Journal of Education and Science
Vol. 28, No.3, 2019, pp.209-227
ISSN 1812-125X
http://edusj.mosuljournals.com

Use of *Lactobacillus rhamnosus* GG Agaist Infection with Secondary Hydatid Disease in Swiss BABA/c Mice

Tasneem Younis
Department of Biology
College of Science
University of Kirkuk
Email: tasneembio93@gmail.com

Asmaa Abdul Aziz Ali
Department of Biology
Education College for Pure Sciences
University of Mosul
Email: assssali@uomosul.edu.iq

Neama Ali Ahmad
Department of Biology
College of Science
University of Kirkuk
Email: nama_1974@yahoo.com

DOI: 10.33899/edusj.2019.162974

Received	Accepted
20 / 03 / 2019	10 / 04 / 2019

ABSTRACT

The present study investigated the effect of probiotic *bacteria lactobacillus* GG (13×10^5 CFU/0.1ml) on the immune response of Swiss BALB/c mice (injected intraperitoneally), against experimental Infection with protoscoleces of *Echinococcus granulosus* (Postinfection), in comparison with the control group (mice injected with protoscoleces only) for 2-5 months. Another experimental group of mice inoculated (orally) with *L.rhamnosus* GG (8×10^7 CFU/0.1ml) preinfection with protoscoleces for 3 months. Depending on many criteria including numbers, weights, diameters of developed hydtid cysts, and the percentage of their reduction, the results revealed a significant decrease ($P \leq 0.05$) ($P \leq 0.01$) in numbers, weights and diameters of hydatid cysts in treated mice, expressed by the percentage reduction elevation of their numbers to (98%) in mice treated intraperitoneally (2-5 months) post infection, and 95% in mice treated orally 3 months pre infection, as compared with the control groups.

Key words: Probiotics, Lactobaciuus rhamnosus, Hydatid disease, Echinococcus granulosus.

استخدام بكتريا *Lactobacillus rhamnosus* GG ضد الاصابة بداء الأكياس العدرية الثانوي في الفئران السويسرية BALB/c

تسنيم يونس طركي
قسم علوم الحياة/ كلية العلوم
جامعة كركوك
tasneembio93@gmail.com

اسماء عبد العزيز علي
قسم علوم الحياة/ كلية التربية
جامعة الموصل
assssali@uomsul.edu.iq

نعمة علي احمد
قسم علوم الحياة/ كلية العلوم
جامعة كركوك
nama_1974@yahoo.com

DOI: 10.33899/edusj.2019.162974

الاستلام 2019 / 03 / 20

القبول 2019 / 04 / 10

الخلاصة

تناولت الدراسة الحالية تأثير بكتريا *Lactobacillus rhamnosus* GG (13×10^5 CFU/0.1ml) في الاستجابة المناعية للفئران السويسرية سلالة BALB/c (بطريقة الحقن داخل البريتوني) بعد الاصابة بالرؤيسات الأولية لدودة المشوكة الحبيبية *Echinococcus granulosus*, مقارنة بمجموعة السيطرة (فئران محقونة برؤيسات اولية غير معاملة بالبكتريا) لمدة 2-5 أشهر, إضافة إلى مجموعة تجريبية أخرى من الفئران المجرعة بالبكتريا فموياً (8×10^7 CFU/0.1ml) قبل الإصابة بالرؤيسات الأولية ولمدة 3 أشهر, اعتماداً على معايير عدة تضمنت أعداد الأكياس العدرية النامية وأوزانها واقطارها والنسب المئوية لاختزال أعدادها. أظهرت نتائج الدراسة اختزالاً معنوياً ($P<0.05$), ($P<0.01$) في اعداد, وأوزان, وأقطار الأكياس العدرية الثانوية في الفئران المعاملة, اتضح ذلك من ارتفاع النسبة المئوية لاختزال أعدادها إلى 98% في الفئران المحقونة داخل البريتون بعد 2–5 أشهر من الإصابة, و95% في الفئران المجرعة فموياً, قبل الإصابة لمدة 3 أشهر.

الكلمات الدالة: بكتريا Probiotics، *Lactobacillus rhamnosus*، داء الأكياس العدرية، علاج الطفيليات, *Echinococcus granulosus*.

المقدمة Introduction

تعد المشوكة الحبيبية *E. granulosus* هي الدودة الشريطية المسببة لداء المشوكات الكيسي Cystic echinococcosis, وهو مرض عالمي مشترك بين الإنسان والحيوان Zoonotic, ينتشر بنسبة كبيرة في الدول النامية مثل دول الشرق الأوسط واستراليا (1) وهو مرضاً عالمياً مهملاً (2) يمكن أن يسبب خسارة اقتصادية وصحية, تحتل الصين الجزء الأكبر من الخسارة العالمية (3), إن انتشار المرض وخطورته الكبيرة يعزى إلى عدم القدرة على اكتشاف المرض في المراحل المبكرة لكونه لا يظهر أعراضاً مرضية إلا بعد الزيادة في حجم الكيس بحيث يسبب ضغطاً على النسيج والأعضاء المجاورة له (4). يتم اكتشاف المرض إما عرضياً خلال الفحص بالأشعة السينية أو عندما ينفجر الكيس, وينتج عنه تفاعلات تحسسية Anaphylactic أو عن طريق التشريح ما بعد الموت (5).

يستند تشخيص داء العدريات أيضاً على الطرق التشخيصية المناعية, وتتضمن طريقة التلازن غير المباشر Indirect haemagglutination, الومضان المناعي غير المباشر Indirect immunofluoresence, الترحيل المناعي الكهربائي Counter–current immunoelectrophoresis, اختبار الروز المناعي Radioimmunoassay, والادمصاص المناعي المرتبط بالإنزيم (ELISA) Enzyme–Linked Immunosorbent Assay (5) كما استخدم الباحثون طرائق التصوير والطرائق المصلية والجزيئية للكشف عن داء المشوكات الحبيبية (6).

توجد طرائق عديدة لعلاج داء المشوكات الكيسي ولكن حالياً هناك ثلاثة خيارات, أولها: الجراحة التي تعد المعالجة الرئيسة للمرض (7), ولكن يجب تجنب انتشار (سكب) محتويات الكيس واستخدام العوامل الفعالة القاتلة للرؤيسات الأولية Protoscolicidals لتقليل نسبة الإصابة الثانوية, يحتاج الجراحون مواداً أقل تأثيراً على النسج وأكثر فاعلية في قتل الرؤيسات الأولية الموجودة في الكيس, ولا تتأثر بالتخفيف مع سائل الكيس (8). كما أوضحت منظمة الصحة العالمية WHO وجود علاج آخر لداء الأكياس العدرية وهي طريقة السفط والحقن Puncture Aspiration Injection Respiration (PAIR). تكون هذه الطريقة أكثر تأثيراً من الجراحة في حالة تكرار الإصابة وعودتها (9) ويشترط فيها مهارة عالية ودراية كافية تجنباً لخطر الإصابة الثانوية (10), كذلك استخدمت طرائق استئصال الكيس العدري مثل استخدام الإشعاع (11), والمايكروويف (12), والاستئصال بالتجميد (13), واستخدام الموجات فوق الصوتية عالية الشدة (HIFU) High Intensity Focused Ultrasound (14,15). وجد الباحثون (7) Chen *et al* أن تأثير الذبذبات الصغيرة جداً على الغشاء الخلوي يكون ذا معنوية بيولوجية ولهذا ركزوا على دراستها وهدفوا إلى التحري عن التأثيرات الحيوية للتيار الكهربائي المقاس بـ nanosecond Pulsed Electric Field (nsPEF) على الكيس العدري المتعدد الأغشية للإنسان, وقد لاحظوا التأثير الاستثنائي للذبذبات الدقيقة على التركيب الغشائي للكيس من ناحية النضوحية ومن الناحية الكيميائية الحياتية.

