

Intranasal Administration Model for Evaluating Protection Against Influenza Virus in Mice

Soo-Won Choi^{1†}, Ha-Na Youn^{1†}, Wootack Hong¹, Jae-Keun Park¹, Seong-Su Yuk¹, Jung-Hoon Kwon¹, Jin-Yong Noh¹, Jung-Sun Kang², Kyung-Jin Cho², Jeoung-Jin Ryu², Joong-Bok Lee¹, Seung-Yong Park¹, In-Soo Choi¹, Sang-Won Lee¹ and Chang-Seon Song^{1*}

¹Avian Disease Laboratory, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul; ²GENEBIOTECH CO., LTD, 166 Sinwonsa-ro, Gyeryong-myeon, Gongju-si, Chungcheongnam-do, Korea

Antiviral activity against Influenza virus of 14 *Lactobacillus* species isolated from food was monitored. *Lactobacillus* species were isolated from traditional Korean fermented food. Each live *Lactobacillus* was administered into the nasal cavity of SPF 6-week-old BALB/c mice. After the *Lactobacillus* treatment, Influenza virus (A/NWS/33/H1N1) was inoculated to each mouse. Clinical signs and mortality was monitored for 21 days. Each *Lactobacillus* strain showed various level of antiviral activity against Influenza virus. As a result of this study, this mouse experiment model, including intranasal treatment of live *Lactobacillus* species, could be effective model in evaluating immunomodulatory response of probiotics against respiratory viruses.

Key Words: Animal model, Probiotics, Influenza, Antiviral

INTRODUCTION

인플루엔자 바이러스(Avian Influenza virus, AIV)는 조류 및 포유류에 감염되는 Family Orthomyxoviridae의 RNA 바이러스이다. 인플루엔자 바이러스가 사람에게 감염되었을 시 오한, 발열, 인후두염, 근육통, 두통 기침 등의 임상 증상을 유발하며 특히 면역력이 떨어지는 어린 아이나 노인에게서 주로 발병하는 것으로 알려져 있다 (1, 2). 2009년의 경우, 돼지 유래의 H1N1형의 신종 인플루엔자 바이러스가 전 세계적으로 유행하여 국내에서도 큰 사회적 이슈가 된 바 있다 (3, 4). 이런 인플루엔자 바이러스에 의한 피해를 예방하기 위하여 세계 보건기구(World Health

Organization, WHO)에서는 매년 그 해에 유행할 인플루엔자 바이러스의 아형을 선정하여, 해당 아형을 통한 백신을 생산하고 있지만 8개의 분절로 구성된 인플루엔자 유전자의 특성상 항원 대변이(antigenic shift) 및 항원 전변이(antigenic drift) 등을 통하여 빠른 변이가 일어나고 (5, 6) 그 변이도 예측하기 힘들기 때문에 효과적인 백신을 통한 방제가 어려운 실정이다. 따라서, 백신에 의한 후천적 면역(acquired immunity)이 아닌 생균제 등을 통한 선천 면역(innate immunity)를 강화시켜 바이러스에 대한 저항성을 확인하는 연구가 다방면으로 수행되고 있는 실정이다 (7, 8)

생균제(probiotics)는 숙주인 인체 및 가축에 투여되어 여러 가지 이로운 생리 활성효과를 나타내는 미생물을

Received: November 25, 2014/ Revised: January 21, 2015/ Accepted: February 4, 2015

[†]Both authors contributed equally to this work.

*Corresponding author: Chang-Seon Song, Ph.D. Avian Disease Laboratory, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, 1 Hwayang-dong, Gwangjin-gu, Seoul, 143-701, Korea.

Phone: +82-2-450-3712, Fax: +82-2-455-3712, e-mail: songcs@konkuk.ac.kr

**This research was supported by bio-industry technology development program No. 312059-03, Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs.

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

함유하는 제재를 통칭한다 (9, 10). 특히 식품에서 *Lactobacillus*는 발효식품의 저장성을 증대시키며 발효 산물의 특징을 결정하여 국내 식품산업에서 보존제로 넓게 사용되어 오고 있다. 슬로우 푸드가 재조명되는 사회 분위기에 맞추어 발효식품 유래 유산균의 항 바이러스능 및 항균 효과에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다 (11~13). 하지만 발효식품은 제조 환경, 원료, 제조자 등에 따라 맛 조직감 등의 특징이 매우 다양하고 발효에 관여하는 유산균의 종류 또한 무척 다양하기 때문에 발효식품 유래의 유산균에 대한 연구가 다방면으로 진행되고 있는 실정이다 (14, 15). 따라서 분리되고 있는 생균체의 포유류에서의 항 바이러스능을 스크리닝하기 위한 동물실험 모델이 필요한 상황이다.

