادی، گونه‌های مختلف سیر به عنوان چاشنی یا ادویه جهت خوش طعم نمودن غذاها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. سیر به عنوان یک مکمل طبیعی برای درمان انواع بیماری‌ها و اختلالات از قبیل فشار خون بالا، آلزایمر، ترومبوز، آسم، عفونت مطرح بوده است. تحقیقات نشان می‌دهند که این گیاه برای تنظیم کلسترول و قند خون و محافظت از سیستم قلبی-عروقی مفید بوده و سیستم ایمنی را برای مبارزه با بیماری‌های مختلف تقویت می‌نماید. همچنین سیر دارای خواص ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد قارچی، آنتی اکسیدانی و ضد التهابی می‌باشد (۳۲). حتی در برخی از تحقیقات، سیر به عنوان یک عامل ضد باکتریایی قوی شناسایی شده و خاصیت ممانعت‌کنندگی آن، هم بر روی بسیاری از باکتری‌های گرم منفی نظیر گونه‌های اش‌ریشیا،

پروتئوس، سالمونلا، سراشیا، سیتروباکتر، انتروباکتر، سودوموناس، کلبسیلا و نیز پورفیروموناس جینجیوالیس و هلیکوباکتر پیلوری و هم برعلیه باکتری های گرم مثبتی مثل استافیلوکوکوس آرئوس، استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس پنومونیه، استرپتوکوکوس سانگوئیس، استرپتوکوک های گروه A و نیز باسیلوس آنتراسیس به اثبات رسیده است. اصلی ترین ماده ضد میکروبی موجود در سیر، ترکیبی ارگانوسولفوری به نام تیو-۲ پروپن-۱ سولفینیک اسید- آلیل استرمی باشد که آلیسین نامیده می شود. امروزه ظهور تکنولوژی های جدید به عرصه درمان این امیدواری را بوجود آورده که می توان با استفاده از این تکنولوژی ها و همچنین با اتکا به خاصیت طبیعی برخی از مواد و محصولات دارویی را سنتز کرد که اولاً برای بدن خطرناک نباشند و ثانياً از پدیده مقاومت در برابر آنتی بیوتیک ها جلوگیری کرد، یکی از این روشها استفاده از عصاره برخی گیاهان، سبزیجات، میوه ها میتواند باشد. لذا تحقیق حاضر با توجه به این موضوع مهم طراحی گردید تا اجرای آن احتمالاً بتواند به حل بسیاری از مشکلات مطرح شده در این خصوص کمک کند (۳۳)

اهداف، سوالات و فرضیه ها:

هدف اصلی: ارزیابی تاثیر ضد میکروبی عصاره سیر بر روی باکتری های مسبب عفونت ادراری.

هدف کاربردی: تعیین و مقایسه میزان قدرت ضد میکروبی عصاره سیر بر باکتری های مسبب عفونت های ادراری.

سوال اصلی تحقیق: آیا عصاره سیر بر باکتری های مسبب عفونت های ادراری تاثیر ضد میکروبی دارد؟

سوال کاربردی تحقیق: آیا عصاره سیر می تواند جایگزین مناسبی بجای آنتی بیوتیک های متداول مورد استفاده بر علیه باکتری های مسبب عفونت های ادراری باشد؟

فرضیه ها:

۱. عصاره سیر خاصیت آنتی بیوتیکی بر روی باکتری اشیریشیا کلی مسبب عفونت ادراری دارد.

متغیرهای تحقیق:

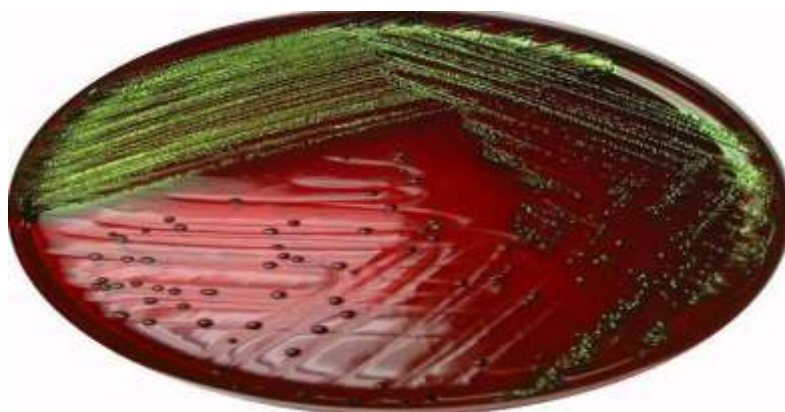
متغیر مستقل: باکتری اشیریشا کلی

متغیر وابسته: خاصیت آنتی بیوتیکی عصاره سیر

چارچوب نظری تحقیق (مدل تحقیق): تحقیق مورد نظر از نوع توصیفی مقطعی است.