يعد البندازول Albendazole الدواء المثالي للمرض, ولكن تراكيز العلاج في العضو المتأثر تكون عادة قليلة بسبب جدران الكيس السميكة, وإن زيادة الجرعة والاستخدام لفترات طويلة قد يكون لها تأثيرات جانبية مثل الإسهال Diarrhea والغثيان Nausea والقيء Vomiting والزيادة في انزيم aminotransferase وقلة تعداد كريات الدم البيضاء Leucopenia (16,17).

لذا, فقد اتجه الباحثون في السنوات الأخيرة إلى ايجاد بدائل أفضل وتطوير استراتيجيات بديلة, منها استخدام بكتريا Probiotics للتحري عن تأثيرها الوقائي والعلاجي ضد الأمراض المختلفة فضلاً عن ذلك, فقد استخدمت هذه البكتريا ضد أمراض طفيلية مختلفة داخل وخارج الجسم, وكان لها دوراً فعالاً في الحد منها (18,19). وتعد بكتريا Probiotic كائنات حية مجهرية خارجية المنشأ Exogenus وهي غير ممرضة, ولها القدرة على تحمل مستويات pH الحامضية وتحمل حموضة الأمعاء (20).

تعود الكائنات الحية المجهرية التي تنتمي إلى بكتريا Probiotics في الإنسان بشكل رئيس إلى الأجناس *Lactobacillus, Bifidobacterium, Lactococcus, Streptococcus, Enterococcus*, يضاف إلى ذلك سلالات البكتريا الموجبة لصبغة كرام التي تعود إلى جنس *Bacillus* وبعض سلالات الخمائر التي تنتمي إلى جنس *Saccharomyces* وتستخدم أيضاً بصورة شائعة في منتجات Probiotics (21).

تعرف الـ Probiotics بامتلاكها تأثيرات ايجابية على المضيف من خلال تحسين التوازن الطبيعي للبكتريا الموجودة في الأمعاء Microbiota وتعزيز صحة الحيوان (22), كما يمكن أن يتم تحوير الأشكال

الميكروبية المعوية بواسطة بكتريا Probiotics وذلك لتوفير ظروف ملائمة لتعزيز النمو والصحة, وتستطيع بكتريا Probiotics أن تعزز أداءها وتطور التوازن الميكروبي وتعزز دفاعات المضيف ضد الممرضات المعوية المختلفة من خلال تحفيز الجهاز المناعي المخاطي (23). ينتج عن التجريع الفموي لبكتريا Probiotics تحسين عملية البلعمة من خلال حث الانفجار التنفسي وإزالة التحبب من الخلايا العدلة في الوقت نفسه تزيد سعة البلعمة للخلايا البلعمية الكبيرة (24).

تعد بكتريا *L. rhamnosus* GG إحدى أكثر السلالات البكتيرية التابعة لـ Probiotics استعمالاً, وقد عزلت بكتريا *L. rhamnosus* GG (LGG) ATCC 53103 من النماذج البرازية للبالغين الأصحاء من قبل Barry Goldwin وSherwood Gorbach مما يوضح حروف الاسم النموذجي للبكتريا GG, عرفت هذه البكتريا بوصفها سلالة فعالة من بكتريا Probiotics بسبب مقاومتها للحامض واملاح الصفراء, وصفات النمو النموذجية وقدرتها على الالتصاق بالطبقة الطلائية المعوية (25). وبذلك أصبحت أحدى أكثر السلالات البكتيرية التي درست بشكل واسع واستخدمت في مختلف نواتج بكتريا Probiotics المتوفرة تجارياً, ودرست التأثيرات الايجابية لهذه البكتريا بشكل واسع في التجارب السريرية وفي الدراسات على الإنسان (26).

نتيجة لكل ما ذكر فقد هدفت الدراسة الحالية إلى بيان تأثير بكتريا *l. rhamnosus* GG على الاستجابة المناعية في الفئران البيض السويسرية BALB/C ضد الإصابة بداء الأكياس العدرية الثانوي داخل الجسم *in vivo*, ومن خلال الاطلاع على ما وثق عن هذه البكتريا من دراسات وأبحاث مختلفة, تبين أنه لم يسبق وان استخدمت بوصفها معدلاً مناعياً ضد الإصابة بداء الأكياس العدرية الثانوي داخل الجسم *in vivo*, لذا فقد اختيرت هذه البكتريا في الدراسة الحالية للتعرف على تأثيرها ضد الإصابة بداء الأكياس العدرية من خلال معايير, تضمنت أعداد وأوزان وأقطار الأكياس العدرية النامية ومعامل اختزالها ولذا عدت الدراسة الأولى من نوعها ولبنة أولية لهكذا دراسات بشأن علاج الأمراض الطفيلية.

المواد وطرائق العمل

عزل وفحص الأكياس العدرية Isolation and hydatid Cysts Test

تم الحصول على الأكياس العدرية (الصورة 1) بعد عزلها من أكباد الأغنام المذبوحة من محلات الجزارة في مدينة الموصل, وحال إيصال هذه الأكباد المصابة إلى المختبر, فتحت الأكياس مباشرة للتأكد من خصوبتها من خلال وجود الرؤيسات الأولية داخلها.

الصورة (1): أكياس عدرية نامية في أكباد أغنام مصابة بالطور اليرقي للمشوكة الحبيبية

جمع الرؤيسات الأولية Protoscoleces Collection

استخدمت طريقة Smyth (27) للحصول على الرؤيسات الأولية, وذلك بتعقيم سطح الأكياس العدرية مرتين بقطن طبي مبلل باليود الكحولي بتركيز 1%, تم بعد ذلك سحب جزء من سائل الكيس العدري بواسطة محقنة طبية سعة 15مل ذات إبرة قياس G21, ثم فتح الكيس وافراغه من السائل تماماً بواسطة ممص بلاستيكي خاص, وغسل الكيس من الداخل باستخدام محلول دارئ الفوسفات الملحي (PBS) ذي الدالة الحامضية 7.2, ثم جمع السائل مع الرؤيسات الأولية في أنابيب اختبار ورسبت الرؤيسات الأولية ثم أجريت لها عملية غسل باستخدام المحلول الملحي الدارئ الحاوي على البنسلين Penicillin بتركيز 20000 International Unit و1غم ستربتومايسين Streptomycin لكل لتر في محلول الغسل قبل البدء بالغسلة الثانية بجهاز المنبذة Centrifuge نوع ELITE ثلاث مرات بسرعة 3000 دورة لكل دقيقة, سحب الطافي من السائل بعد الغسلة الثالثة وأضيف محلول (PBS) المعقم للراسب الحاوي على الرؤيسات الأولية.

