

Karolina Kowalkowska¹, Anna Okulewicz^{1*}

Zakład Parazytologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski
ul. Przybyszewskiego 63-77, 51-148 Wrocław

Wpłynęło sierpniu 2012 r.

1. Wprowadzenie. 2. Jelitowa flora bakteryjna gryzoni. 3. Badania na zwierzętach doświadczalnych. 4. Podsumowanie

Interactions between intestinal microflora and parasites of rodents

Abstract: Natural intestinal microflora is a complex system of microorganisms providing homeostasis in the gastrointestinal tract of the host. Next to the bacterial commensals, there are other, larger and more hostile to the host organisms such as parasites. Laboratory rodent (mice and rats) may be contaminated with intestinal parasites, mainly pinworm species. Helminth parasites can alter the interpretation of final results. It is known that intestinal flora and parasites of animals may interact with each other, but the nature of those relationships is not fully investigated. Unfortunately, our state of knowledge does not allow to predict the direction of those interactions, hence it seems important to carry out further research on this issue. In this work, current results of experimental studies on interactions between intestinal microflora and parasites of rodents are presented.

1. Introduction. 2. Intestinal bacterial flora of rodents. 3. Studies in experimental animals. 4. Summary

Słowa kluczowe: flora jelitowa, pasożyty, nicienie, zależności, gryzonie konwencjonalne, germ-free, zwierzęta laboratoryjne
Key words: intestinal flora, parasites, nematodes, interactions, conventional rodents, germ-free, laboratory animals

1. Wprowadzenie

Gryzonie laboratoryjne – myszy, szczury, myszokoczek (gerbils), świnki morskie, bardzo często są wykorzystywane do badań eksperymentalnych. Według wykazu zwierząt laboratoryjnych hodowanych w Polsce [10] obecnie wiele szczepów gryzoni (wsobnych, kongenicznych, koizogenicznych, nie krewniaczych) jest obiektem badań immunologicznych, farmakologicznych, toksykologicznych, biochemicznych, biomedycznych, nad nowotworami i innych. W celach doświadczalnych powinny być wykorzystywane nie tylko zwierzęta zdrowe, ale również takie które nie są nosicielami zakażeń patogennych.

Aby uniknąć takich zagrożeń została opracowana, przy udziale WHO, FAO, ILAR, ICLAS, kategoryzacja zwierząt laboratoryjnych z podziałem na: gnotobiotyczne (wśród nich *germ-free*, monobionty, dibionty i polibionty); zwierzęta SPF (Specified Pathogen Free) i zwierzęta konwencjonalne (hodowle kontrolowane i otwarte) [3].

Zwierzęta konwencjonalne rzadko bywają badane w kierunku zarażenia pasożytami, których obecność może zmienić interpretację ostatecznych wyników badań eksperymentalnych [18]. Jak wykazały eksperytyzy w wielu hodowlach u myszy stwierdzone są przede wszystkim jelitowe nicienie, owsiki *Oxyuridae* z gatunków *Syphacia obvelata* i *Aspicularis tetraptera*, a u szczu-

rów *Syphacia muris*, rzadziej tasiemce [1, 17]. Niewielka intensywność inwazji pasożytów nie wywołuje na ogół objawów chorobowych u tych zwierząt i może nie wzbudzać niepokoju osób nadzorujących hodowle. Ustalono, że *Oxyuridae* mogą służyć jako biologiczne wskaźniki biologicznego zanieczyszczenia pomieszczeń dla zwierząt laboratoryjnych i ich występowanie (z wyszczególnieniem gatunków) powinno być wykazywane w sprawozdaniach z monitoringu ich zdrowia [23].

Pasożyty współwystępują w określonych odcinkach jelita (mikrohabitatach) z naturalną mikroflorą bakteryjną zwierząt. Mikroflora występująca na całej długości układu pokarmowego, oprócz wspomagania procesów trawiennych zachodzących w jelitach, jest także ważnym czynnikiem zapobiegającym bądź ograniczającym osiedlanie drobnoustrojów chorobotwórczych oraz organizmów pasożytniczych. Wysłano tezę, że zmieniony skład jakościowy i ilościowy flory bakteryjnej żywiciela może przyczynić się do nasilenia inwazji patogenów i zintensyfikowania objawów chorobowych.

