

Frequency of Bifidobacterium Obtained from Mother's Milk and Their Infant Stool in Rural Areas of Markazi Province in 2015

Vahid Lohrasbi¹, Morteza Eshaghi², Meysam Hasannejad Bibalan³, Malihe Talebi^{1*},
Mohammad Reza Pourshafie⁴

1. Department of Microbiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. School of Health, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
3. Department of Microbiology, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran
4. Department of Microbiology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

(Received: 2018/03/12

Accept: 2018/05/28)

Abstract

Background: Intestinal colonization of the newborn is essential for establishment, maturation, and maintenance of the gut mucosal barrier. The greatest difference between the microbiota of breast milk and Infant formula feeding is the numbers and species composition of Bifidobacteria. In the present study, we tried to identify the native Bifidobacterium isolates obtained from the human's breast milk and the feces of their paired infants in rural areas of Markazi Province in 2015.

Materials and Methods: In the present descriptive study, 28 samples from mothers' milk and 28 samples from paired infants feces were collected and cultured. Suspicious colonies were picked up and confirmed by phenotypic identification and finally specific primers were designed for genotypic detection using PCR assay. Finally, the results were analyzed using SPSS, v. 18.

Findings: Out of 56 samples, 31 (55%) different Bifidobacterium species including 15 (36%) *B. bifidum*, 14 (34%) *B. longum*, and 12 (29%) *B. 1* were isolated, out of which, 12 (29%) isolates, including *B. longum* (6), *B. breve* (4), and *B. bifidum* (2), were shared between six mother-infant pairs. The correlation coefficient between bifidobacteria isolated from breast milk and infant feces was +0.821 (p -value <0.05).

Conclusion: Considering the 29 percent commonality and the positive correlation coefficient between breast milk and fecal bifidobacterium in our study, it is possible that the main source of intestinal bifidobacterium in the early stages of birth is breast milk.

Keywords: Bifidobacterium; Neonate; Breast-milk; Intestinal flora

* Corresponding author: Malihe Talebi
Email: talebi.m@iums.ac.ir

بررسی فراوانی گونه‌های بیفیدوباکتریوم جداشده از شیر مادر و مدفوع نوزادان مناطق روستایی استان مرکزی در سال ۱۳۹۴

وحید لهراسبی^۱، مرتضی اسحاقی^۲، میثم حسن نژاد بی‌بالان^۳، ملیحه طالبی^{۱*}، محمدرضا پورشفیغ^۴

- ۱- گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
- ۲- دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
- ۳- گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران
- ۴- گروه میکروبی‌شناسی، انستیتو پاستور، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۳/۷

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۱۲/۲۱

چکیده:

سابقه و هدف: کلونیزه شدن فلور نرمال یکی از نیازها ضروری نوزادان برای توسعه، بلوغ و حفظ سد مخاطی دستگاه گوارش آنهاست. بررسی‌ها نشان داده، تفاوت‌های بسیاری در تعداد و گونه‌های بیفیدوباکتریومهای فلور نوزادان تغذیه‌شده با شیر مادر و شیرخشک وجود دارد. هدف از این مطالعه، شناسایی بیفیدوباکتریومهای ایزوله شده از شیر مادر و نوزادان تازه متولدشده مناطق روستایی استان مرکزی در سال ۱۳۹۴ است.

مواد و روش بررسی: در این مطالعه توصیفی ابتدا ۲۸ نمونه شیر مادر به همراه ۲۸ نمونه مدفوع نوزادان تازه متولدشده جمع‌آوری و کشت داده شد. کلنی‌های مشکوک به بیفیدوباکتریوم جمع‌آوری و تست‌های تاییدی و تشخیصی فنوتیپی و در نهایت با استفاده از پرایمرهای اختصاصی شناسایی ژنوتیپی آنها با روش *PCR* انجام شد. در نهایت میزان همبستگی یا *correlation* به کمک نرم‌افزار *spss18* آنالیز شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، از بین ۲۸ نمونه شیر مادر به همراه ۲۸ نمونه مدفوع نوزادان تازه متولدشده، ۳۱ بیفیدوباکتریوم که شامل ۱۵ (۳۶ درصد) ب. بیفیدوم، ۳۴ (۱۴ درصد) ب. لانگوم و ۱۲ (۲۹ درصد) ب. بروه جداسازی شد. از این بین ۱۲ (۲۹ درصد) ایزوله که شامل ۶ ب. لانگوم، ۴ ب. بروه و ۲ ب. بیفیدوم بود بین شیر مادر و مدفوع نوزاد مشترک تشخیص داده شد. ضریب همبستگی بیفیدوباکتریومهای جداشده از شیر مادر در برابر مدفوع نوزادان شان عدد $0.821 + (p\text{-value} < 0.05)$ را از خود نشان داد.

