

SPESİFİK PATOJEN FREE (SPF) FARE ÜRETME ÇALIŞMASI

İlhan BOZYİĞİT¹Özcan ÖZKAN¹Hülya BELEN¹Toshima NOBUNAGA²

ÖZET

Günümüzde laboratuvar hayvanları üzerinde yapılan *in vivo* test sonuçlarının geçerli ve güvenilir kabul edilebilmesi için deney hayvanlarının belli standartta olması gerekmektedir. Bu çalışmada, basit bir izolatör kullanarak konvansiyonel *Swiss albino* fare soyundan Spesifik Patogen Free fare üretimi için bir çekirdek koloni oluşturulması amaçlanmıştır.

Konvansiyonel olarak yetiştirilmekte olan bir *Swiss albino* fare soyundan 33 adet gebe dişiye histerektomi uygulanarak yavrulu uteruslar alınmış ve patojen mikroorganizmalardan arınmış izolatöre aseptik koşullarda aktarılmıştır. İzolatör içinde uterusdan çıkarılan yavrular, Spesifik Patogen Free C57BL/6 inbred farelerden oluşturulan sütanneler tarafından emzirilmiştir. Bu yavrulardan 178 adedi süt kesim çağında izolatörde bırakılarak, bakım ve beslenmeleri izolatör içinde sürdürülmüştür.

Sonuç olarak, 4 haftalık dönemde yapılan kontrollerde *Swiss albino* farelerin Spesifik Patogen Free özellik kazandıkları ve 10 haftalık dönemde de bu özelliklerini korudukları görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Fare; Spesifik Patogen Free

STUDY OF BREEDING SPECIFIC PATHOGEN FREE (SPF) MICE

SUMMARY

Laboratory animals should have certain qualifications in order that tests carried out them give valid and acceptable results. This study aimed to obtain a nucleus colony from conventional *Swiss albino* mice for SPF mice production in a simple isolator.

From a conventionally-bred *Swiss albino* line 33 pregnant mice were hysterectomized and uteruses containing the fetuses were aseptically transferred to a pathogen-free isolator. Baby mice were taken out from the uteruses in the isolator and were suckled by foster mother consisting of Specific Pathogen Free C57BL/6 inbred mice. One hundred and seventy eight of these baby mice were left in the isolator at weaning age and their feeding and care were carried out in the isolator.

In conclusion, controls at 4th week of age revealed that *Swiss albino* mice acquired SPF feature and at 10th week this feature persisted.

Key Words: Mice; Specific Pathogen Free

GİRİŞ

Deneyel çalışmalarda kullanılan hayvan gruplarındaki bireysel farklılıklar elde edilen sonuçların doğruluğu konusunda sıkıntılar yaratmaktadır. Çalışmaların sonuçlarının sağlıklı olması öncelikle yeteri sayıda, genetik ve sağlık özellikleri tanımlanmış bir örnek (yaş, cinsiyet, ırk)

hayvanların kullanılmasına bağlanmıştır (1).

Deneylerde kullanılan hayvanların çoğu hijyenik bakımdan kontrolsüz bir çevreden gelmekte ve bu tür hayvanlar konvansiyonel olarak adlandırılmaktadır. Bu durumda hayvanlarda her zaman saptanan bir mikroflora ve faunaya

¹Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı

²Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı-JICA

Yazışma adresi: Özcan ÖZKAN, Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı, Zehir Araştırmaları Müdürlüğü, Sıhhiye /ANKARA
e-posta: ozcanozkan_62@hotmail.com Tel: +90 312 435 56 80 /1505

rastlanabilir (2). Klinik semptom gösteren hastalıklara veya latent enfeksiyona sahip hayvanların deneylerde kullanılmasının, deney sonuçlarını önemli ölçüde etkilediği, tıbbi araştırmalarda kullanılacak hayvanların hastalıklardan arındırılmış ve/veya mikrobiyolojik yönden tanımlanmış olması gerektiği bildirilmiştir (2-4).