تقدير حيوية الرؤيسات الأولية Estimation of Protoscleces Viability

تم تقدير حيوية الرؤيسات الأولية حسب طريقة Smyth & Barett (28) وذلك بإضافة 20 مايكرولتر من معلق الرؤيسات الأولية, إلى حجم مساوٍ من صبغة الأيوسين بتركيز 0.1% على شريحة زجاجية, وفحصت تحت المجهر, ثم عدت الرؤيسات الأولية ذات اللون الأخضر البرّاق (حيّة) لعدم نفاذية أغشيتها لصبغة الأيوسين Eosin exclusion, في حين عدت الرؤيسات الحمراء ميتة لاصطباغها بالصبغة, كما أخذت حركة الرؤيس الأولي بنظر الاعتبار التي تعد من العلامات المهمة أيضاً لفحص الحيوية. وتم حساب النسبة المئوية لحيوية الرؤيسات الأولية الحية في العينة المحسوبة إلى العدد الكلي للرؤيسات الأولية المحسوبة × 100, كررت العملية ثلاث مرات وحسبت نسبة الحيوية Survival, تم في هذه الدراسة استخدام رؤيسات أولية ذات حيوية أكثر من 97%.

الحيوانات المختبرية Laboratory Animals

استخدمت في هذه الدراسة الفئران السويسرية نوع Mus Musculus سلالة BALB/c التي تم تربيتها في مختبرات قسم علوم الحياة/ كلية التربية/ جامعة الموصل, إذ تم تكثيرها في ظروف البيت الحيواني ذي درجة الحرارة 3±25°م في أقفاص بلاستيكية بمعدل 5 فئران لكل قفص, وزودت بالماء والغذاء الذي كان عبارة عن عليقة مركزة مضافاً إليها البروتين الحيواني, وقد فرشت أرضية الاقفاص البلاستيكية بنشارة الخشب التي كانت تبدل كل ثلاثة أيام للمحافظة على نظافة الفئران, وقد عزلت الفئران الذكور بعمر 3-5 أسابيع وحقنت بالرؤيسات الأولية في التجويف البطني بواسطة إبرة معقمة G21.

البكتريا المستخدمة في الدراسة

استخدمت بكتريا *L. rhamnosus GG* التي تم الحصول عليها من الولايات المتحدة الأمريكية, ولاية كاليفورنيا, بشكل كبسولات, تحتوي كل كبسولة على 10 بليون خلية بكتيرية (الصورة 2), تم تنشيط البكتريا في وسط Nutrient broth وحضنت بدرجة 37°م لمدة 24 ساعة. بعد تنشيط البكتريا نقل 0.1ml من المعلق البكتيري واضيف إلى انبوب اختبار يحتوي على 0.9ml من محلول ملح الفسلجي normal saline, نقل 0.1ml من الانبوب الأول إلى الانبوب الثاني الحاوي على 0.9ml من N.S, استمر تحضير التخافيف إلى

التخفيف السابع. ثم عدت المستعمرات بطريقة التخفيف بأطباق بتري حيث نقل 0.1ml من كل من التخفيفين الخامس والسابع, وفرشت على وسط Nutrient agar وحضنت بدرجة 37°م ولمدة 24 ساعة, ثم عدت المستعمرات لكل تخفيف, إذ بلغت 10^5×13(CFU/0.1ml) و10^7×8(CFU/0.1ml) لكل من التخفيفين الخامس والسابع, على التوالي. (19, 29).

الصورة (2): بكتريا *Lactobacillus rhamnosus*

تصميم التجارب Experimental Design Intraperitoneal Injection

الحقن داخل البريتون Intraperitoneal Injection

المجموعة الأولى

تمثل مجموعة السيطرة, التي حقنت بمجموعة ثابتة تضمنت 20 فأراً ذكراً بـ 2000 رؤيس أولي داخل البريتون Intraperitoneally وتضمنت أربع مجاميع بواقع 5 فئران لكل مجموعة, عدت مجاميع السيطرة, وشرحت الفئران بعد شهرين وثلاثة أشهر وأربعة أشهر وخمسة أشهر.

المجاميع التجريبية

استخدم 20 فأراً ذكراً قسمت إلى أربع مجاميع بواقع 5 فئران لكل مجموعة, حقنت المجاميع كلها بـ 2000 رؤيس أولي داخل البريتون ثم حقنت هذه المجاميع بعد 24 ساعة بمعلق بكتيري 0.1ml من *L. rhamnosus* GG من التخفيف الخامس 10^5×13(CFU/0.1ml) داخل البريتون, واستمر الحقن بالبكتريا كل 72 ساعة.

شرحت فئران **المجموعة الأولى** بعد شهرين من الإصابة, وشرحت فئران **المجموعة الثانية** بعد 3 أشهر من الإصابة, أما **المجموعة الثالثة** فشرحت بعد 4 أشهر من الإصابة, **والمجموعة الرابعة** بعد 5 أشهر من الإصابة, بحيث أن التشريح لجميع المجاميع كان بعد انتهاء حقن البكتريا بـ 72 ساعة.

التجريع الفموي Orally Inoculation

جرعت 5 فئران فموياً ببكتريا *L. rhamnosus* GG بالتخفيف 10^7×8(CFU/0.1ml), ثم حقنت هذه الفئران بعد 5 أيام داخل البريتون بـ 2000 رؤيس أولي, واستمر تجريعها بالبكتريا كل 48 ساعة طيلة 3 أشهر, شرحت الفئران بعد يومين من التجريع الأخير بالبكتريا.

تشريح الفئران Mice Dissection

ثبتت الحيوانات في طبق التشريح الخاص بعد تخديرها بالإيثر, وفتحت البطن للتحري عن وجود الأكياس العدرية وانتشارها على الاحشاء الداخلية كالتجويف الخلبي والكبد والطحال والرئتين والحجاب الحاجز بمساعدة العدسة المكبرة, وتم قياس قطر الأكياس بواسطة القدمة Vernier, وقيس وزن الأكياس النامية بواسطة ميزان حساس.

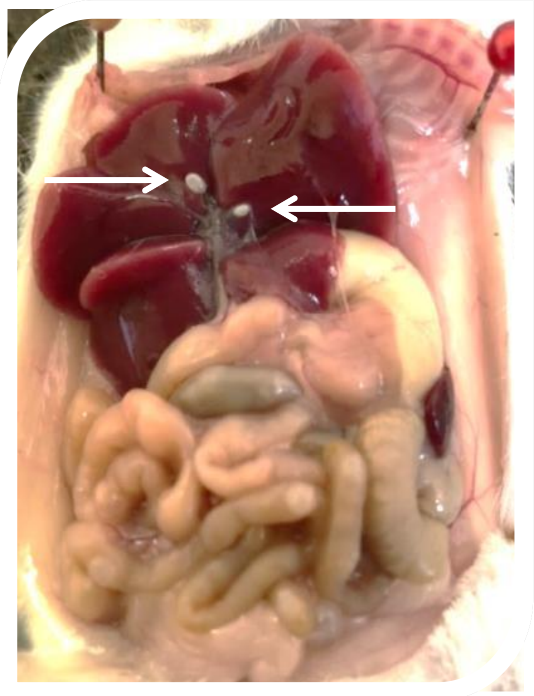
التحليل الاحصائي

تمت الاستعانة بالبرنامجين الاحصائيين الجاهزين في تنفيذ الإجراءات الاحصائية برنامج (SAS) Statistical Analysis System وبرنامج Minitab (30).