نتیجه‌گیری: با مشاهده اشتراک ۲۹ درصدی و ضریب همبستگی مثبت بیفیدوباکتریوم جداشده بین شیر مادر و مدفوع نوزادان شان در این مطالعه، احتمال می‌رود که منشأ اصلی بیفیدوباکتریوم روده‌ای نوزاد در اوایل تولید، شیر مادر او خواهد بود.

واژگان کلیدی: بیفیدوباکتریوم، نوزاد، شیر مادر، فلور روده‌ای

مقدمه:

آلودگی بی‌اهمیت در نظر گرفته می‌شود. تأیید نقش اتیولوژیک این باکتری‌ها در یک عفونت، نیازمند جداسازی مکرر تعداد زیادی ارگانیزم در نمونه‌های متعدد و نبود دیگر ارگانیزم‌های پاتوژن است (۳). حضور بیفیدوباکتریومها در روده آثار مفیدی در سلامتی انسان موجب می‌شوند که از جمله آن می‌توان از آثار تغذیه‌ای مانند تولید برخی از ویتامین‌های موردنیاز بدن و افزایش توان هضم پروتئین‌ها، آثار دارویی مانند جلوگیری از عفونت روده‌ای، جلوگیری از بروز یا کاهش اسهال، کاهش اختلال‌های ناشی از نارسایی کبد، کاهش میزان کلسترول خون، کاهش ترکیب‌های سرطانی و آثار ایمنولوژیک با تقویت سیستم ایمنی بدن و کاهش آثار

بیفیدوباکتریومها باسیل‌های بی‌هوازی مطلق، گرم مثبت و بدون اسپوری هستند که به‌طورمعمول در جایگاه‌های مختلف بدن انسان همچون اورفانکس، روده بزرگ، مجاری ادراری-تناسلی و شیر مادر کلونیزه می‌شوند (۱). این باکتری‌ها جزء غالب میکروفلور روده ۸۰ درصد کودکان و ۲۵ درصد بزرگسالان محسوب شده و از نظر فراوانی سومین جنس باکتریایی پس از باکترئیدس و یوباکتریوم در فلور میکروبی روده است (۲). این باکتری‌ها می‌توانند از نمونه‌های بالینی جدا شوند ولی توانایی بیماری‌زایی خیلی کمی دارند و به‌طورمعمول جداسازی آنها به‌عنوان

نویسنده مسئول: ملیحه طالبی*

پست الکترونیک: talebi.m@iums.ac.ir

تحمل نکردن لاکتوز را نام برد (۴، ۵).

برخی از گونه‌های بیفیدوباکتریوم به‌طور روتین در محصولات پروبیوتیکی استفاده قرار می‌شوند. پروبیوتیک‌ها به گروهی از ارگانسیم‌های غیر بیماری‌زا گفته می‌شود که دارای آثار سودمندی برای میزبان خود هستند. مطالعه‌ها نشان داده مصرف این باکتری باعث بهبود عملکرد روده و تنظیم فلور نرمال روده برای عملکرد هرچه بهتر می‌شود (۶).

