

G N O T O B İ Y O T İ K Y A Ş A N T I

Doç. Dr. Mustafa **A R D A** (*)

Eskidenberi ilmî araştırmaların ekserisi hayvanlar üzerinde yapılmakta ve bu nedenle de, deneme hayvanlarına çok sayıda ihtiyaç hasıl olmaktadır. Nitekim, **Robert Koch**, kendi adı ile anılan ve 4 maddeden ibaret olan, **Koch Postulat**'ında «izole edilen etkenler hassas hayvanlara şırınga edilince hastalık meydana getirmelidirler» demektedir. Bu çağlarda başlayan deneme hayvanı kullanma tutkusunu, zamanımız ilim adamlarında da aynı kuvvette bulunmaktadır. Bugün, etkenleri izole etmede, patogenitelerini tayinde, toksin ve virus titrajlarında, aşı denemelerinde ve üretiminde, toksikolojik ve kanser araştırmalarında ve diğere sayısız ilmî ve ekonomik çalışmalarda hayvanlardan büyük ölçüde yararlanılmaktadır. Son yıllarda doku kültürü ve embriyolu yumurtaların çalışma alanına girmesi, deneme hayvanlarına olan itibarı azaltmamıştır. Çünkü, hayvanlar için yeni alanlar açılmış ve açılmaktadır. Bunlar arasında organ nakli denemeleri ile feza araştırmaları sayılabilir. Ayrıca, doku kültürlerinin PPLO (Pleuropneumonia-Like Organizmalar) ve viruslar tarafından kontaminasyonları, embriyolu yumurtalar aracılığı ile, salgınlar yapan bir çok bakteri, PPLO ve virusların çıkması ve bu ortamlardan hazırlanan aşılarla buluşması nedeni ile tekrar deneme hayvanlarına doğru bir eğilim baş göstermiştir.

Araştırmaların iyi ve güvenilir bir sonuçla bitebilmesi için, bilhassa, deneme süresince, hayvanların tam bir sağlık içinde bulunmaları gerekmektedir. Diğere bir deyimle, hayvanların sıhhat kontrollerinin doğumlarından itibaren tam ve dikkatle yapılması,

(*) A.Ü. Vet. Fak. Bak. Salg. Hastalıklar Kürsüsü Doçenti, Ankara.

denemeye alındıkları anda her türlü bakteriyel, viral, PPLO, mantar, protozoer ve parazitlerden (iç ve dış) arı olması lâzımdır. Çalışma devam ettiği sürece de, kontrollerin bilhassa bu ve diğer hijyenik (rutubet, soğuk, hava cereyanı, su, gıda, temizlik, yorgunluk, vs.) bakımlardan aynı titizlikle sürdürülmesi, denemelerin başarıya ulaştırılabilmesi bakımından çok önemlidir. Denemede bulunan hayvanlara daha fazla ihtimam gösterilmesi gerektiğinin bir nedeni de şırınga edilen veya verilen maddelerin (mikrop, virus, toksin, kimyasal madde, vs.) etkisi ile bünyelerinin zayıflaması ve her türlü hastalığı kolayca alabilir duruma gelmelerindedir. Bu esnada, verilen mikroorganizma ile birlikte, hayvanın vücudunda bulunan diğer etkenler, bir coenfeksiyon meydana getirebilirler veya klinik olarak herhangi bir belirti göstermeyen gizli enfeksiyonlar kendilerini bilhassa deneme sırasında belli edebilirler. Böylece, postmortam muayenelerde görülen lezyonların verilen etkenden mi yoksa, gizli enfeksiyon mikrobundan mı ileri geldiğini anlamak çok güç olur.

Normal çevresel koşullar altında yetiştirilen hayvanlar gıda, su, hava ve buldukları ortamlardaki maddelerden bir çok saprofit (koliform mikroorganizmalar, enterokoklar, laktobasiller, proteus neveleri, Ps. aeruginosa vs.) ve özel patogen (tüberküloz, psödotüberküloz, salmonella, pastörella, koksidiyöz, klostridium neveleri, pnömokok, vs.) etkenleri alabilirler. Bunun sonucu olarakta sindirim, solunum, urogenital sistemleri, deri ve mukozaları bu mikroorganizmalar tarafından istila edilirler. Bu etkenler bilhassa gıda bakımından zengin olan sindirim sistemine yerleşerek «oral ve intesninal flora»yı teşkil ederler. Barsak içeriğinin 1 gramında bu mikrop nevelerinden 10^7 ile 10^{11} kadar bulunmaktadır. Bunların yanı sıra, hayvanların serumlarında da bu etkenlere karşı çeşitli antikolar bulunur veya hayvanlar şırınga edilen etkene karşı immun olabilirler. Bunlar yapılan bakteriyel ve viral çalışmaları önleyebilirler. Gençlerde annelerinden intikal eden maternal immunité de çalışmalar üzerine olumsuz etki yaparlar.