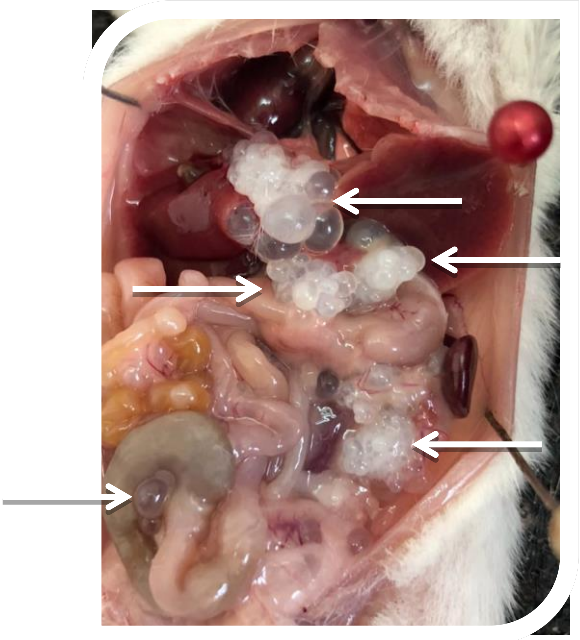
النتائج

تأثير البكتريا *L. rhamnosus* GG في أعداد واوزان وأقطار الأكياس العدرية في الفئران المصابة بالرؤيسات الأولية.

أظهرت النتائج عن وجود فروقات معنوية بين المعاملات عند مستويي احتمالية ($p\leq0.05$) و($p\leq0.01$) الجدول (1-A), وعند اجراء اختبار دنكن أظهرت النتائج انخفاضاً كبيراً وملحوظاً في أعداد وأوزان وأقطار الأكياس العدرية والنسبة المئوية لاختزال أعداد الاكياس العدرية في الفئران المعاملة ببكتريا *L. rhamnosus* GG لمدة شهرين وثلاثة أشهر وأربعة أشهر وخمسة أشهر الجدول (1-B), حيث بلغت أعلى نسبة اختزال أعداد الأكياس العدرية 98% بعد خمسة أشهر من الحقن, إذ انخفض معدل عدد الأكياس إلى 1.0 كيس في الفئران المعاملة ببكتريا *L. rhamnosus*. الصورة (3).



الصورة (3): اكياس عدرية ثانوية نامية في فأر محقون برؤيسات أولية معامل بالبكتريا بعد 5 أشهر من الاصابة

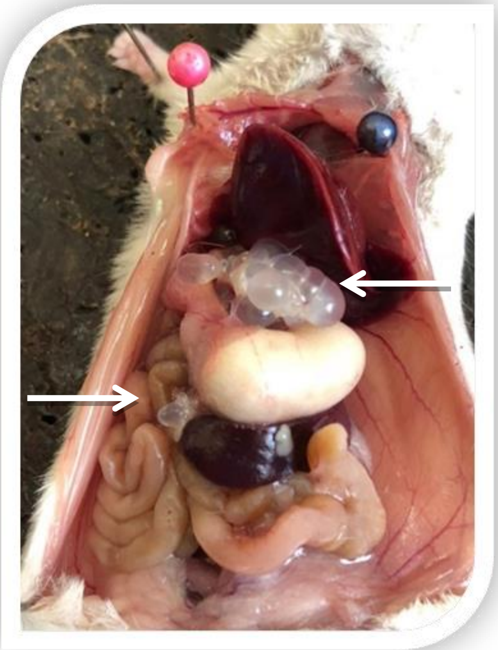


الصورة (4): اكياس عدرية ثانوية نامية في فأر محقون برؤيسات أولية غير معامل (سيطرة) بالبكتريا بعد 5 أشهر من الاصابة

مقارنة بمجموعة السيطرة التي كان معدل عدد الأكياس 42.2 كيس (الصورة 4), وانخفض معدل وزن الأكياس العدرية إلى 0.001 غم في الفئران المعاملة ببكتريا *L. rhamnosus* GG, مقارنة بمجموعة السيطرة التي بلغ وزن الأكياس العدرية 0.096 غم, كما انخفض معدل اقطار الأكياس العدرية في الفئران المعاملة إلى 0.08 ملم مقارنة بمجموعة السيطرة إذ بلغ معدل أقطار الأكياس العدرية 0.44 ملم وكانت الفروقات معنوية.

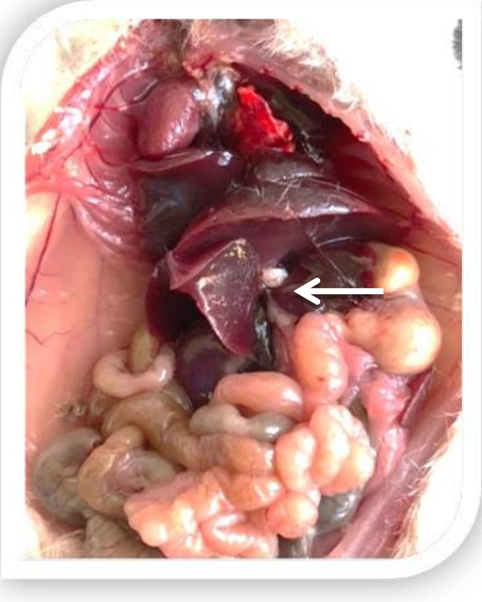
بلغت نسبة الاختزال لأعداد الأكياس العدرية 97% بعد أربعة أشهر من الحقن إذ سجل أدنى عدد للأكياس العدرية 1.2 كيس في الفئران المعاملة ببكتريا *L. rhamnosus* GG, الصورة (5).

الصورة (5): فأر محقون برؤيسات أولية معامل بالبكتريا بعد 4 أشهر من الإصابة (خالٍ من الأكياس العدرية)



الصورة (6): أكياس عدرية ثانوية نامية في فأر محقون برؤيسات أولية غير معامل (سيطرة) بالبكتريا بعد 4 أشهر من الاصابة

مقارنة بمجموعة السيطرة التي سجلت ارتفاعاً لأعداد الأكياس العدرية بلغ 45.4 كيس (الصورة 6), انخفض معدل وزن الأكياس العدرية إلى 0.001 غم في الفئران المعاملة ببكتريا *L. rhamnosus* GG مقارنة بمجموعة السيطرة التي بلغت أوزانها 0.06 غم, وانخفضت معدلات أقطار الأكياس العدرية فيها 0.01 ملم مقارنة بمجموعة السيطرة التي بلغت 0.31 ملم, حيث كانت الفروقات معنوية. بلغت نسبة الاختزال لأعداد الأكياس العدرية 94% بعد ثلاثة أشهر من الحقن, إذ انخفضت معدلات أعداد الأكياس العدرية إلى 0.75 كيس في الفئران المعاملة ببكتريا *L. rhamnosus* GG, الصورة (7).