در مطالعه‌های بسیاری ارتباط فلور میکروبی سیستم گوارش نوزاد و مواد غذایی مصرفی آن دیده شده است (۷). به علاوه کودکانی که توسط زایمان طبیعی متولد شده و از شیر مادر تغذیه می‌کنند، فلور نرمالی به‌مراتب شبیه‌تر به مادران خود را دارا هستند (۸). بیفیدوباکتریوم‌ها جزو فلور نرمال شیر مادر بوده که ورود آن به سیستم گوارشی نوزادان باعث القای خواص پروبیوتیکی در او شده و علاوه بر بهبود عملکرد سیستم گوارش نوزاد، در جذب و هضم، به بلوغ سیستم ایمنی او نیز کمک شایانی می‌کند (۹). هدف از این مطالعه، مقایسه گونه‌های بیفیدوباکتریوم موجود در شیر مادر و با گونه‌های بیفیدوباکتریوم‌های موجود در مدفوع نوزادان تازه متولد شده برای تأیید یا رد این مدعاست که آیا منشأ اصلی بیفیدوباکتریوم نوزادان شیرخوار، شیر مادر آن‌هاست یا خیر.

مواد و روش‌ها:

(۲-۱) نمونه‌گیری:

در این مطالعه توصیفی از ۲۸ جفت مادر به همراه نوزادان که در مناطق روستایی شهر اراک و تفرش زندگی می‌کردند، جمع‌آوری نمونه انجام شد. در جمع‌آوری نمونه‌ها ۴ شاخص مدنظر قرار گرفت، (۱) سالم بودن نوزادان و نبود بیماری خاصی در مادران از ۳ ماه پیش از نمونه‌گیری تاکنون، (۲) حاملگی طبیعی با دوره بارداری نرمال، (۳) زایمان طبیعی نوزاد و (۴) عدم مصرف آنتی‌بیوتیک یا محصولات پروبیوتیکی برای حداقل ۳ ماه پیش از نمونه‌گیری. رضایتمانه کتبی و تاییدیه کمیته اخلاق به ترتیب از خانواده‌های نوزادان و کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ایران (IR.IUMS.REC 981395.9221133201) کسب شد. نوزادان انتخاب شده بین ۸ روز تا ۲۲ ماه سن داشتند. ۲ تا ۴ میلی‌لیتر از شیر مادران و ۲ تا ۴ گرم از مدفوع نوزادان جمع‌آوری و در محیط MRS برات در جار بی‌هواری با سرعت هرچه‌تمام‌تر به آزمایشگاه منتقل شد (۱۰).

(۲-۲) جداسازی سوبه استاندارد از قرص‌های پروبیوتیکی

سه سوبه استاندارد گونه بیفیدوباکتریوم جدا شده از قرص نیز به عنوان باکتری‌های تجاری موجود در بازار به عنوان کنترل در تست‌های مختلف و برای مقایسه‌های

(۲-۳) کشت:

نمونه‌ها بعد از انتقال به آزمایشگاه به محیط MRS (Man, Rogosa and Sharpe) مایع حاوی ۵ درصد (w/v) ال-سیستین هیدروکلرید (Merck، آلمان) و ۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر موپیروسین (Sigma-Aldrich، آمریکا) تلقیح و در شرایط بی‌هواری در دمای ۳۷ درجه به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد. بعد از رقیق‌سازی سریالی نمونه‌ها در بافر PBS حاوی ۵ درصد ال-سیستین، نمونه‌ها برای انتقال به محیط انتخابی MRS آگار حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم/لیتر موپیروسین آماده و در شرایط بی‌هواری و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۳ روز انکوبه شدند. بر اساس شکل کلنی، نتایج رنگ‌آمیزی گرم و فعالیت کاتالاز، کلنی‌های تک جمع‌آوری شد (۱۰). از هر پلیت بسته به تعداد کلنی‌های رشد یافته روی محیط کشت مایع MRS برات حاوی ۲۰ درصد گلیسرول ذخیره و در فریزر منهای ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

(۲-۴) شناسایی فنوتیپی و ژنوتیپی ایزوله‌ها:

تایید ایزوله‌های مشکوک در سطح جنس توسط تست فعالیت فروکتوز-۶-فسفات فسفوکولاز (F6PPK) که در مطالعه‌های پیشین انجام شده بود، صورت پذیرفت (۱۱). شناسایی ایزوله‌ها تا سطح گونه مبتنی بر مطالعه Matsuki و همکاران انجام شد (۱۲). برای انجام این مهم ابتدا استخراج DNA نمونه‌ها به کمک کیت استخراج ستونی mini prep (Roche، آلمان) انجام شد. درجه خلوص و غلظت DNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ ساخت شرکت ترموفیشر آمریکا تعیین شد. سپس باکتری‌ها به کمک PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) تا سطح گونه شناسایی شدند. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (Fermentase) و ۵/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر انجام شد. در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی ۵ دقیقه دناتوراسیون ابتدایی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۴۰ سیکل شامل دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه اتصال در ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و طولیل شدن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت طولیل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. برای بررسی ژن‌های مورد نظر، محصول PCR در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شده و با سوبه‌های کنترل مثبت و منفی ارزیابی شد. تمام سوبه‌های استاندارد بیفیدوباکتریوم از قرص‌های وارداتی جداسازی شده است. در نهایت میزان همبستگی یا correlation به کمک نرم‌افزار spss18 آنالیز شد.

منبع	دمای Annealing	اندازه محصول (bp)	توالی پرایمرها (5'→3')	باکتری جدا شده
(10)	58	563-549	bifid-F: CTCCTGGAACGGGTGG	بیفیدوباکتریوم
			bifid-R: GGTGTTCTCCGATATCTACA	
(10)	65	278	bbif-F: CCACATGATCGCATGTGATTG	ب. بیفیدوم
			bbif-R: CCGAAGGCTTCCCAA	
(10)	60	288	bbre-F: CCGGATGCTCCATCACAC	ب. بروه
			bbre-R: ACAAAGTGCCTTGCTCCC	
(10)	63	831	blong-F: TTCCAGTTGATCGCATGGTC	ب. لانگوم
			blong-R: GCGAAGCCGATATCTACGA	

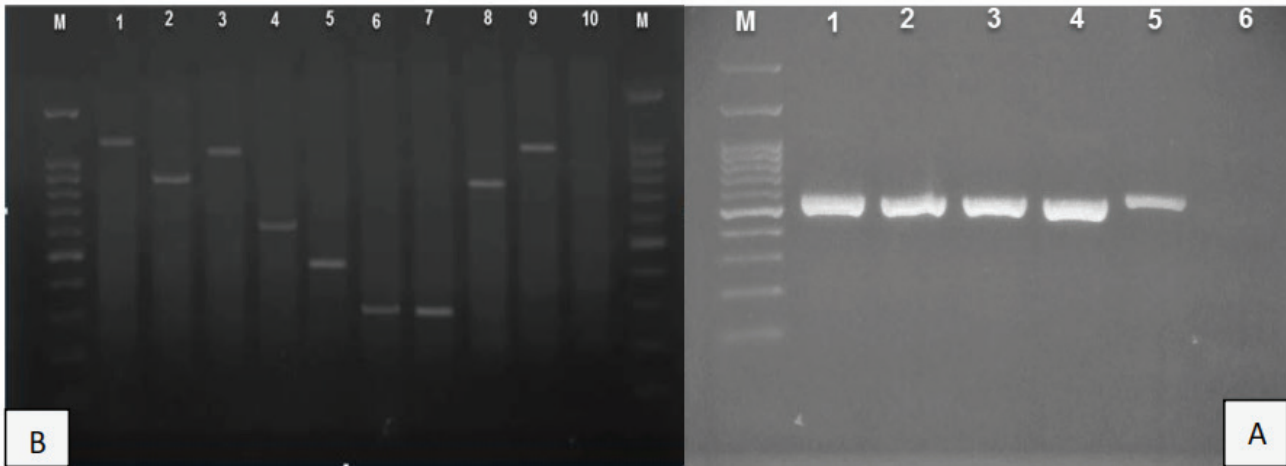
جدول ۱: توالی پرایمرهای اختصاصی شناسایی جنس و گونه‌های بیفیدوباکتریوم یافته‌ها:

از بین ۲۸ نمونه شیر مادر به همراه ۲۸ نمونه مدفوع نوزادان تازه متولد شده،

جداسازی شده از نمونه فلور نرمال انسان وارد مطالعه شد. یک سوبه باکتری بیفیدوباکتریوم لانگوم، یک سوبه ب. بیفیدوم و یک سوبه ب. بروه به صورت تجاری در دسترس بودند.

شامل آمازون، مالاوی و ناحیه متروپولیتن آمریکا به روش پیروسکوئینسینگ و real-time PCR بررسی شد که نشان داد با افزایش سن انسان فراوانی گونه‌های بیفیدوباکتریوم کاهش پیدا می‌کند و بیشترین فراوانی گونه‌های بیفیدوباکتریوم تا سن ۵ سالگی است (۱۴).