Özellikle biyolojik ürünlerin kalite kontrolü ve kapsamlı bir ulusal kontrol amacıyla Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) teknik raporlarında belirtilen bütün hayvan testlerinin yürütülmesi ancak iyi kalitede tanımlanmış laboratuvar hayvanlarının varlığı ile mümkün olacaktır (1). Bu nedenle *in vivo* test materyali olarak kullanılacak hayvanların bakımı ve gözlenmesi için gerek duyulan optimum koşulların sağlanması gerekmektedir. Bu da veteriner hekimlik içinde laboratuvar hayvanları bilimi olarak adlandırılan bir uzmanlık alanının gelişimine yol açmıştır (5).

Türkiye’de biyolojik madde üretiminde ve kontrolünde ya da denemelerde kullanılan hayvanların, bilimsel kayıtlarının ve istatistik verilerinin bulunmadığı bildirilmiştir (1). Bu gelişmeler doğrultusunda Türkiye’nin başlıca biyolojik ürünler ulusal kontrol merkezi olan Refik Saydam Hızlısıhha Merkez Başkanlığı’nda (RSHMB) bir Spesifik Pathogen Free (SPF) fare üretim çalışması uygun görülmüştür.

Bu çalışmada, basit bir izolator kullanarak konvansiyonel *Swiss albino* fare soyundan SPF fare üretimi için çekirdek bir koloni oluşturulması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Donör hayvanlar

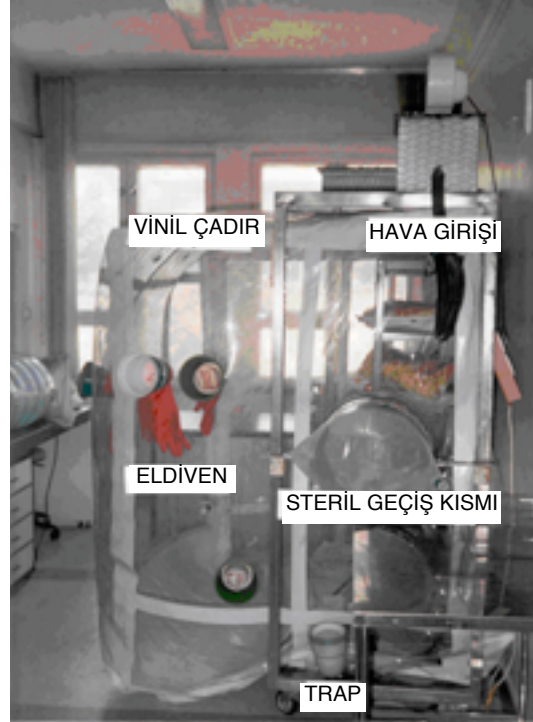
1993 yılından beri RSHMB Biyolojik Kontrol Laboratuvarında aile sistemiyle üretilen, gebeliğin 18–19. gününde olan 33 adet *Swiss albino* dişi fare kullanılmıştır.

Sütanneler

İsviçre’den (RCC Ltd. Biotechnology & Animal Breeding Division, Switzerland) alınan 8 adet dişi, 2 adet erkek 9–10 haftalık SPF C57BL/6 inbred fare ırkı kullanılmıştır.

İzolator

Trexler film izolatorü (7,9) modifiye edilerek saydam PVC’den (1780 x 1300 x 1680 mm) izolator yapılmıştır. İzolator, paslanmaz çelik stand (1780 x 760 x 1710 mm) içerisine yerleştirilmiştir (Resim 1,2).



Resim 1. PVC İzolator

Malzeme geçiş kanalı (Steril lock)

İzolator içerisine malzemelerin (steril / kirli; yem, su, yataklık v.b) giriş - çıkışı için, 370 mm çapında alüminyum silindirik su tankı kullanılmıştır. Kanalın açık kısımları saydam vinil poşetle kapatılmıştır. Dış açıklığını kapatan vinil poşette dezenfeksiyon kapağı olarak da tabanı kesilmiş fotoğraf film kutusu kullanılmıştır (Resim 1,2).