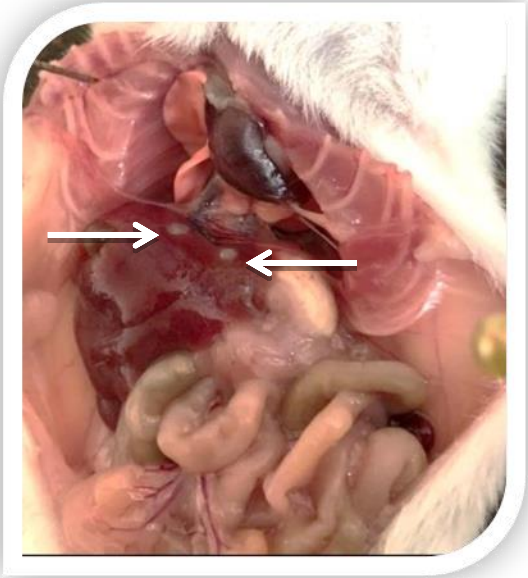


الصورة (7): اكياس عدرية ثانوية نامية في فأر محقون برؤيسات أولية معاملة بالبكتريا بعد 3 أشهر من الإصابة

مقارنة بمجموعة السيطرة التي بلغت معدلات أعداد الاكياس العدرية 21.2 كيس, الصورة (8).

الصورة (8): اكياس عدرية ثانوية نامية في فأر محقون برؤيسات أولية غير معامل (سيطرة) بالبكتريا بعد 3 أشهر من الإصابة

وانخفض معدل وزن الاكياس العدرية إلى 0.012 غم في الفئران المعاملة ببكتريا *L. rhamnosus* GG مقارنة بمجموعة السيطرة التي بلغت 0.033 غم إذ كانت الفروقات معنوية, كما انخفض معدل قطر الأكياس العدرية إلى 0.09 ملم في الفئران المعاملة ببكتريا *L. rhamnosus* GG مقارنة بمجموعة السيطرة التي بلغت 0.42 ملم بعد ثلاثة أشهر من الحقن وكانت الفروقات معنوية. بلغت نسبة الاختزال لأعداد الأكياس العدرية 82% بعد شهرين من الحقن إذ انخفضت معدلات أعداد الأكياس العدرية إلى 1.0 كيس في الفئران المعاملة ببكتريا *L. rhamnosus* GG, الصورة (9), مقارنة بمجموعة السيطرة التي بلغت 6.2 كيس الصورة (10).



الصورة (9): اكياس عدرية ثانوية نامية في فأر محقون برؤيسات أولية معامل بالبكتريا بعد شهرين من الإصابة

الصورة (10) اكياس عدرية ثانوية نامية في فأر محقون برؤيسات أولية غير معامل (سيطرة) بالبكتريا بعد شهرين من الإصابة

كما انخفض معدل وزن الأكياس العدرية إلى 0.0012 غم في الفئران المعاملة ببكتريا *L. rhamnosus* GG مقارنة بمجموعة السيطرة التي بلغت معدلات أوزان الاكياس العدرية فيها 0.08 غم, وانخفض معدل قطر الأكياس العدرية إلى 0.1 ملم في الفئران المعاملة ببكتريا *L. rhamnosus* GG مقارنة بمجموعة السيطرة التي بلغت أقطار الأكياس العدرية فيها 0.4 ملم وكانت الفروقات معنوية.

الجدول (1-A) تحليل التباين ANOVA لمعدلات أعداد واوزان وأقطار الأكياس العدرية في الفئران المصابة بالرؤيسات الاولية والمعاملة ببكتريا *L.rhamnosus* GG مقارنة بمجموعة السيطرة لمدة شهرين وثلاثة اشهر واربعة اشهر وخمسة اشهر

مصادر الاختلاف	معدل اعداد الاكياس				معدل اوزان الاكياس			معدل اقطار الاكياس		
	درجات الحرية	مجموع المربعات	متوسط المربعات	قيمة F	مجموع المربعات	متوسط المربعات	قيمة F	مجموع المربعات	متوسط المربعات	قيمة F
البكتريا	9	13843.38000	1538.15333**	23.47	0.06818138	0.00757571**	4.72	1.30592800	0.14510311**	5.09
المحقونة ضد مجموعة السيطرة	1	7672.900000	7672.900000**	117.09	0.04750656	0.04750656**	29.59	0.82944000	0.82944000**	29.08
المحقونة والفموية ضد مجموعة السيطرة	1	660.016667	660.016667**	10.07	0.00098820	0.00098820 *	0.62	0.09204167	0.09204167 *	3.23
الخطأ التجريبي	40	2621.20000	65.53000**	23.47	0.06422720	0.00160568		1.14072000	0.02851800	
المجموع الكلي	49	16464.58000	1538.15333**	117.09	0.13240858			2.44664800		

* فرق معنوي عند مستوى احتمال (P<0.01)

** فرق معنوي عند مستوى احتمال (P< 0.05)

الجدول (1-B): معدلات أعداد وأوزان وأقطار الاكياس العدرية والنسبة المئوية لاختزال اعدادها في الفئران المصابة بالرؤيسات الاولية والمعاملة ببكتريا *L.rhamnosus* GG (بطريقة الحقن داخل البريتون) مقارنة بمجموعة السيطرة لمدة شهرين وثلاثة أشهر واربعة أشهر وخمسة أشهر

المعاملات	عدد الأشهر	عدد المكررات (الفئران)	الاكياس العدرية			النسبة المئوية للاختزال
			معدل العدد	معدل الوزن (غم)	معدل القطر (ملم)	
C	2	5	C 6.200	A 0.08980	A 0.4780	82%
T	2	5	C 1.000	C 0.00120	DC 0.0120	
C	3	5	B 21.200	BC 0.03340	BA 0.4280	94%
T	3	5	C 0.750	A 0.12200	DC 0.0940	
C	4	5	A 45.400	BA 0.06800	BAC 0.3100	97%
T	4	5	C 1.200	C 0.00180	D 0.0120	
C	5	5	A 42.200	A 0.09660	BA 0.4420	98%
T	5	5	C 1.000	C 0.00100	DC 0.0800	

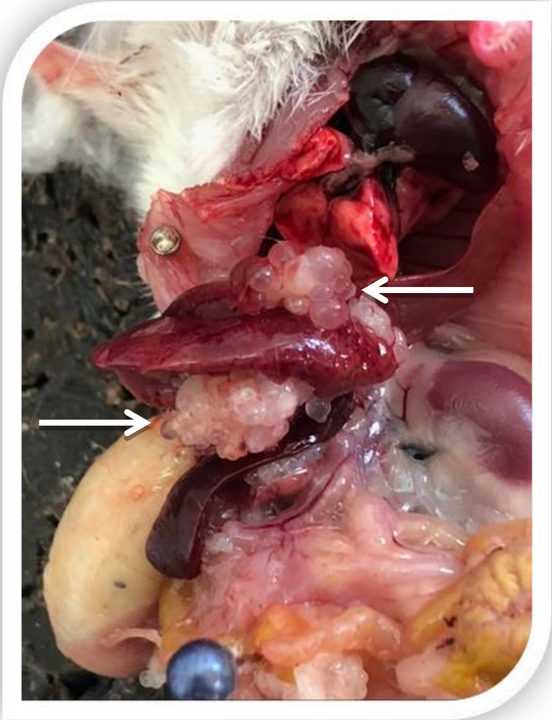
C: مجموعة السيطرة Control. T: المجموعة المعاملة Treated.

الحروف المتشابهة تعني عدم وجود فروق معنوية.

الحروف المختلفة تعني وجود فروق معنوية.