۳۱ نمونه که شامل ۲۰ (۶۴ درصد) مدفوع و ۱۱ (۳۶ درصد) شیر مادر بود حامل بیفیدوباکتریوم تشخیص داده شد. از مجموعه بیفیدوباکتریوم جداسازی شده (۳۶) ۱۵ (درصد) بیفیدوباکتریوم بیفیدوم، ۱۴ (۳۴ درصد) بیفیدوباکتریوم لانگوم و ۱۲ (۳۹ درصد) بی



Martine و همکاران در سال ۲۰۰۹ برای بررسی جمعیت بیفیدوباکتریوم در میکروبیوم شیر مادر و مدفوع نوزادان آن‌ها مطالعه‌ای روی ۲۳ نمونه شیر (۳۵ درصد) ۸ نمونه کشت مثبت داشتند ولی در (۹۶ درصد) ۲۲ نمونه شیر DNA بیفیدوباکتریوم یافت شد. در این مطالعه از بین ۲۳ نمونه مدفوع، از ۲۲ نمونه جنس بیفیدوباکتریوم جداسازی شد. گونه‌های جداسازی شده از شیر مادر شامل بیفیدوباکتریوم آدولستیس، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و بیفیدوباکتریوم بروه و در مدفوع علاوه بر ۳ گونه ذکر شده، گونه‌های بیفیدوباکتریوم لانگوم و ب. سودکاتولاتوم نیز جداسازی شدند (۱۵). در مطالعه حاضر تنها گونه بیفیدوباکتریوم شامل ب. لانگوم، ب. بیفیدوم و ب. بروه جداسازی شد در حالی که مطالعه‌های قبلی نشان داده‌اند که برخی از گونه‌ها مثل ب. آدولستیس و ب. اینفنتیس در نمونه مدفوع فراوانی بیشتری دارند (۱۶).

نتایج مطالعه ما نشان داد ۲۹ درصد از ایزوله‌های شیر مادر حامل بیفیدوباکتریوم، و نوزادان نیز حامل این باکتری بودند که نشان از توان سیستم گوارش نوزاد برای تحمل و پذیرش این گونه باکتری توسط مادر خود بوده است. به‌رغم نبود مطالعه‌های مشابه در ایران، در مطالعه‌ای که توسط Gueimonde و همکارانش در سال ۲۰۰۷ در فنلاند به انجام رسید، ب. لانگوم، ب. کاتولاتوم، ب. انیمالیس و ب. بیفیدوم در شیر مادر و مدفوع نوزادان ۲۰ جفت ایزوله مشاهده شد (۱۷). نتایج مشابهی نیز در مطالعه‌های Solís و همکارانش در سال ۲۰۱۰ در اسپانیا (۱۸) و Martin و همکاران در سال ۲۰۰۸ در هلند (۱۵) دیده شد. این در حالی است که فقدان حضور بیفیدوباکتریوم در ۱۸ درصد از مدفوع نوزادانی که مادران شان حامل این باکتری بودند، نشان از نبود خصایص تطابق‌پذیری و بستر اکولوژیک مناسب برای کسب و تکثیر بیفیدوباکتریوم کسب‌شده از مادر خود در سیستم گوارش خود بودند. شاید بتوان این موضوع را در توان غلبه سایر میکروارگانیسم‌های موجود در مدفوع نوزاد دانست، به‌طوری‌که رشد بیفیدوباکتریوم را تا حد زیادی کاهش یا مهار کرده است که نمونه آن در مطالعه‌هایی چون مطالعه ۲۰۱۰ در اسپانیا می‌توان دید (۱۸).