2. Jelitowa flora bakteryjna gryzoni

Badania mikroflory jelitowej gryzoni zostały podjęte w latach 60. XX wieku przez zespół Russella W. Schaedlera [22]. Eksperymentalnie kolonizowano myszy laboratoryjne wybranymi szczepami

* Autor korespondencyjny: Zakład Parazytologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Wydział Nauk Biologicznych UWr, ul. Przybyszewskiego 63-77, 51-148 Wrocław; e-mail: anna.okulewicz@microb.uni.wroc.pl

bakterii, izolowanymi z mikroflory zwierząt pochodzących z konwencjonalnych hodowli. W ich wyniku wyizolowano 8 szczepów bakterii najczęściej zasiedlających jelita gryzoni. W skład mikroflory wg Schaedlera wchodziły: *Escherichia coli* var. *mutabilis*, *Streptococcus* (*Enterococcus*) *faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius*, *Streptococcus* z grupy N, *Bacteroides distasonis*, *Clostridium* sp., a także bakterie EOS – Extremely Oxygen Sensitive. W roku 1978 badacze z National Cancer Institute (NCI) dokonali weryfikacji składu flory opisanej przez Schaedlera i złożonej z 8 szczepów bakterii. Celem ich pracy było ujednoczenie mikroflory stosowanej do kolonizacji myszy gnotobiotycznych (germ-free). Autorzy [16] opracowali nową definicję mikroflory obecnie znaną jako „Zmieniona Flora Schaedlera” (ASF – Altered Schaedler Flora). W skład „Zmienionej Flory Schaedlera” (ASF) wchodzi 3 gatunki z pierwotnego zestawu: *Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius*, *Bacteroides distasonis* oraz szczególnie wrażliwe na tlen bakterie wrzecionowate (EOS), a także bakterie spiralne i 3 nowe szczepy niezwykle wrażliwych na tlen bakterii wrzecionowatych (EOS).

Na progu XXI wieku Dewhirst i wsp. [4] na podstawie sekwencji 16S rRNA chcieli przekonać się czy w skład mikroflory jelitowej gryzoni wchodzi te same szczepy które zostały zakwalifikowane jako „Zmieniona Flora Schaedlera” (ASF). Wykazano, że większość mikroflory jelit stanowią wrzecionowate bakterie lub stożkowate pałeczki określone jako niezwykle wrażliwe na tlen bakterie EOS – Extremely Oxygen Sensitive. Bakterie te przewyższają liczebnie bezwzględnie beztlenowce. Wielu bakterii EOS nie udało hodować *in vitro*, a jeszcze mniej z nich zostało zidentyfikowanych.

Również inni badacze, na przestrzeni lat, zajmowali się florą bakteryjną gryzoni wykazując że bezwzględnie beztlenowe bakterie stanowią co najmniej 99% flory jelitowej tych zwierząt. Według [6] są to głównie bakterie *Lactobacillus* sp., i *Bacteroides* sp. zaś inni badacze [7] wyizolowali z treści jelita grubego myszy laboratoryjnych dodatkowo bakterie z rodzajów: *Eubacterium* sp., *Fusobacterium* sp., *Peptostreptococcus* sp. i *Propionibacterium* sp. U innych gryzoni laboratoryjnych mikroflora jelitowa jest podobna. Według WORTHINGTONA i FULGHUMA [30] u myszokoczków występują bakterie z rodzajów: *Lactobacillus* sp. (najczęściej izolowany), *Bacteroides* sp., a także *Bifidobacterium* sp. i gatunki *Escherichia coli* oraz *Acinetobacter calcoaceticus*, zaś u szynszyli najczęściej identyfikowano bakterie z rodzajów *Bacteroides* sp., *Lactobacillus* sp. i *Bifidobacterium* sp.