본 연구에서는 발효식품에서 14종의 유산균을 분리하여 유전학적인 방법으로 동정한 후, SPF 마우스의 비강에 유산균을 투여하는 방법을 통하여 인플루엔자 바이러스에 대한 방어능을 가질 수 있는 후보주를 선발하는 방법의 효능을 모색하였다.

MATERIALS AND METHODS

균주의 분리 및 유전적 분석

실험에 사용된 시료는 장아찌 7종, 김치 5종, 젓갈 2종에서, BD Cultuswab™ transportation system (BD BBL, Sparks, Maryland)를 사용하여 가능한 빨리 검사실로 운반하였다. 적당량의 시료를 균질화 한 후, 멸균 인산 완충 식염수 (phosphate buffered saline, PBS)에서 십진 희석하였다. 희석액을 MRS medium (Difco Laboratories, Detroit, Mich.)에 도말 접종한 후 37°C에서 72시간 혐기 배양하였다. MRS agar에 나타난 유백색의 단일 집락을 분리, 3회 계대 배양하여 얻은 균주를 15% (v/v) glycerol에 현탁하고 -70°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

DNA 분리는 배양한 균체를 모아 100 µl STES buffer (0.4 M NaCl, 0.2 M Tris-HCl; pH 7.6, 0.01 M EDTA, 1% SDS)에 현탁하고, glass bead를 첨가하여 5분간 microtube mixer (MT-360, TOMY)로 파쇄, 세포질을 용출시켰다. 용출액을 200 µl TE buffer (pH 8.0), 200 µl phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1, pH 6.7, Bioneer)에 처리한 후 원심분리, 상층액에 RNase A 5 µl, 37°C, 1시간 반응시킨 후 다시 200 µl 클로로포름을 첨가하여 12,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 에탄올로 2회 세척한 다음 건조

(vacuum dryer, SpeedVac) 시킨 후 멸균 증류수에 녹여 PCR을 수행하였다. PCR primer는 27F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3')와 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')을 이용 증폭하여 정제한 후 염기서열을 분석하였다. 염기서열 분석은 (주)마크로젠(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 진행하였다. 얻어진 염기서열은 Bioedit software의 Clustal W를 이용하여 Genebank database에서 얻은 참조 균주의 염기서열과 비교 분석하였고, phylogenetic tree를 제작하였다. Tree의 안전성을 조사하기 위해 bootstrap analysis(1,000회)를 수행하였고, 유사성에 대한 백분율은 Mega software를 이용하여 결정하였다. 염기서열의 비교를 위해 사용된 염기서열들은 GeneBank database (National Center for Biotechnology Information, NCBI)에서 얻었으며 참조로 사용한 유산균의 16s rRNA 유전자 염기서열의 accession number는 Fig. 2에 표시하였다.

공격 접종 바이러스

공격 접종 인플루엔자 바이러스(A/NWS/33/H1N1)은 등록번호 G-VR-415000-00471의 등록번호를 부여 받은 후 농림축산검역본부에서 분양 받았다. 공격 접종을 위한 바이러스의 증식은 10일령 SPF 발육란의 장노막강에 바이러스를 접종하여 이루어 졌으며 바이러스 증식액은 사용 전까지 -70°C에 보관하였다. 증식한 바이러스의 역가 확인은 10일령 SPF 발육란을 통하여 반수감염량(Egg Infective Dose 50, EID₅₀)을 Reed-muench method를 통하여 이루어졌다.