فراوانی گونه‌های بیفیدوباکتریوم گزارش شده در مطالعه ما به طور کامل با مطالعه‌های مشابه انجام شده در دنیا همسو بود (۲، ۱۹، ۲۰). بررسی‌های ما نشان داد وجود بیفیدوباکتریوم در کودکان زیر یک ماه غالب‌تر و مشابه‌تر با بیفیدوباکتریوم‌های شیر مادران است، این در حالی است که بعد از گذشت زمان این تشابه گونه باکتریایی به حداقل رسید. نتایج حاصله با مطالعه‌هایی همچون Grönlund و همکاران که در سال ۲۰۰۷ در کشور فنلاند قابل تطابق است (۷). از مهم‌ترین محدودیت‌های این مطالعه، جمع‌آوری نمونه‌های شیر مادر و مدفوع

بیفیدوباکتریوم بروه تشخیص داده شد (شکل ۱ و جدول ۲).
شکل ۱: (A) محصول PCR تعیین جنس بیفیدوباکتریوم. (M) مارکر 100bp، کنترل منفی (شماره ۶)، نمونه کنترل مثبت بیفیدوباکتریوم لاکتیس BB12 (شماره ۱) و بیفیدوباکتریوم‌های جدا شده از مدفوع (شماره‌های ۲ تا ۶). (B) ژل آگارز محصول Multiplex PCR برای شناسایی گونه‌های بیفیدوباکتریوم، کنترل منفی (شماره ۱۰)، مارکر (M) 100bp، شماره ۲: بیفیدوباکتریوم بروه (827bp)، شماره ۳: بیفیدوباکتریوم بیفیدوم (1018bp)، شماره ۶: بیفیدوباکتریوم لانگوم (301bp).

جدول ۲: فراوانی گونه‌های بیفیدوباکتریوم جداسازی شده از شیر مادر و مدفوع نوزادان

نمونه	ب. بیفیدوم	ب. لانگوم	ب. بروه	جمع
شیر	۷ (۳۹ درصد)	۵ (۲۸ درصد)	۶ (۳۳ درصد)	۱۸ (۱۰۰ درصد)
مدفوع	۸ (۳۵ درصد)	۹ (۳۹ درصد)	۶ (۲۶ درصد)	۲۳ (۱۰۰ درصد)

از مجموع ۳۱ نمونه حامل بیفیدوباکتریوم، ۱۲ (۳۹ درصد) گونه مشترک بین شیر مادر (۶ عدد) و مدفوع کودکان شان (۶ عدد) بودند که شامل ۶ بیفیدوباکتریوم لانگوم، ۴ بیفیدوباکتریوم بروه و ۲ بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بود. همه نوزادان حامل گونه بیفیدوباکتریوم مشابه با مادران شان، زیر یک‌ماه داشتند. ضریب همبستگی بیفیدوباکتریوم‌های جداسازی شده از شیر مادر در برابر مدفوع نوزادان عدد $+0.821$ ($p\text{-value} < 0.05$) را از خود نشان داد.

بحث:

بیفیدوباکتریوم‌ها به‌عنوان یکی از اعضای مهم میکروبیوتای جایگاه‌های مختلف بدن شامل دستگاه گوارش، شیر مادر و واژن خانم‌ها محسوب می‌شود. در مطالعه مقایسه‌ای انجام شده به دو روش مولکولی و کشت توسط Turrone و همکارانش در سال ۲۰۰۹ میلادی در کشور سوئیس، مشخص شد بیفیدوباکتریوم در حدود ۳ درصد از میکروبیوتای دستگاه گوارش افراد بزرگسال مورد مطالعه را تشکیل می‌دهد (۱۳). در مطالعه yatsunenکو و همکارانش در سال ۲۰۱۲ در کشور آمریکا، فراوانی جمعیت میکروبیوتای ۱۱۰ نفر از ۳ منطقه مختلف دنیا

مادران است، هستند.

نتیجه گیری:

در پایان، نتایج مطالعه ما نشان داد شیر مادر حامل بیفیدوباکتریوم‌های زیستا و زایایی است که توانایی انتقال و کلونیزه شدن در دستگاه گوارش نوزادان را خواهد داشت. با مشاهده اشتراک ۲۹ درصدی و ضریب همبستگی مثبت بیفیدوباکتریوم جداشده بین شیر مادر و مدفوع نوزادان‌شان در این مطالعه، احتمال می‌رود منشأ اصلی بیفیدوباکتریوم روده‌ای نوزاد در اوایل تولید، شیر مادر او خواهد بود.