Liczba mikroorganizmów w jelitach gryzoni jest ogromna. W 1 g treści jelita grubego myszy może wynosić od $4,4 \times 10^{10}$ do około 10^{11} bakterii [4, 7].

Tak duża liczba mikroorganizmów zapewnia intensywną działalność metaboliczną zwłaszcza w jelicie grubym zwierzęcia [11]. Mikroorganizmy te nie tylko

dostarczają niezbędnych substancji odżywczych (np. witaminy K) dla gospodarza, ale także chronią przed kolonizacją błon śluzowych przez drobnoustroje chorobotwórcze. Np. liczne badania wykazały zwiększoną podatność myszy laboratoryjnych pozbawionych bakterii na różne czynniki zakaźne w porównaniu do myszy z normalną florą [4]. Wyniki innych badań [5, 6] ujawniły, że flora bakteryjna jelit jest niezbędna do prawidłowego funkcjonowania układu pokarmowego, trawienia pokarmu a także kompetencji układu odpornościowego. Drobnoustroje pełnią również ważne funkcje metaboliczne, polegające na rozkładaniu obecnych w pożywieniu toksyn i karcynogenów.

3. Badania na zwierzętach doświadczalnych

Pod koniec lat 50. XX wieku podjęto również badania wzajemnych oddziaływań między pasożytami a florą jelitową zwierząt, głównie laboratoryjnych. Nieliczne prace dotyczyły eksperymentalnych zarażeń gryzoni patogennymi pierwotniakami. PHILLIPS I WOLFE [19] zaobserwowali że, u pozbawionych mikroflory jelitowej (gnotobiotycznych) świnek morskich, zarażonych pełzakiem czerwonki *Entamoeba histolytica* przebieg choroby jest łagodniejszy w porównaniu z osobnikami konwencjonalnymi. Lecząc monobiontów (zasiedlanych jednym gatunkiem bakterii), w zależności od użytych szczepów bakteryjnych, występowały objawy porównywalne do obserwowanych u zwierząt z pełną mikroflorą.

Zdecydowanie więcej prac opartych jest na zarażeniach doświadczalnych gryzoni laboratoryjnych pasożytniczymi helmintami, a zwłaszcza nicieniami. Jednymi z pierwszych którzy przystąpili do badań dotyczących oddziaływań między pasożytami a florą jelitową gryzoni byli polscy badacze – Zdzisław PRZYJAŁKOWSKI i Witold STEFAŃSKI. Ich działalność przypadła na lata 60. i 70. ubiegłego wieku, a prace oparte były w dużej mierze na eksperymentalnych zarażeniach myszy i szczurów nicieniami *Aspicularis tetraptera* i *Trichinella spiralis* [20, 21, 24]. W prowadzonych doświadczeniach autorzy wykazali, że naturalna flora bakteryjna jelit wpływa korzystnie lub jest wręcz niezbędna do rozwoju inwazji pasożytniczych nicieni. W wyniku eksperymentów wykazali m.in. konieczność obecności prawidłowej flory jelitowej podczas zarażenia owsikiem *A. tetraptera* [25].

Także wpływ prawidłowej mikroflory jako czynnika stymulującego do osiedlenia się pasożytów i ich rozwoju w jelicie żywiciela wykazały doświadczenia przeprowadzane w tym okresie przez WESCOTTA [26, 28]. Prace autora opierały się na obserwacjach zależności między obecnością bakterii a rozwojem i lokalizacją nicienia *Nippostrongylus brasiliensis* u myszy. *N. brasiliensis* jest kosmopolitycznym pasożytem szczurów i myszy, który