Böyle deneme hayvanları üzerinde yapılacak çalışmalardan iyi sonuçlar alınamayacağı aşikârdır. Hem enfeksiyonları ve hemde bunlardan ileri gelen ölümleri minimal sınırlara indirmek ve deneme sonuçlarını daha güvenilir bir hale koymak için başlıca iki yol bulunmaktadır.

1 — Spesifik patojenlerden arî (Specific pathogen free = SPF) hayvanlar yetiştirmek ve kullanmak,

2 — Germsiz (Germfree) hayvanlar yetiştirmek ve kullanmaktır.

Germsiz hayvanlar ancak çok değerli araştırmalar için elverişli olabilirler. Fakat, bunları kullanırken bir çok noktalara dikkat edilmesi gerekmektedir. Özellikle, hayvanların normal fizyolojik parametrelerinin iyi bilinmesi ve deneme süresince sterilite kurallarına son derece riayet edilmesi başta gelen tedbirler arasındadır. Aksi halde, bunları kullanmakla bir metod avantajı sağlamadığı gibi, birçok zaman ve para kaybına da girişilmiş olur. Eğer kaidelere uyulamamak gibi bir durum varsa, daha başlangıçta iken, hayvanları mikropsuz koşullardan uzaklaştırmalı veya spesifik patojenlerden arî (SPF) hayvanları kullanmalıdır. Çünkü, mikropsuz hayvanların elde edilmeleri, bakım - beslenmesi, idamesi, her hafta sterilite kontrollerinin yapılması için, bu alanda özel olarak yetiştirilmiş kalifiye elemanların ciddi çalışmasına ve yardımına ihtiyaç vardır.

Zamanımızda mikropsuz koşullar altında bir çok hayvanlar yetiştirilmektedir. Özellikle, küçük hayvanlar, idarelerinin, bakım ve beslenmelerinin kolay olması ve fazla yer işgal etmemeleri nedeniyle bu alan için uygundur. Bu gaye için en fazla rat, fare, kobay, civciv ve tavşan üretilmiş buna karşılık bazı hayvanlar da (maymun, koyun, keçi, köpek, kedi, vs.) sadece, deneme süresince germsiz koşullar altında tutulmuşlardır, fakat üretilmişlerdir.

Başlangıçta, mikropsuz koşullar altında araştırma yapan laboratuvarlar, işin, masraflı, zahmetli ve zaman alıcı olması dolayısıyla, çok az sayıda idi. Bugün bir çok ilim adamları ve organizasyonlar, ekonomik ve ilmi değere sahip araştırmalarının çoğunda germsiz hayvanları kullanmayı öngörmektedirler. Son yıllarda ticari firmalar bu konuya el atarak, küçük laboratuvar hayvanlarını yetiştirmeğe ve satmaya başlamışlardır. Bu nedenle de bu tip deneme hayvanlarını bulmak kolaylaşmış olmaktadır. Bir çok ülkeler mikropsuz koşullar altında çalışmalar yapmaktadırlar. Bunlar arasında başta, Amerika olmak üzere, Japonya, İsveç, İngiltere, Fransa ve diğer memleketler sayılabilir. Sınırlı olan bu ülkelerin adedinin zamanla artacağı açıktır.

T a r i h  e :

Germisiz hayvan yetiřtirme dűřüncesi pek eski sayılamaz. Mikroorganizmalar gűrűlűp tanıldıktan ve hastalıklardaki ۆnemi anlařıldıktan sonra, bu tarzdaki gűrűřler ilim adamları tarafından ortaya atılmaya bařlanmıřtır.