동물시험 일정

본 시험은 건국대학교 동물실험윤리규정을 준수하여 실시하였다. 체중 18 g에서 20 g 사이의 6주령 암컷 SPF BALB/c 마우스 총 160수를 시험에 사용하였다. 시험군은 본 연구에서 분리된 유산균 비강 투여 시험군 14개, 공격 접종 양성 대조군 1개, 공격 접종 음성 대조군 1개의 총 16개의 시험군으로 시험군당 10수로 구성되었다. 본 연구에서 분리된 유산균을 시험군당 1 종씩 2주간 6회 1×10^8 c.f.u/mice씩 비강 투여하여 예방한 후, 마우스가 8주령이 되는 시점에 인플루엔자 바이러스(A/NWS/33/H1N1)를 수당 $10^{4.5}$ EID₅₀/90 µl/dose로 비강으로 공격 접종하였다. 유산균의 인플루엔자 바이러스에 대한 효능을 확인하기 위하여 공격 접종 전과 시험 종료 시의 체중을 측정하였으며, 공격 접종 후 2주간 임상 증상, 폐사율 및 평균 치

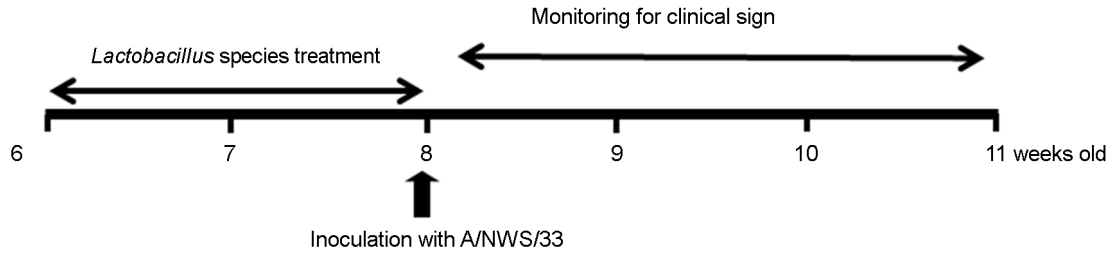


Figure 1. Schedule for animal experiment. BALB/c mice were treated with intranasally with *Lactobacillus* for 2 weeks before inoculation with A/NWS/33 virus. Mice were monitored daily for clinical signs for 14 days.

Table 1. Origin of isolated *Lactobacillus* strains

<i>Lactobacillus</i> strain No.	Origin	Genetic Cluster ^A
<i>Lactobacillus</i> strain No. 1-3	Pickled Radish	Group 1
<i>Lactobacillus</i> strain No. 2-6	Pickled Pepper	Group 1
<i>Lactobacillus</i> strain No. 3-5	Pickled Pepper	Group 1
<i>Lactobacillus</i> strain No. 3-6	<i>Dongchimi</i>	Group 1
<i>Lactobacillus</i> strain No. 3-8	Pickled Pepper	Group 1
<i>Lactobacillus</i> strain No. 3-8-1	<i>Dongchimi</i>	Group 1
<i>Lactobacillus</i> strain No. 4-20	Pickled Radish	Group 1
<i>Lactobacillus</i> strain No. 5-9	<i>Dongchimi</i>	Group 4
<i>Lactobacillus</i> strain No. 5-11	Salted shrimp	Group 1
<i>Lactobacillus</i> strain No. 6-5	Pickled Pepper	Group 1
<i>Lactobacillus</i> strain No. 6-13	White <i>Kimchi</i>	Group 1
<i>Lactobacillus</i> strain No. 7-1	<i>Dongchimi</i>	Group 3
<i>Lactobacillus</i> strain No. 7-13	Pickled Pepper	
<i>Lactobacillus</i> strain No. 7-25	Salted shrimp	Group 2

^AGenetic Cluster was determined by phylogenetic tree based on 16s rRNA

사 시간(Mean Death Time, MDT)을 측정하였다(Fig. 1). 임상 증상은 0~2의 점수를 증상에 따라 매겼으며 정상인 경우 0점, 털 이상 및 칩을 등의 임상 증상의 경우 1점 그리고 사망한 경우 2점으로 판단하였다.

RESULTS

발효식품으로부터 총 14종의 유산균이 분리되었으며, 14종 모두 16s rRNA 분석 결과 모두 *Lactobacillus* 속의 유산균인 것으로 확인되었다(Table 1). 16s Rna 분석 결과 11개의 균주는 *L. paraplantarum*과 클러스터(Group 1)를

형성하였고, 1개는 *L. arizonensis* (Group 2)와, 1개는 *L. pentosus* (Group 3)와, 마지막 1개는 *L. plantarum*과 클러스터(Group 4)를 형성하였다(Fig. 2).