usadawia się na nabłonku śluzówki jelita, pomiędzy kosmkami. Do zarażenia nowych osobników dochodzi poprzez larwy inwazyjne (L3), które żyją w kale zakażonych gryzoni i odżywiają się występującymi tam bakteriami [29]. Larwy te wnikają do żywiciela przez skórę lub *per os*. Cykl życiowy pasożyta obejmuje wędrówkę przez płuca i końcową lokalizację w obrębie jelita cienkiego w ciągu około tygodnia od momentu wniknięcia larw. W wyniku przeprowadzonego doświadczenia więcej larw *N. brasiliensis* znaleziono w płucach myszy konwencjonalnych niż u myszy *germ-free* zarówno po 48 h jak i 8 dniach od infekcji [26]. Podobne zależności zaobserwowano wcześniej [14] u eksperymentalnie zarażonych tym pasożytem świnek morskich. Również tutaj zanotowano większą liczbę larw wędrujących nicienia u zwierząt z normalną florą jelitową niż u świnek gnotobiotycznych. Także w trakcie dalszej wędrówki tego nicienia w organizmie myszy z pełną florą bakteryjną w jelitach rozwinęło się więcej dorosłych osobników niż u myszy bezbakteryjnych.

Lepszym modelem wydają się być pasożyty, których cykl rozwojowy odbywa się wyłącznie w obszarze układu pokarmowego i charakteryzuje się dłuższą przeżywalnością, stąd w dalszych doświadczeniach jako modelu użyto [27] nicienia *Nippostrongylus dubius*. Larwy tego pasożyta nie wędrują przez płuca, lecz krótko po rozpoczęciu inwazji wnikają w śluzówkę by po okresie około tygodnia przedostać się z powrotem do światła jelita. U zwierząt zarażanych *per os* dorosłe osobniki pasożyta uzyskiwały dojrzałość po 10 dniach od zarażenia a inwazja utrzymywała się do 4 miesięcy. Pierwsze obserwacje wykazały, że larwy *N. dubius* rozwijały się w osobniki dorosłe mniej licznie u myszy bezbakteryjnych niż konwencjonalnych. Dodatkowo pasożyty izolowane z jelit myszy *germ-free* osiągały mniejsze wymiary i zawierały mniejszą liczbę jaj. Dalsze badania wykazały zmiany patologiczne (obecność guzków) w jelitach obu grup myszy, które jednak zaczęły zanikać po około tygodniu u myszy z normalną florą jelitową, u pozostałych gryzoni utrzymywały się przez ponad 60 dni.

Podobne wnioski można wysnuć na podstawie późniejszych badań [13], w których wykorzystano węgorzki *Strongyloides venezuelensis* w eksperymentalnych zarażeniach gryzoni. Na podstawie analiz parazytologicznych (określenie liczby pasożytów w jelitach) i histopatologicznych (zmiany morfologiczne) badacze wykazali większą inwazyjność tego nicienia u myszy gnotobiotycznych niż u myszy konwencjonalnych. Wyniki te wskazują że ekosystem bakterii jelitowych wpływa na przebieg infekcji *S. venezuelensis* a dodatkowe podawanie antybiotyków gryzoniom może pogłębić patogenność nicienia poprzez redukcję flory jelitowej.

Jednak w niektórych przypadkach mikroflora przewodu pokarmowego wydaje się być obojętna w osiedlaniu, rozwoju i egzystencji pasożytów, co wykazano na

przykładzie tasiemców *Hymenolepis diminuta*. Pasożyty te żyją w świetle jelita, a sposób ich odżywiania nie jest związany z penetracją śluzówki jelit, rozwijają się równie dobrze zarówno u myszy i szczurów bezbakteryjnych, jak i konwencjonalnych [9].

Szereg prac dotyczy stymulującego lub hamującego działania monokultur bakterii na jelitowe pasożyty wewnętrzne – głównie nicienie. Przyjałkowski [21] doświadczalnie wykazał, że *Staphylococcus epidermidis* hamuje rozwój włośni *Trichinella spiralis* a stymulujący wpływ na jego rozwój mają bakterie Gram-ujemne *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Proteus* sp.

W innych eksperymentach [12] wykazano, że w obecności bakterii z grupy *Bacillaceae* samice nicienia jelitowego *Heligmosomoides polygyrus* pasożytujące u gryzoni produkują martwe, zdeformowane jaja z nie wykształconą larwą. Dodatkowo u dorosłych samic nicieni w części głowowej i w okolicy wulwy zaobserwowano anomalie w budowie oskórka. Zmiany te powiązano z wydzielaniem przez bakterie m.in. chitynazy oraz brakiem prawidłowej flory bakteryjnej u myszy *germ-free* mogących neutralizować niekorzystny wpływ *Bacillaceae* na rozwój nicieni.