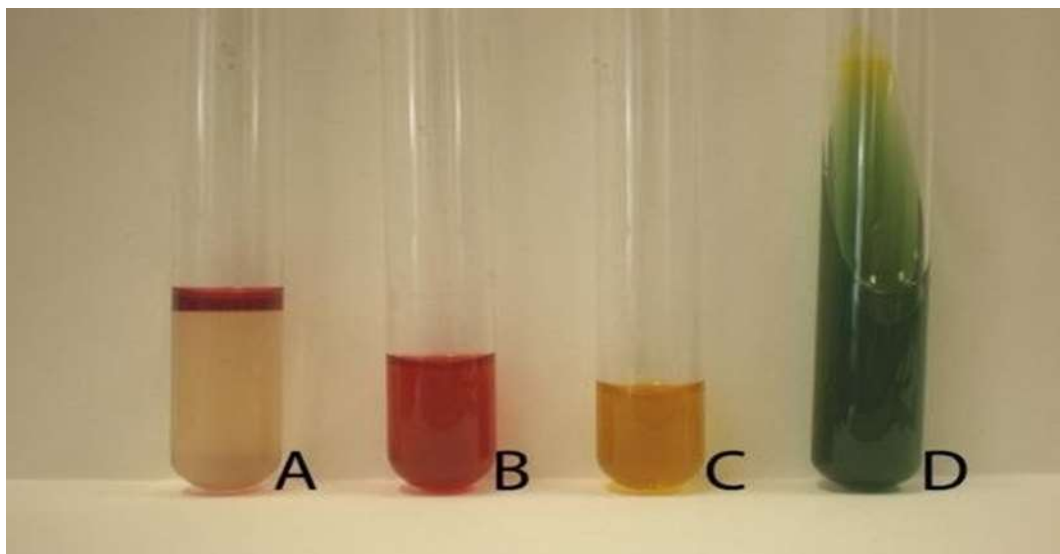
مواد و روش

در مطالعه که از نوع توصیفی-مقطعی می باشد تعداد ۵۰ نمونه ادرار از مبتلایان به عفونت ادراری در گروه های سنی و جنسی مختلف مراجعه کننده به آزمایشگاه های خصوصی شهر تبریز در یک بازه سه ماهه در سال ۱۴۰۱ جمع آوری شدند، پس از جداسازی عامل باکتریائی مربوط به هر نمونه، بر اساس پروتکل استاندارد، جدایه های اشریشیا کولای وارد مطالعه شد. تمام نمونه ها در کمتر از ۴۵ دقیقه مورد کشت میکروبی بر روی محیط کشت های بلاد آگار و انئوزین متیلن بلو (EMB) واقع شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نمونه ها از نظر کشت اولیه میکروبی بررسی شدند. و در صورتی که شاهد رشد باکتری بر روی محیط کشت بودیم جهت تعیین هویت باکتری تستهای بیوشیمیایی و افتراقی را انجام دادیم و بعد از اطمینان از حضور سویه مورد نظر ما در این مطالعه، تعداد ۵۰ نمونه مثبت و تعیین هویت شده که حتما باکتری اشریشیا کلی باشند جهت انجام مطالعات تکمیلی وارد تحقیق شدند. شکل ظاهری کلنی ها و سایر موارد بررسی روی محیط کشتهای اشاره شده مورد بررسی واقع شدند. به جهت تشخیص نهایی نوع میکروارگانیسم تستهای افتراقی بر روی نمونه ها انجام شد.