Kolluklar

İzolator içerisindeki çalışmaların yapılması için 155 mm çapında tabanı kesilmiş çiçek saksısına monte edilen bulaşık eldiveni

kullanılmıştır. Yapılan iki çift kolluk, saksı kısmından izolatöre vinil bant ile sabitlenmiştir.

Uterus nakil kanalı (Germicidal trap)

Uterusun patojenlerden arınmış izolatör içerisine geçirilmesinde, bir açıklığı izolatör içerisindedir, diğer açıklığı ise dışarıda olmak üzere "U" şeklinde 100 mm çapında atık su borusu kullanılmıştır (Resim 3). Kanalın içerisindedir izolatörün kontamine olmasını engellemek için dezenfektan olarak %5'lik sodyum hipoklorit kullanılmıştır.

İzolatörün havalandırılması

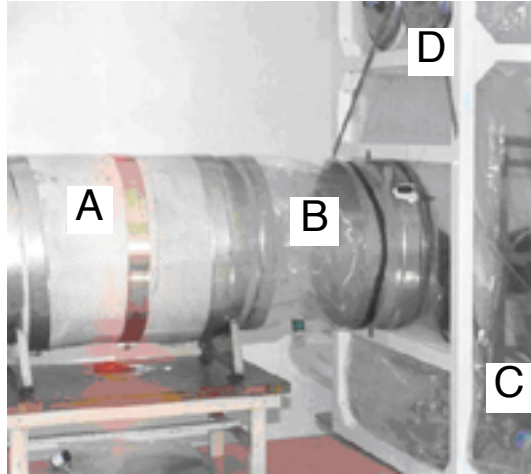
Hava sirkülasyonunun ve pozitif basıncın sağlanması için paslanmaz çelik kutu (290 x 400 x 280 mm) üstüne monte edilmiş körüklü hava motoru (190W- 0.95) kullanılmıştır.

Hava giriş filtresi

Paslanmaz çelik kutu içerisine, iç kısma 4 kat cam elyaf, dış tarafa da bir kat aspiratör filtresi yerleştirilmiştir.

Hava çıkış filtresi

Hava giriş düzeneğine benzer şekilde 3 kat cam elyaf, bir kat aspiratör filtresi kullanılmıştır. İzolatöre hava bağlantılarında 40 mm çaplı polietilen spiral tüpten yararlanılmıştır .



Resim 2. A-Steril malzeme nakil tankı, B-Steril malzeme geçiş kanalı, C-PVC İzolatör, D- Havalandırma

İzolatör dezenfeksiyon kapağı

Çalışma öncesi izolatörün dezenfeksiyonunu korumak için tabanı kesilmiş fotoğraf film kutusu kullanılmıştır.

Steril malzeme tankı

Hayvanların bakım ve beslenmesini sağlayacak malzemenin steril edilerek aseptik şekilde izolatör içerisine naklini sağlamak için 370 mm çapında ve orta kısmı sekiz kat cam elyaf filtreli alüminyum silindirik su tankından yararlanılmıştır (Resim 2).

İzolatör yapımındaki tüm montajlarda (eldiven, malzeme geçiş kanalı, uterus nakil kanalı, hava tüpleri, dezenfeksiyon kapakları) selofan, filament ve vinil bantlar kullanılmıştır.