Doświadczenia przeprowadzane na gryzoniach bezbakteryjnych monobiontycznych, zasiedlonych jednym gatunkiem – *Bacillus mesentericus*, *Pseudomonas aeruginosa* lub *Lactobacillus* sp. i zarażonych nicieniami *Nippostrongylus dubius* ujawniły, że w jelitach takich zwierząt rozwijało się więcej dojrzałych form pasożyta niż u myszy *germ-free*, lecz mniej niż u gryzoni konwencjonalnych [2]. W jelitach myszy zarażonych bakteriami z rodzaju *Lactobacillus* sp. obserwowano mniej zmian patologicznych w postaci guzków, a dorosłe samice nicienia były bardziej płodne (zawierały więcej jaj) w stosunku do pasożytów uzyskanych z myszy bezbakteryjnych. Stąd wniosek, że ten rodzaj bakterii ma znaczący wpływ na kształtowanie się układu pasożyt-żywiciel, gdyż stymuluje rozwój inwazji pasożytniczych.

Także doświadczenia przeprowadzone na modelu mysim z użyciem włośni *Trichinella spiralis* wykazały, że dorosłe postacie pasożyta występowały liczniej u gryzoni z pełną florą jelitową niż u gryzoni zarażonych tylko jednym gatunkiem bakterii – *Pseudomonas aeruginosa* [21].

Z nowych badań [8] wynika że niektóre gatunki bakterii wydają się być wręcz niezbędne do przebiegu inwazji pasożytniczej. Autorzy badali *in vitro* wpływ obecności żywych i martwych bakterii *Escherichia coli* na zdolność rozwoju larw włośnogłówki mysiej *Trichuris muris*. W zaprojektowanym doświadczeniu inkubowali jaja tego nicienia w treści jelitowej pochodzącej z jelita ślepego myszy oraz, aby określić znaczenie bakterii w procesie wylęgania, jaja inkubowano także w monokulturze *E. coli*. W obu próbach uzyskano zbliżone wyniki – podobna liczba larw nicienia wylęgła się w obecności pełnej flory jelitowej jak i w przypadku

kontaktu z samymi pałeczkami okrężnicy. Wylęganie larw następowało tylko w temperaturze 37°C, sugerując tym samym istotny wpływ tego czynnika na rozwój pasożyta, prawdopodobnie chroniący w ten sposób larwy przed opuszczaniem osłonek jajowych w środowisku zewnętrznym. Istotną częścią doświadczenia było również stwierdzenie czy do wylęgu larw włosogłówki niezbędne są żywe bakterie czy tylko struktury tych mikroorganizmów. Ostatecznie wykazano, że więcej larw włosogłówki wylęgło się w obecności żywych bakterii *E. coli* niż w obecności bakterii zabitych przez wysoką temperaturę. Badacze tym samym dowiedli, że komunikacja i oddziaływanie między organizmami opierają się na kontakcie żywych organizmów a nie na działaniu neuroprzekazników bądź wyłącznie obecności struktur komórkowych bakterii i pasożyta.

Cytowane wyżej wyniki badań uwidoczniły wpływ pełnej mikroflory, bądź poszczególnych bakterii na rozwój pasożytów jelitowych u gryzoni laboratoryjnych. Natomiast badania autorów brazylijskich [15] dotyczą drugiego aspektu – wpływu nicieni *Angiostrongylus costaricensis* na stan endogennej flory jelitowej. U eksperymentalnie zarażonych myszy szczepu Swiss Webster tymi pasożytami, które zasiedlają tylne odcinki jelita, znacząco wzrosła liczba jelitowych bakterii tlenowych – w jelicie krętym z $4,4 \times 10^7$ do $1,7 \times 10^8$. Podczas gdy beztlenowce z rodzaju *Peptostreptococcus* w okrężnicy zarażonych zwierząt osiągnęły wartość $7,5 \times 10^8$ a w grupie kontrolnej było ich $1,5^9$. Badacze sugerują, że takie zmiany jelitowej mikroflory u myszy pod wpływem zarażenia nicieniami mogą pomóc w rozwiązywaniu problemów w niektórych infekcjach bakteryjnych także u ludzi.