동물시험 결과(Table 2) 14종의 유산균 중 3종의 유산균만이 인플루엔자 바이러스 공격 접종에 대한 폐사를 유의적으로($p < 0.01$ by Fisher's Exact test) 방어해 내는 것을 확인하였다. 이 3종의 유산균은 모두 *L. paraplantarum*과 클러스터(Group 1)을 형성한 유산균으로, 모두 장아찌 유래의 유산균인 것으로 확인되었다.

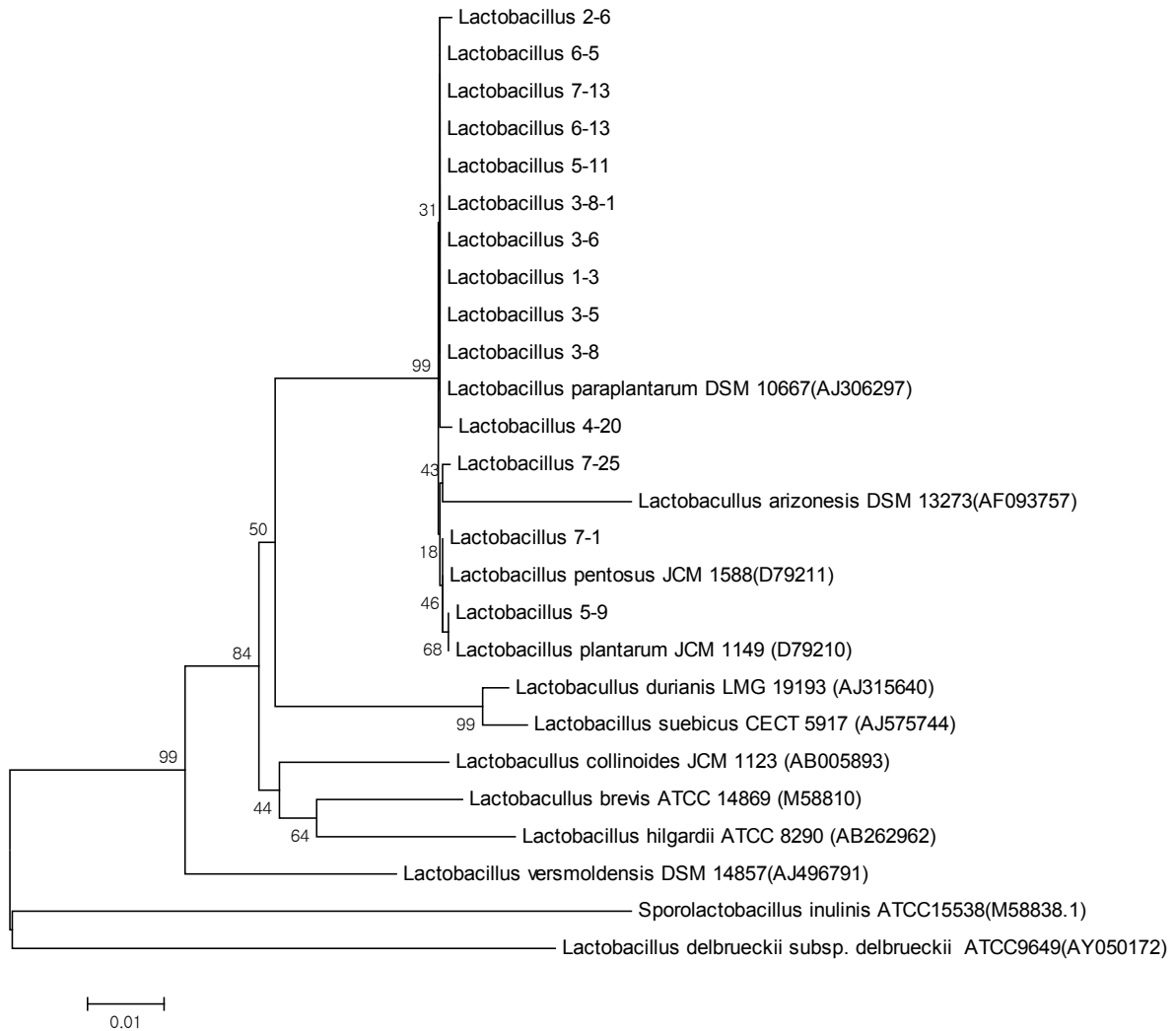


Figure 2. Rooted neighbor-joining tree based on 16S rRNA sequences showing relationships between *Lactobacillus* strains. The scale bar indicates 0.1 nucleotide substitution per nucleotide position.