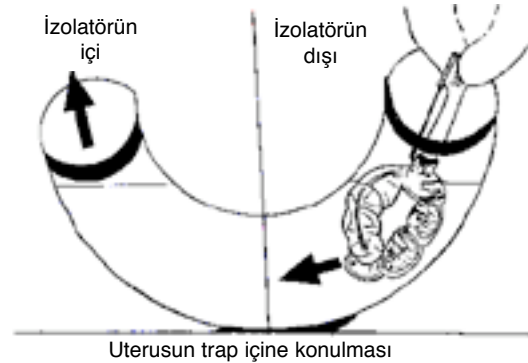
İzolatörün çalışma için hazırlanması

İzolatör içerisindedir hava sirkülasyonunu ölçmek için bir anometre, iç basıncı ölçmek için de 6 mm çapında içi su dolu sifon hortum kullanılmıştır. İzolatör ve polikarbonat kafeslerin dezenfekte edilmesi amacıyla %37 formaldehit solüsyonu 1/5 oranında sulandırılmış, her m³ hacime 5 mL olacak şekilde püskürtülmüştür. Püskürtmeden 24 saat sonra izolatör 72 saat süreyle havalandırılmıştır. Steril malzeme geçiş kanalının dezenfeksiyonunda yine püskürtme yöntemi uygulanmış, bu amaçla 1/400 oranında sulandırılmış sodyum hipoklorit kullanılmıştır. Sistem 40 dakika süreyle dezenfektanın etkisine bırakılmıştır. Mikrobiyolojik kontrol için izolatör, kafesler ve steril malzeme geçiş kanalından eküvyon çubukları ile örnekler alınarak laboratuvarda hazırlanan kanlı agara ekim yapılmıştır. Sonuçlar inkübasyondan, 24–48 saat sonra değerlendirilmiştir.

Hayvanların izolatör içerisindedir bakım ve beslenmeleri için kullanılan yataklık (talaş), polikarbonat su şişeleri (300 mL), yem ve su 121°C de 15 dakika otoklavlanarak çalışma öncesi izolatör içerisine yerleştirilmiştir. Sterilizasyon kontrolünde indikatör banttandır (sussex autoclave tape) yararlanılmıştır.

Sütannelerin izolatöre transferi ve hazırlanması

Filtreli nakil kafesleri 1/400 oranında sulandırılmış sodyum hipoklorit püskürtüldükten sonra 40 dakika bekletilerek dezenfekte edilmiş ve steril malzeme geçiş kanalından izolatöre sokulmuştur. İzolatörde her kafese bir süt anne yerleştirilmiş ve ortama uyumlarını sağlamak amacıyla 30 gün süreyle beklenmiştir. C57BL/6 SPF sütanne fareler, 4 dişi, 1 erkek olacak şekilde iki grup oluşturulmuştur. Konvansiyonel donör hayvanlar ise bire bir çiftleştirilerek, her iki fare grubunun da gebe kalmaları sağlanmıştır. Bütün hayvanların gebelik kontrolleri vaginal tıpayla (vaginal plug) bakılarak değerlendirilmiş, pozitif kabul edilenler gruptan alınarak faklı kafeslere yerleştirilmiştir. Çalışma süresince SPF hayvanlar, $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ve $\%60 \pm 10$ nisbi nemli izolatör ortamı içinde otoklavlanmış su ve ticari pelet fare yemi ile *ad libitum* beslenmiştir. Konvansiyonel donör hayvanlar da aynı koşullardaki üretim ünitesinde normal su ve ticari pelet fare yemi ile *ad libitum* beslenmiştir.



Resim 3. Yavrulu uterusun Germicidal trap içerisinde izolatöre alınışı

Histerektomi

Foster (1962,1980), tarafından tanımlanan yönetime göre gebeliğin 18–19. gününde olan 33 adet gebe *Swiss albino* fareye histerektomi uygulanmıştır (8–11).

SPF kontrolü

Damızlık SPF fare kolonisi her testteki patojen mikroorganizmalar ve parazitler yönünden örnek büyüklüğü ortalama 10 olacak şekilde, 4. ve 10. haftalık dönemlerde incelenmiştir. SPF kontrolü için Mouse Hepatit Virus (MHV), Sendai virus (SV), *Mycoplasma pulmonis*, *Bacillus piliformis* (ELISA-Monilisa IV A Kiti), *Escherichia coli* 0115a, *Bardotella brochiseptica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella pneumotropica*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium kutscheri*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Proteus spp.*, (Kültür) ve parazit araştırılmış ve Tablo 1'de bildirilen yöntemler kullanılmıştır.