كما أظهرت النتائج أن معدل أعداد وأوزان وأقطار الأكياس العدرية والنسبة المئوية لاختزالها في تجربة التجريع الفموي ببكتريا *L. rhamnosus* GG التي جرعت قبل الإصابة بالرؤيسات الأولية بـ (3) أيام preinfection واستمرت التجربة لمدة ثلاثة أشهر، إذ بلغت نسبة اختزال أعداد الأكياس العدرية 95% في الفئران المجرعة بالبكتريا, كما انخفض معدل أعداد الاكياس العدرية إلى 1.0 كيس, الجدول (2) والصورة (11).

الصورة (11): فأر مجرع بالبكتريا محقون بالرؤيسات الأولية لمدة 3 أشهر (خالٍ من الأكياس العدرية)



الصورة (12): فأر محقون بالرؤيسات الأولية (السيطرة) لمدة 3 أشهر من الإصابة

مقارنة بمجموعة السيطرة التي بلغ معدل أعداد الاكياس العدرية فيها 21.2 كيس (الصورة 12), وانخفض معدل أوزان الاكياس العدرية إلى 0.005 غم في الفئران المجرعة ببكتريا *L. rhamnosus* GG مقارنة بمجموعة السيطرة التي بلغ معدل أوزان الاكياس العدرية فيها 0.036 غم.

كما انخفض معدل أقطار الاكياس العدرية إلى 0.02 ملم في الفئران المجرعة ببكتريا *L. rhamnosus* GG مقارنة بمجموعة السيطرة, إذ بلغ معدل اقطار الأكياس العدرية فيها 0.42 ملم وكانت الفروقات معنوية.

الجدول (2): معدل أعداد وأوزان وأقطار الأكياس العدرية والنسبة المئوية لاختزال أعدادها في الفئران المجرعة ببكتريا *L.rhamnosus* GG فموياً والمصابة بالرؤيسات الأولية مقارنة بمجموعة السيطرة لمدة ثلاثة أشهر

المعاملات	عدد الأشهر	عدد المكررات (الفئران)	الأكياس العدرية			النسبة المئوية للاختزال
			معدل العدد	معدل الوزن (غم)	معدل القطر (ملم)	
C	3	5	B 21.200	BC 0.03640	BA 0.4280	95%
T	3	5	C 1.0000	D 0.0050	D 0.0200	

C : مجموعة السيطرة T.Control : المجموعة المعاملة Treated.

الحروف المتشابهة تعني عدم وجود فروق معنوية. الحروف المختلفة تعني وجود فروق معنوية.

المناقشة

تعتمد كفاءة البكتريا المفيدة للمضيف على الميكانيكية التي بواسطتها أن تحدث تأثيراً. قد تضم هذه الميكانيكيات أنماطاً متعددة من التأثيرات تتضمن انتاج المواد المضادة للميكروبات, وتعديل الجهاز المناعي

المخاطي, وتغيير الكائنات الدقيقة Microflora المناعية وتعزيز الفعالية الانزيمية (31), ان النمط الأولي لفعالية بكتريا Probiotics ضد الطفيليات قد يحدث بواسطة تعزيز الحاجز المعوي وتعديل الـ Microflora في المعي (32,33,34), قد تزيد بكتريا Probiotics عدد الكائنات المجهرية مثل بكتريا *Lactobacilli* التي بدورها تثبط نمو الكائنات الممرضة بواسطة التنافس على مواقع الالتصاق في المخاطية المعوية. كما تتضمن الميكانيكية الثانية افراز مواد مضادة للميكروبات مثل بكتريوسين bacteriocins والحوامض العضوية مثل حامض اللاكتيك Lactic acid وحامض الاستيتيك Acetic acid وحامض البيوتيريك Butyric acid التي تفرز بصورة رئيسة من قبل أنواع الـ *Lactobacillus* التي تمتلك تأثيراً قاتلاً على يرقات الطفيليات (35).

تنتج سلالات بكتريا *lactobacillus*, lactacin B, lactacin F, nisin, في حين تنتج بكتريا *l. reuterin* مضاداً حيوياً واسع المدى reaterin (3-hydricxyprionaldehyde) وهو فعّال ضد البكتريا والخمائر والفطريات والأوالي والفيروسات (36) بواسطة تقليل الدالة الحامضية المعوية الموضعية عن طريق انتاج lactic acid, لذلك فإن Probiotics يمكن أن تحور نمو الكائنات الدقيقة الحساسة للحامضية. ولبكتريا Probiotics ميزة تعديل المناعة بواسطة تحفيز الاستجابة المناعية للمضيف تجاه مختلف الكائنات الممرضة. تتفاعل بكتريا Probiotics في الأمعاء مع الخلايا الطلائية, خلايا M في بقع بايرس Peyer's Patches والخلايا المناعية, وينتج عن هذه التفاعلات زيادة عدد الخلايا المنتجة لـ IgA ويصاحبها انتاج IgM و IgA الافرازي ذو الاهمية الخاصة في المناعة المخاطية التي تمثل جميعها حاجزاً ضد الكائنات الممرضة (37), إضافة إلى ذلك تؤثر بكتريا Probiotics على الخلايا التشجرية المسؤولة عن جمع الـ Antigens من الأمعاء وتقديمها إلى خلايا T الطبيعية المؤدية إلى تمايزها لخلايا T المساعدة (Th1, Th2) أو الخلايا اللمفاوية المنظمة Tregulatory lymphocyte cells. ومن الجدير بالذكر لم توصف لحد الآن جزيئات Probiotics المشمولة في حث الخلايا التشجرية بشكل كامل باستثناء طبقة البروتين S لبكتريا *l. acidophilus* NCFM التي تنظم نضج الخلايا التشجرية وفعاليات خلايا T.

حديثاً هناك دراسات عديدة تحرت عن امكانية الـ Probiotics في السيطرة على تكاثر الممرضات حقيقية النواة اما في المعي مثل الـ Probiotics أو في أجزاء أخرى, ودعم هذا المفهوم بالدراسات الحديثة التي أظهرت أن الكائنات الدقيقة التعايشية في الامعاء يمكن أن تلعب دوراً حاسماً في اكمال دورة حياة الخيطيات الطفيلية المعوية *Trichurs muris* وتعديل الاستجابة المناعية للمضيف (38).

توافقت نتائج الدراسة الحالية مع دراستي (39) Dea-Ayuela, Rama-Iñiguez, & Bolás-Fernandez, (40), McClemens *et al.*, حول تأثيرات البكتريا المفيدة والتفاعلات المتعلقة في نماذج اصابات الديدان الخيطية المعوية بالدودة السوطية *T.muris* إذ تبين أن اعطاء المكملات الغذائية فموياً ببكتريا *L.rhamnosus* (JB-1) عند جرعة 1×10^9 CFU لكل يوم سرع بشكل معنوي ازالة اليرقات في الفئران المقاومة C57BL/6 للدودة الخيطية *T.muris*, وقد صاحب هذا التأثير تنظيم مستويات السايتوكين IL-10 المضاد للالتهاب واعداد الخلايا الطلائية الفارزة للمخاط, وبذا أوضحت هذه الملاحظات أن بكتريا Probiotics مثل *l. rhamnosus* (JB-1) تعدل الخلايا الطلائية الفارزة للمخاط, وتعزز ازالة الديدان من خلال افراز مسار (IL-10) المتواسط بالخلايا الكأسية. اضافة إلى ذلك وجد بأن استمرار الإصابة يعزز مجاميع البكتريا جنس *lactobacillus* ولكن يختزل مجاميع انواع البكتريا الأخرى في الأمعاء. وهكذا فإن تأثيرات التفاعلات بين *T.muris* والكائنات الدقيقة في المضيف يمكن أن يرفع التنافسية بين البكتريا والمضيف وازالتها (41,42). ومن ناحية أخرى أوضح الباحثون أن المعالجة بالبكتريا المقتولة لم تظهر تأثيراً مفيداً مماثلاً كما في البكتريا الحية من

حيث طرح الديدان والتغيرات المناعية, هذه المعلومات تقترح ان التأثيرات الايجابية لا تعزى فقط إلى تركيب البكتريا ولكن أيضاً الى الناتج المفرز المنتشر من البكتريا أو إلى التفاعلات بين المضيف والبكتريا الحية, كما تعزى أيضاً إلى الاختلافات في كفاءة بكتريا Probiotics وتخصصها على مستوى السلالة strain specific, وتنوع تصميم الدراسة, فضلاً عن الحيوانات المختبرية المستخدمة ومديات الجرعة المعطاة وطريقة التجريع.