DISCUSSION

본 연구에서는 유산균의 비강 투여 모델을 통하여 유산균의 항 인플루엔자능을 확인하였다. 본 시험에서 유산균을 처치하지 않고 인플루엔자 바이러스를 접종한 양성 대조군의 마우스의 경우 100%의 폐사율을 나타낸 것에 비하여 유산균 및 인플루엔자 바이러스를 접종하지 않은 음성 대조군의 마우스에서는 폐사가 나타나지 않은 것으로 미루어 보아 인플루엔자 바이러스가 마우스에게 효과적으로 공격 접종이 된 것을 확인할 수 있었다. 총 14종

의 *Lactobacillus* 분리주 중 3종의 *Lactobacillus*만이 마우스에서 인플루엔자 바이러스에 의한 폐사율을 유의적으로 감소시키는 것으로 확인되어 인플루엔자에 대한 유산균의 비강 투여가 인플루엔자 공격 접종에 대한 마우스에서의 피해를 감소시키는 것으로 확인되었다.

본 연구팀의 연구 결과에 따르면, 동일한 유산균 균주를 경구 및 비강 투여를 통하여 예방한 후 인플루엔자 바이러스에 대한 방어능을 비교한 결과, 유산균을 비강 투여한 시험군이 유산균을 경구 투여한 시험군에 비하여 우수한 인플루엔자 바이러스에 대한 방어능을 나타냈으며 (16), 이는 유산균의 비강 내 투여가 호흡기계의

Table 2. The effect of intranasal administration of various *Lactobacillus* species on challenge with influenza virus. BALB/c mice were treated intranasally with *Lactobacillus* species for 2 weeks before inoculation with A/NWS/33 virus. Mice were monitored daily for clinical signs for 21 days. Statistical significance was determined by Fisher's exact test. Asterisks indicates significant differences (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) compared with results in positive control

Group	Administered <i>Lactobacillus</i> species	Number of mice	Preventive effect after challenge with influenza virus ^A		PI ₁₄ ^C
			Survival	MDT (day) ^B	
1	<i>Lactobacillus</i> 1-3	10	6/10	10.0	1.4
2	<i>Lactobacillus</i> 2-6	10	8/10**	9.0	1.2
3	<i>Lactobacillus</i> 3-5	10	8/10**	10.5	1.2
4	<i>Lactobacillus</i> 3-6	10	4/10	10.5	1.6
5	<i>Lactobacillus</i> 3-8	10	8/10**	12.0	1.2
6	<i>Lactobacillus</i> 3-8-1	10	4/10	8.5	1.6
7	<i>Lactobacillus</i> 4-20	10	3/10	10.1	1.7
8	<i>Lactobacillus</i> 5-9	10	4/10	10.8	1.6
9	<i>Lactobacillus</i> 5-11	10	5/10	8.4	1.5
10	<i>Lactobacillus</i> 6-5	10	8/10**	11.0	1.2
11	<i>Lactobacillus</i> 6-13	10	5/10	10.6	1.5
12	<i>Lactobacillus</i> 7-1	10	2/10	10.5	1.8
13	<i>Lactobacillus</i> 7-13	10	5/10	9.0	1.5
14	<i>Lactobacillus</i> 7-25	10	6/10	9.8	1.4
15	Positive control	10	1/10	9.0	1.9
16	Negative control	10	10/10	-	0

^A Mice were inoculated intranasally with $10^{4.0}$ EID₅₀ of influenza virus A/NWS/33 (H1N1) strain

^B Mean death time

^C Pathogenicity index: average score of clinical sign were recorded following challenge and were scored as follow: 0 = normal, 1 = sick, 2 = dead

secretory IgA를 증가시키는 동시에 몇몇 pro-inflammatory cytokine의 비활성화를 통하여 마우스에서의 폐사율 및 임상 증상을 감소시킬 수 있었던 것으로 판단된다.