Tablo 1. SPF kontrolünde incelenen patojenler ve uygulanan yöntem

PATOJEN ETKEN	YÖNTEM
HVJ(SV)	ELISA*
MHV	ELISA
<i>M.pulmonis</i>	ELISA
<i>B.piliformis</i> (Tyzzer's)	ELISA
<i>Salmonella spp.</i>	Kültür
<i>E.coli</i> 0115a	Kültür
<i>B.broncheceptica</i>	Kültür
<i>P.aeruginosa</i>	Kültür
<i>P.pneumotropica</i>	Kültür
<i>C.kutscheri</i>	Kültür
<i>Shigella spp.</i>	Kültür
<i>S.pneumoniae</i>	Kültür
<i>K.pneumoniae/oxytoca</i>	Kültür
<i>Proteus spp.</i>	Kültür
<i>S.aureus</i>	Kültür
Ekto parazit	Selofanbant / stereomikroskop
Endo parazit	Dışkı / mikroskop

MHV : Mouse Hepatit Virus,
 HVJ (SV) : Hemagglutinating Virus of Japan- Sendai Viruse
 *:ELISA : Monilisa IV A kiti

BULGULAR

İzolatör içi hava sirkülasyonunun $900 \text{ m}^3/\text{saat}$, iç basıncın da 150–200 mm su basıncı olduğu belirlenmiştir. Kullanılan gereçlerin ve yapılan izolatörün mikrobiyolojik testlerinde incelenen patojen mikroorganizmaların üremediği saptanmış ve sterilizasyonun başarılı olduğu anlaşılmıştır.

Bu çalışmada, histerektomi ile 33 adet gebe *Swiss albino* fareden 452 adet yavru alınmış, solunumu başlamış, pembe renkli ve hareketli olan 415 adet yavru yaşamıştır. Yaşayan yavru-lardan 263 adedinin SPF C57BL/6 sütanne ile beslenmesi sağlanmıştır. Sütanne tarafından red edilmeden emzirilen 178 adet yavru 21 gün sonra sütten kesilmiştir. Sütten kesilen fareler, SPF üretim ünitesine nakil öncesine kadar, erkek ve dişi olarak ayrı kafeslerde, izolatör içerisinde 15 hafta süresince pelet fare yemi ile *ad libitum* beslenmiştir.

Bu çalışma sonunda, 4 ve 10 haftalık *Swiss albino* farelerin SPF kontrol testleri sonunda elde edilen bulgular, Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. 4. ve 10. haftada SPF kontrol test sonuçları

PATOJEN ETKEN	SONUÇLAR	
	4. hafta	10. hafta
HVJ(SV)	Negatif	Negatif
MHV	Negatif	Negatif
<i>M.pulmonis</i>	Negatif	Negatif
<i>B.pilliformis</i> (Tyzzer's)	Negatif	Negatif
<i>Salmonella spp.</i>	Negatif	Negatif
<i>E.coli</i> 0115a	Negatif	Negatif
<i>B.broncheceptica</i>	Negatif	Negatif
<i>P.aeruginosa</i>	Negatif	Negatif
<i>P.pneumotropica</i>	Negatif	Negatif
<i>C.kutscheri</i>	Negatif	Negatif
<i>Shigella spp.</i>	Negatif	Negatif
<i>S.pneumoniae</i>	Negatif	Negatif
<i>K.pneumonia/oxytoca</i>	Negatif	Negatif
<i>Proteus spp.</i>	Negatif	Negatif
<i>S.aureus</i>	Negatif	Negatif
Ekto parazit	Negatif	Negatif
Endo parazit	Negatif	Negatif

TARTIŞMA VE SONUÇ

Latent enfeksiyona sahip hayvanların, deney sonuçlarına olan olumsuz etkileri SPF hayvan-ların kullanımı ile ortaya konulmuştur (3,4). SPF'lerle konvansiyonel koloniler arasında enfeksiyon ve etkenlere duyarlılık yönünden önemli fark olmamasına karşın, SPF farelerde

nedeni belirlenemeyen ölümlerin daha az görüldüğü, üreme oranının yüksek ve uzun süren deneylerde daha üstün olduğu bildirilmiştir (1,2). Bleby (1979) SPF kedilerin üreme performansının konvansiyonel olanlara oranla daha üstün olduğunu ve sütten kesilme öncesi yavru kayıplarının oldukça az olduğunu kaydetmiştir (6).