Mikropsuz yařantı űzerindeki ilk alıřmalar, Pasteur'űn ۆğrencilerinden biri olan **Duclaux** (1885) ile bařlamaktadır. Bu arařtırıcı bezelye ve fasulyeleri, mikropsuz ortam içinde saf kűltűrler halinde űretmeęe çalıřmıřtır (14). Halbuki, **Pasteur** (1885), bunun aksine hayatın mikropsuz olamayacaęını ve mikroorganizmaların hayat için çok lűzumlu olduęu gűrűřünde ısrar etmiřtir (51). Pasteur'űn bu dűřüncelerine **Nencki** (1886) iřtirak etmemiř ve bakterilerin hayat için lűzumlu olmadıęını, aksine, mikropsuz bir yařantının, kontamine bir hayattan daha saęlıklı ve uzun olacaęı fikrini savunmuřtur (48).

Mikropsuz hayat űzerindeki dięer ۆnemli alıřmalar, Almanya'da, **Nuttal** ve **Thierfelder** (1895) tarafından organize edilerek yűrűtűlműřtir. Arařtırcılar 1895, 1896 ve 1897 yıllarında yaptıkları 3 çalıřmada «**Thierisches leben ohne Bakterien im Verdauungs kanal**» intestinal flora olmaksızın hayvansal yařantı űzerinde incelemeler yapmıřlar ve bu amaçla ilk olarak civciv ve kobay yetiřtirmeęe çalıřmıřlardır (49). **Metchnikoff** (1903) da, aynen Nencki'in gűrűřlerine ortak oluyordu. Buna gűre de mikroorganizmaların hayat için pek lűzumu yoktu (40). **Schottelius** (1908), yılında yaptıęı çalıřmada barsak bakterilerinin beslenmedeki ۆneminin «**Die Bedeutung der Darmbakterien fűr die Ernűhrung**» belirtmeęe çalıřmıřtır. Kendisi, 1908 de Freiburg űniversitesinde germisiz kořullar altında civciv yetiřtirmeęi bařarmıřtır. Fakat, iyi bir diyet tatbik edemedięinden hayvanlar ۆlműřlerdir. Mikropsuz kořullarda bu bařarisına raęmen, yine de barsak bakterilerinin lűzumlu olduęu gűrűřünü savunmuřtur (76). Teknik yavař yavař ilerledikçe bir çok hayvanlar mikropsuz olarak yetiřtirilmeęe çalıřılmıřtır. **Wollman** (1911) sinekleri (88), **Cohendy** (1912) civcivleri (9). **Wollman** (1913) kurbaęa yavrularını (89) ve Schottelius'un ۆğrencisi olan **Kűster** (1915) keçileri yetiřtirmeęi (34) bařarmıřlardır.

Bu geçen 20 yıllık (1895 - 1915) birinci devre içinde, mikropsuz hayvan yetiştirme metod ve tekniği üzerinde bazı ilk ve önem-adımlar atılmış ve bundan sonra yapılacak araştırmalar için bir çok önemli noktalar ortaya konulmuş ve alanın geleceği belirtilmiştir. Birinci Dünya Savaşı sırasında (1915-1935), ikinci 20 yıllık periyotda, mikropsuz koşullarda bir - iki kısır çalışma yapılmıştır. Bunlar ancak, bu konunun unutulmamasını ve ayakta kalmasını sağlamıştır. Üçüncü 20 yıllık devrede (1935 - 1955), metod ve aletlerde bir çok gelişmeler elde edilmiş ve yeniden çalışmalara hız verilmiştir. Bu devirde araştırmalar Avrupanın dışına da ulaşmağa başlamıştır.

İsveçde, Lund Üniversitesinde, **Glimstedt** (1936) germsiz kobjaylar (20) ve yine aynı üniversitede, **Gustafsson** (1948) ratlar üzerinde (23) denemeler yapmışlar ve başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Japonyada, Nagoya Üniversitesinde **Miyagawa ve ark.** (1954) kobjayları mikropsuz koşullar altında yetiştirerek araştırmalar yapmışlardır (43).

Birleşik Amerikada, bu konudaki araştırmalar, Notre Dame Üniversitesinde, **Reyniers**'le (1942) başlamaktadır (68). Sonraları **Trexler** (1943) de Reyniers'in çalışmalarına katılarak konuyu geliştirmişlerdir. Amerikadaki araştırmalar Notre Dame Üniversitesindeki **Lobund** laboratuvarları tarafından yönetilmektedir. Bu merkezden, Amerikanın bir çok eyaletlerine olduğu gibi, Londra, Paris, Amsterdam, Japonya ve diğer ülkelere özel izolatörler içinde rat veya fareler gönderilmiştir. Bu hayvanlar gittikleri yerlerde, bu konunun öncülüğünü yaparak ilmi araştırmaların gelişmelerine hizmet etmişler ve germsiz hayvanların ilk nüvelerini kurmuşlardır. Bunların yanı sıra, laboratuvarlar arasında da devamlı bir teknik yardımlaşma ve işbirliği sağlanmıştır.