국내의 발효식품은 그 종류가 다양하고 지역, 재료, 만드는 이에 따라 맛과 질감 등이 천차만별이고 발효에 관여하는 유산균 또한 종류를 파악하기 힘들 정도로 많아 현재도 발효식품의 종류와 그에 따른 유산균에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있는 상황이다 (17~19). 하지만 일반적으로 유산균의 항바이러스능을 평가하기 위해서는 유산균의 Immunomodulation에 대한 연구가 함께 되어야 하는데, 일반적으로 면역 분석을 위해서는 많은 시험 비용과 시간 그리고 인력이 소모된다. 그러나 앞에서 기술하였듯이 시시각각 새로운 유산균들이 분리되고 있는 시점에서, 모든 분리주에 대하여 면역 분석을 실시하기는

힘든 상황이다. 본 연구에서는 비강 투여를 통한 간단한 시험 모델을 통하여 추가적인 면역 분석 없이 임상 증상 및 폐사율만으로 호흡기 바이러스에 대한 항 바이러스능을 나타낼 수 있는 유산균 균주를 선발해 내었다. 총 14종의 유산균 분리주 중 3가지 분리주만이 인플루엔자 바이러스에 대한 방어능을 증가시킨 것은 본 시험에서 분리된 14종의 유산균 균주 중 3종만이 폐 내에서 Th1 cell의 증식을 촉진시키는 IL-12의 증가 (20) 및 바이러스 감염 초기에 바이러스의 배출에 중요한 역할을 하는 IFN- γ 의 생성을 증가시켜 (21) 바이러스 감염에 의한 폐사율을 감소시켰을 가능성이 높다. 물론 이 모델에서 효능이 확인된 균주의 특성 및 호흡기계에서의 Immunomodulation을 확인하기 위해서는 추가적인 면역 분석을 실시해야 하겠지만 (22~24), 본 모델을 통하여 추가적인 분석 없

이 효능이 있는 인플루엔자 균주를 선발해 냈다는 점에서 큰 의미가 있을 것으로 판단된다.

인플루엔자 바이러스는 면역력이 떨어지는 노인이나 어린 아이에게서 주로 임상 증상을 나타내며, 주로 상부 호흡기계에서 증식한 후 하부 호흡기계로 전이되고, 폐렴 등을 유발하게 된다 (25). 따라서 인플루엔자 감염 후 폐렴 등의 추가적인 피해를 예방하기 위해서는 백신을 통한 수동 면역도 중요하겠지만 점막 면역 등 호흡기계의 선천적 면역을 증강시켜주는 것이 매우 중요하다고 말할 수 있겠다. 따라서, 분리된 유산균의 Immunomodulation 을 분석하는 것은 매우 중요하다고 말할 수 있겠다. 하지만 *In vivo* 상에서 모든 Cytokine 및 해당 유전자의 발현을 조사하는 것은 많은 시간 및 비용이 소모되기 때문에 (26) 빠르게 *In vivo* 상에서의 효능을 스크리닝 할 수 있다는 점에서 본 시험이 의미를 가진다고 말할 수 있을 것이다.