Bu çalışmada, biyomedikal araştırmalarda ve biyolojik ürünlerin kalite kontrol testlerinde *in vivo* test materyali olarak kullanılan *Swiss albino* fare soyunun SPF'leştirilmesi hedeflenmiştir. 4. ve 10. haftalarda yapılan SPF kontrol sonuç-larının olumlu olduğu gözlenmiş ve fareler *in vivo* çalışmalar için uygun olarak değerlendirilmiştir.

Gnotobiyotik teknikle, mikrobiyolojik yönden tanımlanmış hayvanların üretilmesi için mikro-biyolojik geçirgenliği olmayan esnek film bariyer (İzolatör) sistemi Reyniers ve Trexler (1983) tarafından tanımlanmıştır (7-9). Basit olarak esnek plastik (PVC, vinil, naylon v.b) maddelerden yapılan bariyer sistemleri hayvanları patojen mikroorganizmalardan korumakta ve mikrobiyal etkileri önlemektedir (1,7). Foster (8, 10, 11) SPF rat üretiminde ve SPF kolonisi oluşturulmasında, Trexler'in izolatör sistemini kullanmıştır.

Çalışmamızda, gnotobiyotik üretim tekni-ğinde kullanılan Trexler tipi esnek film izolatörü modifiye edilerek, basit teknik ve malzemelerle mikrobiyal geçirgenliği olmayan ekonomik bir izolatör hazırlanmıştır. Konvansiyonel hijyene sahip *Swiss albino* gebe farelere doğum kanalı açılmadan histerektomi uygulanmıştır. Uterus patojen mikroorganizmalardan arınmış izolatör içerisine nakledilmiş, yavrular izolatör içinde canlandırılmış ve sütanneler (C57Bl/6-SPF) tarafından emzirilmiştir. Elde edilen yavruların bakım ve beslenmeleri hazırlanan izolatör içerisinde sürdürülmüştür.

İzolatör sisteminde bariyer olarak en yaygın PVC maddesi kullanıldığı ve izolatör içi uygulamalarda oldukça büyük hareket yeteneği ve kullanım kolaylığı sağladığı bildirilmiştir (1,2). Bu bariyer sisteminde gereksinim duyulan iç

basınç izolatörün büyüklüğüne bağlı olarak değişmekte olup hava kaynaklı kontaminasyonun önlenmesi için bu basıncın daima yüksek tutulması gereği vurgulanmıştır (1,7). İstenilen düzeydeki iç basıncın sağlanabilmesi, kullanılan hava filtresinin direncine bağlı olmakla beraber 2-3 mm su basıncına denk olması gerektiği bildirilmiştir (1,7). Hava filtresi olarak da cam elyaf ve High Efficiency Particulate Air (HEPA) filtresi kullanılmaktadır (7).

Çalışmamız da izolatör bariyeri olarak kullanılan PVC ile yapılan uygulamalar bildirimleri doğrulamaktadır. Ancak izolatördeki nemin ve iç basıncın etkisiyle bağlantı noktalarında zamanla açılmalar oluşmuştur.

Uterus nakil kanalında kullanılacak dezenfektanın zamanla azalması nedeniyle, dezenfektan seviyesinin düzenli olarak kontrol edilmesi ve eksilen dezenfektanın normal seviyeye kadar tamamlanması gerekmektedir.

İstenilen düzeydeki iç basıncın sağlanabilmesi kullanılan hava filtresinin direncine bağlı olmakla beraber 2 - 3 mm su basıncına denk olması gerektiği bildirilmiştir (1,7).

Beş rafli bir standı kapsayacak şekilde hazırlanan izolatörün iç basıncı normal çevreden 5 mm fazla su basıncına denk olacak şekilde ayarlanmasına rağmen, izolatörün söndüğü görülmüştür. Hava çıkış filtresi üç kat yapılarak fazla hava çıkışı önlenmiş ve iç basınç 150–200 mm su basıncına ayarlanarak izolatörün sönmeye engellenmiştir. Bu da izolatör iç basıncının ayarlanmasında filtre direnci ve izolatörün büyüklüğünün etkili olduğunu

göstermektedir. Bu nedenle izolatör iç basınç ayarlanmasında yeterli olarak bildirilen basınçtan ziyade, kullanılacak filtre ve izolatör büyüklüğüne göre basıncın sağlanması yapılacak çalışmalarını daha güvenli kılacağı anlaşılmaktadır.