توافقت هذه الدراسة أيضاً مع دراسات باحثين آخرين الذين استخدموا بكتريا Probiotics المحفزة للمناعة ضد الإصابة بالدودة الخيطية *Trichinella spiralis* التي عدت نموذجاً لتقييم الصفات المعدلة والمناعية والمضادة للديدان لبكتريا Probiotics, وكذلك لسلالات البكتريا المنتجة للبكتريوسين (43,44), ومن نتائج جميع الدراسات فإن الأنواع المكتشفة بصورة واسعة هي من جنس *lactobacillus*, ومن ضمنها كانت *l. casie* أكثرها تأثيراً مضاداً للديدان بكفاءة تراوحت بين 75–100% وقاية من الديدان. كما أظهرت سلالة بكتريا *l. plantaruml* P164 درجة وقاية 90% من الدودة الخيطية *T.spiralis*, وهكذا اقترح الباحثون أن سلالات بكتريا *lactobacillus* المذكورة آنفاً تكون آمنة باستخدامها بكتريا Probiotics علاجية ووقائية ضد الدودة الخيطية *T.spiralis*. فيما عزا الباحثون التأثير الوقائي إلى انتاج IL-2, IFN-γ واوكسيد النتريك (37). كذلك أوضح (45) Martinez- Gomez *et al* أن التجريع ببكتريا *L.casei* Shirota (CFU) 1×10^8 داخل البريتون, لمرة واحدة في الاسبوع ولمدة 3 أسابيع لـ 60 فأراً اعطوا جرعة تحتوي على 200 يرقة من *T.spiralis* أدى إلى نقص معنوي في أعداد الطفيليات الناضجة في معي الفئران.

توافقت نتائج الدراسة الحالية أيضاً مع دراسة (46) Basualdo *et al.* الذي استخدم (CFU/ml) 3×10^8 من بكتريا *Enterococcus faecalis* ضد الاصابة بالدودة الخيطية *Toxocara canis* في الفئران السويسرية N:NIH, إذ اثبت الباحثون الاختزال المعنوي ليرقات الدودة (75–100%) في الكبد والرئتين بعد 48 ساعة من الإصابة بالبيوض المجننة للدودة. يضاف إلى ذلك فإن اعطاء بكتريا *E.faecalis* CECT71219 بجرعات مختلفة (CFU) 1.46×10^4, 7×1^4 في المزرعة و(CFU) 1×10^8 اطعمت للفئران وأثبت كلاهما تأثيراً مضاداً قاتلاً لليرقات خارج وداخل الجسم (47).

أظهرت الدراسة الحالية توافقاً مع دراسة (18) Coêlho *et al.* الذين وضعوا ستراتيجيات وقائية جديدة ضد الاصابة بالديدان الشصية Hook worms وتضمنت استخدام بكتريا Probiotics لهذا الغرض بعد ان لاحظوا حدوث مقاومة للأدوية عند الاصابة بهذه الديدان سواء كانت في الإنسان أو في الكلاب, إذ وجدوا ان اعطاء معلق 10^6x1(CFU) من كل من السلالات H2B20 *L. delbrueckii*, ATCC4536 *L. acidophilus*, ATCC8014 *L. plantarum* لعشرة حيوانات مصابة طبيعياً, كل 48 ساعة لمدة 28 يوماً, أظهر تأثيراً معنوياً على الإصابة بالدودة الشصية *Ancylostoma caninum* بكفاءة تقارب 90% في الكلاب المصابة طبيعياً, كما أدت المعاملة بمستحضر البكتريا إلى اختزال معنوي في البيوض المطروحة في نماذج البراز بنسبة 82.83% لكل غم من البراز عند مستوى احتمالية ($p\leq0.05$), مما يقترح التأثيرات التحفيزية المناعية لبكتريا Probiotics, ويسلط الضوء على الاستخدام الفعال لأنواع بكتريا *Lactobacillus* في السيطرة على داء الشصيات في الكلاب.

يمكن الاستنتاج بأن الوسائل العلاجية ببكتريا Probiotics يمكن أن يساعد في تقليل أو اختزال مخاطر الإصابة بطفيليات معينة أو طرائق علاجية متممة ضد الإصابة بالطفيليات, خاصة مرض الأكياس المائية والتي عدت الدراسة الأولى من نوعها, لذا توصي الدراسة في إجراء تطبيقات استخدام بكتريا Probiotics لأمراض طفيلية أخرى, لكي يتم التوصل إلى الفهم الأمثل والمهم للميكانيكيات الجزيئية التي تقع ضمن التأثيرات المهمة لـ

Probiotics على الإصابات الطفيلية من ناحية واستخدامها كوسيلة قتل الرؤيسات الأولية قبل إجراء العمليات الجراحية لاستئصال الأكياس العدرية من ناحية أخرى.

Conclusion

يمكن الاستنتاج بأن هذه البكتريا قد تستخدم مستقبلاً بوصفها مساعداً ومقوياً مناعياً للحد من الأمراض الطفيلية المختلفة, كما قد تستخدم في تصميم الأدوية العلاجية المضادة للأمراض الطفيلية, يضاف إلى ذلك أن هذه البكتريا يمكن أن تطبق مستقبلاً كوسيلة لقتل الرؤيسات الأولية قبل إجراء العمليات الجراحية لاستئصال الأكياس العدرية.