شکل (۱) رشد باکتری اشریشیا کولی بر روی محیط کشت انئوزین متیلن بلو

رشد باکتری اشریشیا کلی بر روی محیط کشت انئوزین متیلن بلو را نشان میدهد که در این محیط کشت به عنوان یک محیط انتخابی و افتراقی برای اشریشیا کلی محسوب می شود و وجه تمایز آن نیز ایجاد جلای سبز رنگ بر روی این محیط کشت می باشد.



شکل (۲) تست های افتراقی برای تشخیص باکتری اشرشیا کلی

لوله A آزمایش ایندول مثبت را نشان می دهد. نتیجه مثبت، پس از افزودن معرف Kovács، به صورت لایه ای قرمز در بالای لوله قابل مشاهده است.

لوله B آزمایش متیل رد مثبتی را نشان می دهد که با افزودن معرف متیل رد، رنگ محیط قرمز شده است.

لوله C، تست Voges-Proskauer را نشان می دهد که عدم تغییر رنگ پس از افزودن معرف های باریت A و B نشان دهنده ی نتیجه ی منفی برای این تست است .

لوله D آزمون سیترات را نشان می دهد که عدم رشد و عدم تغییر رنگ لوله، نشان دهنده ی نتیجه منفی تست است.

روش کار: ابتدا محلول عصاره سیرو نانوذرات نقره صورت تجاری خریداری شد. عصاره سیر و نانوذرات نقره با نسبت مساوی باهم مخلوط شده و به مدت ۳ روز در یک ظرف کاملاً استریل نگهداری شد. سپس با استفاده از دیسک های بلانک و پس از تعیین حداقل غلظت مهاری و حداقل غلظت کشندگی عصاره مذکور بر مبنای روش میکرو دایلوژن، با تهیه یک غلظت پائین تر و یک غلظت بالاتر از MIC و MBC ترکیب مذکور، دیسک های مشابه آزمایش آنتی بیوگرام تهیه شدند. برای انجام تست آنتی بیوگرام ابتدا از روی محیط کشت بلاک اگر مقداری کلنی برداشته سپس به سرم فیزیولوژی اضافه شد و سوسپانسیون معادل نیمه مک فارلند تهیه شد. به جهت استاندارد کردن سوسپانسیون میکروبی جذب نوری سوسپانسیون با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد و با استاندارد نیمه مک فارلند مورد مقایسه قرار گرفت. سپس با استفاده از سوآپ استاندارد در کنار شعله و در زیر هود میکروب شناسی جدایه بر روی محیط کشت مولر هینتون کشت داده شد و دیسکهای تهیه شده ترکیب عصاره سیر با نانوذرات نقره نیز بر روی پیلت قرار داده شد. پللیت ها به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و بعد از ۲۴ ساعت با استفاده از خط کش مخصوص آنتی بیوگرام قطر منطقه عدم رشد اندازه گیری شد و ثبت گردیدند.

نتایج تحقیق:

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که در آن ۳۵ نمونه (۷۰٪) از نمونه‌ها حساس (Sensitive) به ترکیب عصاره سیر و نانوذرات نقره، ۱۰ نمونه (۲۰٪) دارای حسایت متوسط (Intermediat) و ۵ نمونه (۱۰٪) مقاوم (Resistance) بودند.

از تعداد ۳۵ نمونه حساس، ۲۵ (۵۰٪) نمونه‌ها در گروه سنی (۳۳-۴۳) سال بودند. ۵ نمونه (۱۰٪) افراد بالای ۴۵ سال، ۴ نمونه (۸٪) مربوط به گروه سنی (۲۱-۱۱) و ۱ نمونه (۲٪) مربوط به گروه سنی (۱۰-۱) را شامل می‌شود.

بحث و نتیجه‌گیری:

نتیجه این مطالعه نشان داد که ۳۵ نمونه (۷۰٪) از نمونه‌ها دارای حسایت نسبت به ترکیب عصاره سیر و نانوذرات نقره بودند و در این رابطه در مطالعه صورت گرفته توسط مولانا اثر ضد باکتریایی عصاره سیر بر روی سوش‌های استاندارد سودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی قرار گرفت و اعلام داشت که از این عصاره می‌توان برای درمان سودوموناس آئروژینوزا استفاده کرد. نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر نیز خاصیت ضد باکتریایی عصاره سیر را بیان می‌کند ولی با این تفاوت که مطالعه حاضر بر روی نمونه‌های بالینی انجام شده و جدایه مورد بررسی اشریشیا کلی بوده در حالی که تحقیق مولانا بر روی سوش‌های استاندارد سودوموناس آئروژینوزا صورت گرفته. در مطالعه دیگری ابوالفضل جعفری اثر غلظتهای مختلف عصاره متانولی سیر بر روی باکتریهای استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی را بررسی کرد و مشخص شد که این عصاره اثر بازدارندگی فراوانی بر روی هر دو باکتری مورد آزمایش دارد و هر چقدر میزان غلظت عصاره متانولی افزایش یابد اثر بازدارندگی نیز به مقدار قابل توجهی افزایش می‌یابد. این مطالعه نیز نشان داد که عصاره آبی سیر دارای اثر ضد باکتریایی بر روی اشریشیا کلی بوده است.

مقاومت روز افزون باکتری‌ها به عوامل ضد میکروبی مشکل عمده در سراسر جهان می‌باشد. از آنجا که باکتری‌ها جهش پیدا کرده و با کسب ژن‌های جدید خود را با شرایط مختلف سازگار می‌کنند، لذا در برابر آنتی‌بیوتیک‌های جدید می‌توانند مقاومت کسب کنند. امروزه برخلاف پیشرفت‌های گسترده در حوزه درمان و پزشکی، بیماری‌های عفونی یکی از عوامل اصلی مرگ و میر و از نگرانی‌های جدی در سازمان بهداشت جهانی محسوب می‌شوند. معمولاً برای کنترل بیماری‌های عفونی از داروهای ضد میکروبی که بصورت تجاری در دسترس می‌باشند، استفاده می‌شود. استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به گسترش مقاومت دارویی چندگانه (MDR) در مورد اغلب پاتوژن‌های باکتریایی گردیده است. (۱۴) در سال‌های اخیر، افزایش مقاومت دارویی به عنوان مهم‌ترین مانع درمان موفق بیماری‌های عفونی و کنترل پاتوژنیست. عوامل میکروبی به شمار می‌رود. گیاهان دارویی در سرتاسر جهان به شدت در طب عامیانه استفاده می‌شود؛ بنابراین، غربالگری چنین گیاهان ممکن است منجر به کشف ترکیبات مؤثر جدیدی شود که قادر به مهار میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا هستند. ترکیباتی که می‌توانند رشد پاتوژن‌های بیماری‌زا را مهار کنند و یا آنها را بدون سمیت به سلول‌های میزبان مهار کنند. سیر یکی از مهمترین گیاهان دارویی معطر و طعم‌دار با دامنه وسیعی از فعالیت‌های ضد میکروبی علیه انواع میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا است و در عین حال می‌تواند بدن را از پاتوژن‌ها محافظت کند (۲۵).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ترکیب عصاره سیر با نانوذرات نقره بر روی باکتری مورد بررسی دارای خاصیت ضد باکتریایی داشته و فرضیه این مطالعه با توجه به نتایج مورد تایید واقع شد و لذا بررسی و مطالعات بیشتر در مورد خاصیت آنتی‌بیوتیکی این ماده طبیعی از نظر علم داروسازی و شیمی امری ضروری به نظر می‌رسد.

Reference:

1. Marjolein, F E.D. P. Yzerman, V., Helene, A., Boelens, M. 1999 Follow-Up of 3. *S.aureus* Nasal Carriage after 8 Years: Redefining the Persistent Carrier State. *Journal of .Clinical Microbiology*. 37(10):3133-3140
2. Okoye, Afamefuna L.2010. In Vitro Determination of Bactericidal Effects of Garlic 7 (*Allium sativum*) on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nigerian Journal of .Scinece, Technology and Environmental Education*
3. Shopsisin, B., Kreiswirth, B.2001. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging infectious Disease Journal*. 7(2):323-6
4. Sivam, G.P, J.W., Ulness, B., Swanzy, S.R., Potter, J.D 1997. *Helicobacter pylori*-in vitro susceptibility to garlic (*Allium sativum*) extract. *Nutr. Cancer*. 27:118-121
5. Soomro AH, Bhutto B. Isolation of *Escherichia coli* from raw milk productions in 10. relation to public health sold under market conditions at tandojam. *Pakistan Journal of .Nutrition* 2002; 1 (3): 151- 2
6. enaillon O, Picard B, Denamur E (March 2010). "The population genetics of commensal *Escherichia coli*". *Nature Reviews. Microbiology*. 8(3):207–17.
7. Singleton P (1999). *Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine* (5th ed.). Wiley. pp. 444–54 , 978-0-471-98880-9
8. *Escherichia coli*". CDC National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. (5), 21-25. Retrieved 2 October 2012
9. Russell JB, Jarvis GN (April 2001). "Practical mechanisms for interrupting the oral-fecal lifecycle of *Escherichia coli*". *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 3 (2): 265–72.
10. Fu YJ, Zu YG, Chen LY, Shi XHG, Wang Z, Sun S, Efferth T. Antimicrobial 15. activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytother Res* 2007; 21:989–999
11. Erdogrul OT. Antibacterial activities of some plant extracts used in folk medicine. *.Pharm Biology* 2002; 40:269–273
12. Komgeum J, Meli AL, Manfou RN, Lontsi D, Ngounou FN, Kuete V, Kamdem HW, Tane P, Ngadjui BT, Sondengam BL, Connolly JD. Xanthones from *Garcinia meathmannii* (Oliver) and their antimicrobial activity. *Phytochemistry* 2005; 66:1713-1717
13. Ouahouo BM, Azebaze AG, Meyer M, Bodo B, Fomum ZT, Nkengfack AE. 18. Cytotoxic and antimicrobial coumarins from *Mammea Africana*. *Ann Trop Med Parasitol* 2006; 98:733-739
14. Haciseferogullari H, Ozcan M, Demir F, Calisir S. Some nutritional and 19. technological properties of garlic (*Allium sativum*). *J Food Eng* 2007; 68(4): 463-9
15. Peng Q, BuzZard AR, Lau BH. Neuroprotective effect of garlic compounds 20. in amyloid-beta peptide-induced apoptosis in vitro. *Med Sci Monit* 2008; 8:328–33
16. Mahmoodi M, Islami MR, Karam AGR, Khaksari M, Sahebghadam LA, Hajizadeh MR, Mirzaee MR. Study of the effects of raw garlic consumption on the level of lipids and other blood biochemical factors in hyperlipidemic individuals. *Pak J Pharm Sci* 2006; 19:295–298
17. Ankri S and Mirelman D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection* 2009; 1:125–129

- 18.Sivam GP. Protection against *Helicobacter pylori* and other bacterial infections by garlic. J Nutr 2010; 131(3s): 1106S-1108S
- 19.shobana S, Vidhya VG, Ramya M. Antibacterial activity of garlic varieties (*Ophioscordon* and *Sativum*) on enteric pathogens. Current Res J BiolScie 2011; 1(3): 123-126
- 20.Sadeghian A, Ghazvini K. Antimicrobial activity of garlic extract against *Shigella*. Inter J Mole Scies (IJMS) 2012; 27(3): 142-144
- 21.Koch HP, Lawson LD. Toxicity, side effects and the unwanted effects of garlic. In: 26. HP Koch and LD Lawson 2013; (Ed.) pp. 221–228
- 22.Lawson LD, Wang ZL. Prehepatic fate of the organosulfur compounds derived from *(Allium sativum)*. Planta Medical 2013; 59(S):688-689
- 23.Aneela F, Tauqeer A, Shaistaj K, Deebea F, Zaidi N. Assessment of antibacterial activity of in vitro and in vivo grown garlic (*Allium sativum* L.). Pakistan Jurnal 2014; 43 (6): 3029-3033
- 24.Bokaeian M, Study of the antimicrobial activity of *Allium Sativum* extract on *Staphylococcus aureus* strains resistant to different antibiotics, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, 25. Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, I.R. of Iran, Microbiology research Jurnal, 2014. 50(14) 11-14
- 26.Khodaei Motlagh M, Antibacterial Effect of *Allium sativum* and *Rosmarinus officinalis* Essential Oil on Major Mastitis Pathogens in Dairy Cattle, Journal of Cell & Tissue, Spring 2014, 35(12) 17-21