İzolatör, iç düzeneği kauçuk eldiven, malzeme nakil kanalı, uterus nakil kanalı ve havalandırma kısımlarından oluşmaktadır (7,9).

İzolatör eldiveni olarak pahalı, dayanıklı, kullanışlı olmayan ve hareketi sınırlandıran bilek uzunluğunda eldivenler kullanılabileceği gibi bu olumsuzlukların tersine kol uzunluğundaki eldivenlerin kullanılması da önerilmiştir (7–9). Bu çalışmada izolatör de kolluk olarak bilek uzunluğunda bulaşık eldiveni kullanılmıştır. Oldukça ekonomik olmasına rağmen bu eldivenlerin izolatör içi uygulamalarda personel hareketlerini kısıtladığı gözlenmiştir. İzolatör içi uygulamalarda iki kol boyu (bir kulaç) kadar hareket alanı ve kabiliyeti sağlayan kol uzunluğunda eldivenlerin kullanılmasının personelin çalışma yeteneğini artıracığı görüşü benimsenmiştir.

Sonuç olarak, modern ve pahalı izolatörler yerine, aynı fonksiyonlara sahip, oldukça basit ve ekonomik bir izolatör kullanarak konvansiyonel farelerden SPF fare üretiminin mümkün olduğu görülmüştür. Ancak bu izolatörde, iç basıncın ayarlanmasında hava filtre direnci ve izolatör büyüklüğünün dikkate alınması, çalışanlara hareket kolaylığı sağlayan, kol uzunluğunda eldiven kullanılması ve uterus nakil kanalındaki dezenfektan seviyesinin sabit tutulması için izolatörün düzenli olarak kontrolünün yapılmasının gerekli olduğu saptanmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmaya katkı sağlayan Biyolojik Kontrol Laboratuvar Şefi Veteriner Hekim Ahmet ÜNAL'a ve JICA Proje Lideri Dr. Morihiro MORİTA'ya teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Poyraz, Ö. Laboratuvar Hayvanları Bilimi. Ankara, Kardelen ofset. 2000.
2. Bleby, J. The selection and supply of laboratory animals. The UFAW Hand Book on the care and management of laboratory animals, sixth ed. Longman scientific and Technical. chapter 2, 1989; 8–13.
3. Zutphen F.M., Baumans V, Beynen A.C Principle of laboratory animal science.Elsevier Science Publisher, B.V. Netherlands 1993.

4. Held, J.R. Requirements for laboratory animals in health programmes. Bulletin of World Health Organization. 1981; 59 (4), 513–51
5. Henry J. Baker, J.R. Lindsey, and Steven H.W. Housing to control research variables. The Laboratory Rat Biology and disease. American college of laboratory animal medicine series. 1979; 1 (8): 169–86.
6. Bleby, J. The specific pathogen free (SPF) cat as experimental model. In: Animal quality and models in biomedical research, 7th ICLAS symposium utrecht 1979; 109-15.
7. Trexler, P.C. Animals of defined microbiological status. The UFAW Hand Book on the care and management of laboratory animals, sixth ed. Longman scientific and Technical . 1989; 6: 85–98.
8. Foster, L.H. Gnotobiology. The laboratory rat. Academic Press Inc. 1980; 2(2): 43-50.
9. Trexler, P.C. Gnotobiology. The Mouse in biomedical research. Academic Press Inc. 1980; 3 (1): 1-16.
10. Foster, L.H. Specific pathogen-free animals. Animal for research principle of breeding and management. Academic Press London and New York. 1963; 119–38.
11. Foster, L.H. Establishment and operation of S.P.F colonies. The problems of laboratory animal disease. Academic Press London and New York. 1962; 43–50.