نوزادان‌شان از مناطق روستایی استان مرکزی و انتقال آن به آزمایشگاه در یک شرایط کامل بی‌هوازی بود. همین محدودیت‌ها باعث شده مطالعه پیش‌رو، جزو مطالعه‌های بالارزش شمرده شود چراکه تاکنون در ایران کاری در این حوزه، بخصوص در استان مرکزی به انجام نرسیده است. از جنبه‌های بالارزش دیگر این مطالعه می‌توان به انتخاب زنان روستایی اشاره کرد چراکه این خانواده‌ها برخلاف جمعیت شهرنشین، مانند گذشته بر اصول تغذیه‌ای و رفتاری سنتی خود عمل کرده و کمتر در معرض مصرف خودسرانه دارو که یکی از عوامل تغییر فلور نرمال بدن

منابع:

1. Di Gioia D, Aloisio I, Mazzola G, Biavati B. Bifidobacteria: their impact on gut microbiota composition and their applications as probiotics in infants. *Applied microbiology and biotechnology*. 2014;98(2):563-77.
2. Turrone F, Peano C, Pass DA, Foroni E, Severgnini M, Claesson MJ, et al. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PLoS one*. 2012;7(5):e36957.
3. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical microbiology*: Elsevier Health Sciences; 2015.
4. Yaeshima T. Benefits of bifidobacteria to human health. *International Dairy Federation*. 1996.
5. Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neant F, Matuchansky C. bifidobacteria as probiotic agents—physiological effects and clinical benefits. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2005;22(6):495-512.
6. Kailasapathy K, Chin J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Immunology and cell Biology*. 2000;78(1):80-8.
7. Grönlund MM, Gueimonde M, Laitinen K, Kociubinski G, Grönroos T, Salminen S, et al. Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the *Bifidobacterium* microbiota in infants at risk of allergic disease. *Clinical & Experimental Allergy*. 2007;37(12):1764-72.
8. Ladomenou F, Moschandreas J, Kafatos A, Tselentis Y, Galanakis E. Protective effect of exclusive breastfeeding against infections during infancy: a prospective study. *Archives of Disease in Childhood*. 2010;archdischild169912.
9. Jost T, Lacroix C, Braegger CP, Rochat F, Chassard C. Vertical mother–neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environmental microbiology*. 2014;16(9):2891-904.
10. Shigwedha N, Jia L. *Bifidobacterium* in human GI tract: screening, isolation, survival and growth kinetics in simulated gastrointestinal conditions. *Lactic Acid Bacteria-R & D for Food, Health and Livestock Purposes*: InTech; 2013.
11. Gavini F, Van Esbroeck M, Touzel J, Fourment A, Goossens H. Detection of Fructose-6-phosphate Phosphoketolase (F6PPK), a Key Enzyme of the Bifid-Shunt, in *Gardnerella vaginalis*. *Anaerobe*. 1996;2(3):191-3.
12. Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Takada T, Tanaka R. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Applied and environmental microbiology*. 2004;70(12):7220-8.
13. Turrone F, Foroni E, Pizzetti P, Giubellini V, Ribbera A, Merusi P, et

- al. Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract. *Applied and environmental microbiology*. 2009;75(6):1534-45.
14. Yatsunenkov T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *nature*. 2012;486(7402):222.
15. Martín R, Jiménez E, Heilig H, Fernández L, Marín ML, Zoetendal EG, et al. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Applied and environmental microbiology*. 2009;75(4):965-9.
16. Turrone F, Van Sinderen D, Ventura M. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *International journal of food microbiology*. 2011;149(1):37-44.
17. Gueimonde M, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E. Breast Milk: A Source of Bifidobacteria for Infant Gut Development and Maturation? *Neonatology*. 2007;92(1):64-6.
18. Solís G, de los Reyes-Gavilan CG, Fernández N, Margolles A, Gueimonde M. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe*. 2010;16(3):307-10.
19. Albesharat R, Ehrmann MA, Korakli M, Yazaji S, Vogel RF. Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Systematic and Applied Microbiology*. 2011;34(2):148-55.
20. Asakuma S, Hatakeyama E, Urashima T, Yoshida E, Katayama T, Yamamoto K, et al. Physiology of consumption of human milk oligosaccharides by infant gut-associated bifidobacteria. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(40):34583-92.