4. Podsumowanie

Wpływ bakterii na osiedlanie i rozwój pasożytów jest faktem niezaprzeczalnym, podobnie jak niejednostronność tych relacji. Dotychczasowe wyniki badań wskazują, że rola naturalnej flory bakteryjnej w regulacji układu pasożyt-żywiciel kształtuje się w sposób zróżnicowany. Na ogół ma wpływ stymulujący na rozwój pasożytów, jednak czasami jej obecność nie ma żadnego znaczenia. Wykazano również że monokultury poszczególnych bakterii mogą mieć dodatni lub hamujący wpływ na helminty jelitowe, a głównie nicienie. Badania wykazały także, że inwazja pasożytnicza rozwijająca się w jelicie żywiciela powoduje zmiany ilościowe bakterii bytujących we wspólnym mikrohabitażu.

Niestety współczesny stan wiedzy nie pozwala przewidzieć kierunku interakcji danego gatunku mikroorganizmu i organizmu pasożytniczego oraz efektu tego związku na organizm żywiciela, stąd tak ważnym wydaje się prowadzenie dalszych badań nad tym zagad-

nieniem. Znajomość poszczególnych oddziaływań być może pozwoli w przyszłości na bardziej skuteczną walkę zarówno z pasożytami zwierząt jak i człowieka.

Piśmiennictwo

- Bazzano T., Resettel T.I., Pinto R.M., Gomes D.C.: Patterns of infection with the Nematodes *Syphacia obvelata* and *Aspicularis tetraptera* in conventionally maintained laboratory mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)*, **97**, 1–5 (2002)
- Chang J., Wescott, R.B.: Infectivity, fecundity, and survival of *Nematospiroides dubius* in gnotobiotic mice. *Exp. Parasitol.* **32**, 327–334 (1972)
- Czarnowska A., Brylińska J.: Nazewnictwo najczęściej używanych modeli zwierząt laboratoryjnych. W: *Zwierzęta Laboratoryjne Hodowane Ośrodkach naukowych w Polsce. Wykaz VII. Zakład Genetyki i Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych. Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Warszawa 2010*
- Dewhirst F.E., Chien Ch., Paster B.J., Ericson R.L., Orcutt R.P., Schauer D.B., Fox J.G.: Phylogeny of the Defined Murine Microbiota: Altered Schaedler Flora. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3287–3292 (1999)
- Dibaise J.K., Zhang H., Crowell M.D., Kraimalik-Brown R., Decker G.A., Bruce E.P.: Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clinic Proc.* **83**, 460–469 (2008)
- Foo M. C., Lee A.: Immunological response of mice to members of the autochthonous intestinal microflora. *Infect. Immun.* **6**, 525–532 (1972)
- Harris M.A., Reddy C.A., Carter G.R.: Anaerobic bacteria from the large intestine of mice. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**, 907–912 (1976)
- Hayes K.S., Bancroft A.J., Goldrick M., Portsmouth C., Roberts I.S., Grecis R. K.: Exploitation of the Intestinal Microflora by the Parasitic Nematode *Trichuris muris*. *Science*, **328**, 1391–1394 (2010)
- Houser B.B., Burns W.C.: Experimental infection of gnotobiotic *Tenebrio molitor* and white rats with *Hymenolepis diminuta* (Cestoda: Cyclophyllidae). *J. Parasitol.* **54**, 69–73 (1968)
- Krysiak E., Unrug-Bielawska K.: *Zwierzęta Laboratoryjne Hodowane Ośrodkach naukowych w Polsce. Wykaz VII. Zakład Genetyki i Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych. Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Warszawa 2010*
- Lenoir-Wijnkoop I., Hopkins M.: The intestinal microflora. Understanding the symbiosis. 6–10 (2003)
- Lewis J.W., Mathers P.D.: The microbial environment and intestinal nematode infections of *Heligmosomoides polygyrus* in laboratory mice. *Lab. Anim.* **22**, 109–116 (1988)
- Martins W.A., Melo A.L., Nicoli J.R., Cara D.C., Carvahlo M.A.R., Lana M.A., Vieira E.C., Farias L.M.: A method of decontaminating *Strongyloides venezuelensis* larvae for the study of strongyloidiasis in germ-free and conventional mice. *J. Med. Microbiol.* **49**, 387–390 (2000)
- Newton W.I., Weinstein P.P., Jones M.F.: A comparison of the development of some rat and mouse helminths in germfree and conventional guinea pigs. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **78**, 290–307 (1959)
- Nobre V., Serufo J.C., Carvalho O.S., Gomes C.L., Mendonca F., Santos S.G., Mota E.M., Gomes D., Braga E., Antunes C.M.F., Lenzi H.L., Lambertucci J.R.: Alteration in the Endogenous Intestinal Flora of Swiss Webster Mice by Experimental *Angiostrongylus costaricensis* Infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro)*, **99**, 717–720 (2004)