REFERENCES

- 1) Widmer K1, Zhu Y, Williams JV, Griffin MR, Edwards KM, Talbot HK. Rates of hospitalizations for respiratory syncytial virus, human metapneumovirus, and influenza virus in older adults. *J Infect Dis* 2012;206:56-62.
- 2) König R, Stertz S, Zhou Y, Inoue A, Hoffmann HH, Bhattacharyya S, *et al.* Human host factors required for influenza virus replication. *Nature* 2010;463:813-7.
- 3) Mesch GS, Schwirian KP, Kolobov T. Attention to the media and worry over becoming infected: the case of the Swine Flu (H1N1) Epidemic of 2009. *Social Health Illn* 2013;35:325-31.
- 4) Puvanalingam A, Rajendiran C, Sivasubramanian K, Ragunathanan S, Suresh S, Gopalakrishnan S. Case series study of the clinical profile of H1N1 swine flu influenza. *J Assoc Physicians India* 2011;59:14-6.
- 5) Chiu SS, Lo JY, Chan KH, Chan EL, So LY, Wu P, *et al.* Population-based hospitalization burden of influenza A virus subtypes and antigenic drift variants in children in Hong Kong (2004-2011). *PLoS One* 2014;9:e92914.
- 6) Li GM, Chiu C, Wrarmert J, McCausland M, Andrews SF, Zheng NY, *et al.* Pandemic H1N1 influenza vaccine induces a recall response in humans that favors broadly cross-reactive memory B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:9047-52.
- 7) Ramos I, Bernal-Rubio D, Durham N, Belicha-Villanueva A, Lowen AC, Steel J, *et al.* Effects of receptor binding specificity of avian influenza virus on the human innate immune response. *J Virol* 2011;85:4421-31.
- 8) Kasturi SP, Skountzou I, Albrecht RA, Koutsonanos D, Hua T, Nakaya HI, *et al.* Programming the magnitude and persistence of antibody responses with innate immunity. *Nature* 2011; 470:543-7.
- 9) Guarner F1, Khan AG, Garisch J, Eliakim R, Gangl A, Thomson A, *et al.* World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: probiotics and prebiotics October 2011. *J Clin Gastroenterol* 2012;46:468-81.
- 10) Weichert S, Schrotten H, Adam R. The role of prebiotics and probiotics in prevention and treatment of childhood infectious diseases. *Pediatr Infect Dis J* 2012;31:859-62.
- 11) Aboubakr HA, El-Banna AA, Youssef MM, Al-Sohaimy SA, Goyal SM. Antiviral Effects of *Lactococcus lactis* on Feline Calicivirus, A Human Norovirus Surrogate. *Food Environ Virol* 2014.
- 12) Kaboosi H. Antibacterial effects of probiotics isolated from yoghurts against some common bacterial pathogens. *Afr J Microbiol Res* 2011;5:4363-7.
- 13) Oh MH, Lee SG, Paik SY. Antiviral Activity of *Lactobacillus* spp. and Polysaccharide. *J Bacteriol Virol* 2010;40:145-50.
- 14) 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. *Syst Appl Microbiol* 2011;34:148-55.
- 15) Zhang Y, Zhang L, Du M, Yi H, Guo C, Tuo Y, *et al.* Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food. *Microbiol Res* 2011;167:27-31.
- 16) Youn HN, Lee DH, Lee YN, Park JK, Yuk SS, Yang SY, *et al.* Intranasal administration of live *Lactobacillus* species facilitates protection against influenza virus infection in mice. *Antiviral Res* 2012;93:138-43.
- 17) Franz CM, Huch M, Mathara JM, Abriouel H, Benomar N, Reid G, *et al.* African fermented foods and probiotics. *Int J Food Microbiol* 2014;190:84-96.
- 18) Champagne CP, Ross RP, Saarela M, Hansen KF, Charalampopoulos D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *Int J Food Microbiol* 2011;149:185-93.
- 19) Jang SE, Hyun YJ, Oh YJ, Choi KB, Kim T, Yeo IH, *et al.* Adhesion Activity of *Lactobacillus plantarum* PM 008 Isolated

- from Kimchi on the Intestine of Mice. *J Bacteriol Virol* 2011; 41:83-90.
- 20) Harata G, He F, Hiruta N, Kawase M, Kubota A, Hiramatsu M, et al. Intranasal administration of *Lactobacillus rhamnosus* GG protects mice from H1N1 influenza virus infection by regulating respiratory immune responses. *Lett Appl Microbiol* 2010;50:597-602.
- 21) Fensterl V, Sen GC. Interferons and viral infections. *Bio Factors* 2009;35:14-20.
- 22) Rizzello V, Bonaccorsi I, Dongarrà ML, Fink LN, Ferlazzo G. Role of Natural Killer and Dendritic Cell Crosstalk in Immunomodulation by Commensal Bacteria Probiotics. *J Biomed Biotechnol* 2011.
- 23) Yang OO, Kelesidis T, Cordova R, Khanlou H. Immunomodulation of Antiretroviral Drug-Suppressed Chronic HIV-1 Infection in an Oral Probiotic Double-Blind Placebo-Controlled Trial. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2014;30:988-95.
- 24) Lim YJ, Jo YH, Kim HJ, Park JK. The Synergistic Effects of Antimicrobial Peptides on the Growth Inhibition of *Salmonella* Typhimurium through Imd Pathway in *Drosophila* Intestine. *J Bacteriol Virol* 2013;43:120-30.
- 25) Hori T, Kiyoshima J, Shida K, Yasui H. Effect of intranasal administration of *Lactobacillus casei* Shirota on influenza virus infection of upper respiratory tract in mice. *Clin Diagn Lab Immunol* 2011;8:593-7.
- 26) Jin D, Kim BW, Cho HC, Yoon SS, Park YS, Kim SK. Immunoregulation of Murine Immunocytes to Bifidobacteria Strain Isolated from Feces of Healthy Korean Children: IL-10 Release and Proportional Change of CD4+CD25+ Cells. *J Bacteriol Virol* 2010;40:171-7.
-