Terminoloji:

Her bilim alanının kendine özel bir terminolojisi olduğu gibi germsiz hayvanlar için de böyle bir sözlük bulunmaktadır. Hayvanların durumlarına ve kontaminasyonlarına göre konan terimler bugün dahi tam olarak yerleşmiş sayılamaz (71).

Eskiden daha ziyade **Pür, Steril, Aseptik, Mikropsuz** ve **Bakterisiz** gibi sözcükler yaygındı. Zamanımızda ise en çok,

Germfree = Germsiz

Axenik = Yabancı ihtiva etmeyen (A = Yokluk, **xenos** = yabancı),

Gnotobiotik = Bilinen canlıya sahip (**Gnotos** = bilinen, **bios** = canlı). gibi terimler tercih edilmektedir. Bunların yanı sıra, axenik ve gnotobiyotik kelimelerinden türetilmiş ve fakat az kullanılan bazı terimler de bulunmaktadır (67) :

Gnotoxenik = Gnotobiyotik,

Holoxenik = Konvensiyonel,

Heteroxenik = Spesifik patojenlerden arı (SPF)

Agnotoxenik = Axenik

Polignotoxenik = Poliflora veya polifauna

Germsiz (germfree) hayvanlar bünyelerinde her hangi bir saprofit veya patojen mikroorganizmaya sahip değildirler diye kabul edilirse de bunu ancak bir ideal olarak düşünmek lâzımdır. Çünkü yapılan bir çok araştırmalar da bu görüşü teyit etmiştir. Gerek yumurta ile (6, 15, 19, 27, 65) ve gerekse plasenta ile (83) yavrulara bir çok bakteriel ve viral etkenler geçebildiği gibi gnotobiyotik köpek yavrularında da kongenital **T. canis**'e raslanılmıştır (22).

Son yıllarda bazı fare ırklarında **Leukemia** virusunu ortaya koyabilmek için x - radyasyonlarından istifade edilmektedir. Timusun büyümesi ile karakterize olan bu tarz lenfatik leukemia'da timus epitel hücreleri içinde inklüzyon cisimciklerine tesadüf edilmiştir. Halbuki normal hayvanlarda buna raslamak mümkün değildir (61). Ayrıca, C3H ırkı germsiz farelerinin timus epitel hücrelerinde virus partiküllerinin bulunduğu da bildirilmiştir (28). Mikropsuz koşullarda yetiştirilen Wistar ratlarında (60), C3H, CFR, ICR ve Balb/C ırkı farelerde spontan tümörlere raslanılmıştır (62). Bugünkü imkânlar ve teknikler yardımı ile bunlardan bir virus izole edilememiştir. Bu da bize kullandığımız tekniğin yetersiz olduğunu ve hayvanların her hangi bir etkenden yoksun olmayacağını göstermektedir. Bu nedenle de germsiz ve axenik terimleri yerine gnotobiyotik tabiri daha uygun düşmektedir.

Gnotobiyotik hayvanların yanısıra, çok kullanılan diğer bir deneme hayvan grubu da Spesifik patojenlerden arı (SPF) = Spe-

fic pathogen free) hayvanlardır (5, 7, 11, 18, 29, 46, 50, 53). Bunlar da gnotobiyotikler gibi sezariyenle elde edilirler, fakat mikropsuz sayılamazlar. Kontrollü bir ortam içinde bulduklarından herhangi bir özel patogen etkene (**Pastörella, Shigella, Salmonella, Bordetella, Staphylokok neveleri, Streptokoklar, Korinebakteriler, vb.**) ve parazitlere (iç ve dış) sahip değildirler. Bunlarda yalnız saprofit olan bir flora bulunmaktadır. Hayvanların, bakteriyolojik, virolojik, parazitolojik ve serolojik yönlerden devamlı kontrolleri yapılmaktadır ve bu bakımlardan garantilidirler. Kullanımında, bakım ve beslenmeleri, gnotobiyotiklere nazaran daha kolay ve masrafsızdır. Hayvanların bu özelliklerini belirtmek için bazı terimler kullanılmıştır (29) :

1 — **Hastalısız hayvanlar (Disease free Animals)** : Genellikle herhangi bir klinik araz göstermeyen manâsını taşımaktadır. Halbuki latent enfeksiyonlarda ve portörlük hallerinde hayvanlarda semptomlara raslanamamasına karşılık dışarı mikrop saçmaktadırlar. Bu nedenle bu terim tam yerinde sayılamaz.