16. Orcutt R.P., Gianni F.J., Judge R.J.: Development of an „Altered Schaedler Flora” for NCI gnotobiotic rodents. *Microecol. Ther.* **17**, 59 (1987)
17. Pacoń J., Piekarska J.: Pasożyty myszy w wybranych hodowlach zwierząt laboratoryjnych. *Wiad. Parazytol.* **50**, 93–94 (2004)
18. Perc-Matysiak A., Okulewicz A., Hidebrand J., Zaleśny G.: Helminth parasites of laboratory mice and rats. *Wiad. Parazytol.* **52**, 99–102 (2006)
19. Phillips B.P., Wolfe P.A.: The use of germfree guinea pigs in studies on the microbial interrelationships in amoebiasis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **78**, 308–314 (1959)
20. Przyjałkowski Z.: Badania nad osiedlaniem *Aspicularis tetraptera* Nitzsch 1821 (Nematoda, Oxyuridae) u myszy bezbakteryjnych, *Acta Parasitol. Pol.* **20**, 389–395 (1972)
21. Przyjałkowski Z.: Effect of intestinal bacteria on the host response in *Trichinella spiralis* infection. *Acta Parasitol. Pol.* **25**, 287–292 (1978)
22. Schaedler R.W., Dubos R., Costello R.: The development of the bacterial flora in the gastrointestinal tract of mice. *J. Exp. Med.* **122**, 59–66 (1965)
23. Shibahara T.: Necessity of reexamining the pathogenicity and elimination of parasites in rats and mice. Microbial status and genetic evaluation of mice and rats. Proc. of the 1999 US/Japan Conference: 21–26 (1999)
24. Stefański W., Przyjałkowski Z.: Badania nad układem włóśnie-bakterie w przewodzie pokarmowym myszy. *Wiad. Parazytol.* **10**, 295–298 (1964)
25. Stefański W.: Flora bakteryjna jako jeden z czynników wpływających na osiedlenie się pasożytów w jelitach ich żywicieli. *Acta Parasitol. Pol.* **12**, 1–6 (1965)
26. Wescott, R.B., Todd A. C.: A comparison of the development of *Nippostrongylus brasiliensis* in germ-free and conventional mice. *J. Parasitol.* **50**, 138–143 (1964)
27. Wescott R.B.: Experimental *Nematosprioides dubius* infection in germfree and conventional mice. *Exptl. Parasitol.* **22**, 245–249 (1968)
28. Wescott R.B.: Metazoa-Protozoa-Bacteria Interrelationships. *Am. J. Clin. Nutr.* **23**, 1502–1507 (1970)
29. Weinstein P.P.: Vitamin B₁₂ changes in *Nippostrongylus brasiliensis* in its free-living and parasitic habitats with biochemical implications. *J. Parasitol.* **82**, 1–6 (1996)
30. Worthington J.M., Fulghum R.S.: Cecal and fecal bacterial flora of the Mongolia gerbil and the chinchila. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1210–1215 (1988)