المصادر

1) Mihmanli, M., Idiz, U. O., Kaya, C., Demir, U., Bostanci, O., Omeroglu, S., & Bozkurt, E. (2016). World journal of hepatology, 8 (28), 1169-1181.
2) Possenti, A., Manzano-Román, R., Sanchez-Ovejero, C., Boufana, B., La Torre, G., Siles-Lucas, M., & Casulli, A. (2016). PLoS neglected tropical diseases, 10 (11), e0005114.
3) Van Cauteren, D., Millon, L., De Valk, H., & Grenouillet, F. (2016). Parasitology Research, 115 (11), 4261-4265.
4) Brunetti, E., Kern, P., & Vuitton, D. A. (2010). Acta tropica, 114 (1), 1-16.
5) Mezioug, D., & Touil-Boukoffa, C. (2012). Eur Cytokine Netw, 23 (3), 112-119.
6) Matera, G., Loria, M. T., Peronace, C., Catanzariti, T., Settembre, P., Giancotti, A., Foca, A. (2018).Mediators Inflamm, 2018, 4283672. doi: 10.1155/2018/4283672.
7) Chen, X., Zhang, R., & Wen, H. (2018). BioMed research international, 2018.
8) Cai, H., Chen, L. L., Ye, B., Liu, A. B., Zhang, J., & Zhao, Y. F. (2013). Parasitol Res, 112 (2), 707-717. doi: 10.1007/s00436-012-3191-4.
9) Nayman, A., Guler, I., Keskin, S., Erdem, T. B., Borazan, H., Kucukapan, A.,... Feyzioglu, B. (2016). Diagnostic and Interventional Radiology, 22 (1): 47-51.
10) Zou, X., Wang, J., Zhao, H., Zhang, J., Wu, W., & Ye, B. (2009). Experimental Parasitology, 121 (4), 312-316.
11) Lamonaca, V., Virga, A., Minervini, M. I., Di Stefano, R., Provenzani, A., Tagliareni, P. & Palazzo, U. (2009). World Journal of Gastroenterology: WJG, 15 (26), 3232-3239.
12) Christian, D. J., Khithani, A., & Jeyarajah, D. R. (2011). The American Surgeon, 77 (4), 417-421.
13) Stoot, J., Jongsma, C., Limantoro, I., Terpstra, O., & Breslau, P. (2010). World journal of surgery, 34 (1), 106-113.
14) Liu, A.-B., Cai, H., Ye, B., Chen, L.-L., Wang, M.-Y., Zhang, J., & Zhao, Y.-F. (2013). Parasitology Research, 112 (5), 1865-1875.
15) Imankulov, S., Fedotovskikh, G., Shaimardanova, G., Yerlan, M., & Zhampeisov, N. (2015). Ultrasonics sonochemistry, 27, 712-716.
16) Yilmaz, M., Akbulut, S., Kahraman, A., & Yilmaz, S. (2012). International Surgery, 97 (3), 239-244.
17) Bakan, S. (2016).Turkish Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 24 (3): 592-595.
18) Coêlho, M. D. G., Coêlho, F. A. d. S., & Mancilha, I. M. d. (2013). Journal of Parasitology Research, (2013): 1-6.
19) Mohamed, A. H., Osman, G. Y., Zowail, M. E., & El-Esawy, H. M. (2016). Journal of Parasitic Diseases, 40 (3): 823-832.
20) Reda, A. A. (2018). Journal of Veterinary Medicine, 2018.

21) Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017). Nutrients, 9 (9), 1021.
22) Pender, C. M., Kim, S., Potter, T. D., Ritzi, M. M., Young, M., & Dalloul, R. A. (2017). Poultry Science, 96 (5), 1052-1062.
23) Getachew, T. (2016). J. World Poult. Res, 6, 31-36.
24) Stringfellow, K., Caldwell, D., Lee, J., Mohnl, M., Beltran, R., Schatzmayr, G., Farnell, M. (2011). Poultry Science, 90 (8), 1652-1658.
25) Doron, S., Snydman, D. R., & Gorbach, S. L. (2005). Gastroenterology Clinics, 34 (3), 483-498.
26) Segers, M. E., & Lebeer, S. (2014). Towards a better understanding of Lactobacillus rhamnosus GG-host interactions. Paper presented at the Microbial cell factories.
27) Smyth, J. (1985). Proceedings of the 13 th Int. Congr. Hydatidology. Madrid, 84-89.
28) Smyth, J., & Barrett, N. (1980). Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 74 (5), 649-652.
29) Goyal, N., Tiwari, R. P., & Shukla, G. (2011). Lactobacillus rhamnosus GG as an effective probiotic for murine giardiasis. Interdisciplinary perspectives on infectious diseases, 2011.
30) Al-Zubaidy, K. M. D. and M. A. Al-Falahy (2016), principle and procedures of statistics and experimental. Duhok University, press, Iraq.
31) Bajagai, Y. S., Klieve, A. V., Dart, P. J., & Bryden, W. L. (2016). Probiotics in animal nutrition: production, impact and regulation: FAO.
32) Holm, J. B., Sorobetea, D., Kiilerich, P., Ramayo-Caldas, Y., Estellé, J., Ma, T.,.. Svensson & Frej, M. (2015). PloS one, 10 (5), e0125495.
33) Dvorožňáková, E., Bucková, B., Hurníková, Z., Revajová, V., & Lauková, A. (2016). Veterinary Parasitology, 231, 69-76.
34) De Avila, L. d. C., de Leon, P., De Moura, M., Berne, M., Scaini, C., & Leivas Leite, F. (2016). Parasite Immunology, 38 (5), 326-330.
35) De Keersmaecker, S. C., Verhoeven, T. L., Desair, J., Marchal, K., Vanderleyden, J., & Nagy, I. (2006). FEMS Microbiology Letters, 259 (1), 89-96.
36) Cleusix, V., Lacroix, C., Vollenweider, S., & Le Blay, G. (2008). FEMS Microbiology Ecology, 63 (1), 56-64.
37) Travers, M.-A., Florent, I., Kohl, L., & Grellier, P. (2011). Journal of parasitology Research, (2011): 1-11.
38) Hayes, K., Bancroft, A., Goldrick, M., Portsmouth, C., Roberts, I., & Grencis, R. (2010). Science, 328 (5984), 1391-1394.
39) Dea-Ayuela, M. A., Rama-Iñiguez, S., & Bolás-Fernandez, F. (2008). International immunopharmacology, 8 (1), 28-35.
40) McClemens, J., Kim, J. J., Wang, H., Mao, Y.-K., Collins, M., Kunze, W. & Khan, W. I. (2013). Clin. Vaccine Immunol., 20 (6), 818-826.
41) Bär, A.-K., Phukan, N., Pinheiro, J., & Simoes-Barbosa, A. (2015). PLoS neglected tropical diseases, 9 (12), e0004176.
42) Zaiss, M., & Harris, N. (2016). Parasite immunology, 38 (1), 5-11.
43) Martínez-Gómez, F., Fuentes-Castro, B. E., & Bautista-Garfias, C. R. (2011). Parasitology Research, 109 (6), 1609-1617.
44) Temsahy, M. M. E., Ibrahim, I.R., Mossallam, S.F., Mahrous, H., Bary, A.A., &Salam, A.A.(2015). Veterinary Parasitology,214,3:303-314.
45) Martínez-Gómez, F., Santiago-Rosales, R., & Bautista-Garfias, C. R. (2009). Veterinary Parasitology, 162 (1-2), 171-175.
46) Basualdo, J., Sparo, M., Chiodo, P., Ciarmela, M., & Minvielle, M. (2007). Annals of Tropical Medicine & Parasitology, 101 (6), 559-562.
47) Chiodo, P. G., Sparo, M. D., Pezzani, B. C., Minvielle, M. C., & Basualdo, J. A. (2010). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 105 (5), 615-620.

Use of Lactobacillus rhamnosus GG Agaist Infection with Secondary Hydatid Disease in Swiss BABA/c Mice

ORIGINALITY REPORT

3%	3%	4%	2%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	www.frontiersin.org Internet Source	1%
2	www.parasite-journal.org Internet Source	1%
3	www.tandfonline.com Internet Source	1%
4	efsa.onlinelibrary.wiley.com Internet Source	1%

Exclude quotes	Off	Exclude matches	< 1%
Exclude bibliography	On		