2 — **Patogen etkensiz hayvanlar (Pathogen free animals)** : Bütün patogen mikroorganizmalardan yoksun hayvanlar demektir. Halbuki bazı koşullar altında patogen mikroplar fakültatif patogen olarak bulunabilirler ve hatta gnotobiyotik hayvanlarda viruslara raslanılabildiğine göre bu tabir de uygun düşmemektedir.

3 — **Temiz hayvanlar (Clean animals)** : Bu terim çoğu zaman morfolojik olarak temiz olmayı kasteden bir manâya sahiptir. SPF hayvanları tam olarak karakterize edemez.

4 — **Sezariyenle doğan hayvanlar (Cesarean borne - drived animals)** : Özellikle sezariyenle doğmayı bildirir. Hayvanların sağlık ve mikrobik durumlarını ifade etmez.

Yukarda bahsedilen terimlerin dışında en uygunu Spesifik patojenlerden arı (SPF) kelimesidir. Bunun manâsı açık olup özel hastalık yapıcı her türlü etkenden yoksun demektir.

Normal koşullar altında yetiştirilen hayvanlara ise **Klâsik hayvanlar, Normal hayvanlar**, veya **Konvensiyonel hayvanlar** adı verilmektedir. Bunların vücutlarında her türlü saprofit ve patogen etken bulunduğu gibi kanlarında da bu etkenlere karşı çeşitli antibakteriyel antikorları taşırlar.

Bu bilgilerin ışığı altında, laboratuvarlarda kullanılan deneme hayvanlarını 3 gruba ayırmak gerekmektedir :

- 1 — Normal veya konvensiyonel hayvanlar,
- 2 — Spesifik Patogenlerden arî (SPF) hayvanlar,
- 3 — Gnotobiyotik hayvanlar.

Germisiz hayvanlara deneme gayesi ile mikrop verilirse bazı özel kelimeler kullanılmaktadır :

Bir etken verilirse,

Etkene : Monokontaminant, monoflora, monofauna, monoasosiasyon,

Hayvana : Monokontamine, monofloralı, monofaunalı hayvan,

İşleme : Monokontaminasyon veya monoenfeksiyon adı verilmektedir. İki veya daha fazla etken verilirse,

Etkene : Dikontaminant, diflora, difauna, polikontaminat, poliflora ve polifauna

Hayvana : Dikontamine, difloralı, difaunalı, polikontamine, polifloralı ve polifaunalı hayvan

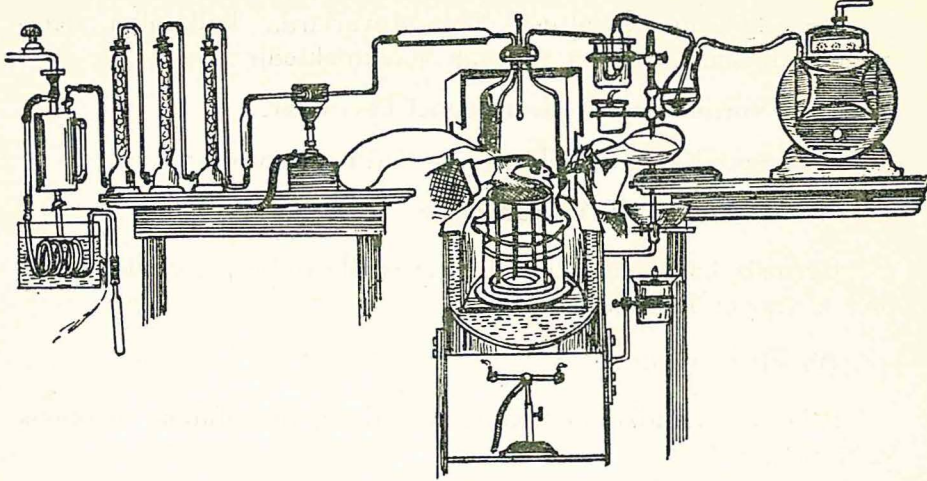
İşleme : Dikontaminasyon veya polikontaminasyon adı verilmektedir.

Mikropsuz koşullar altında yetiştirilmiş hayvanlar deneme gayesi ile normal hayvan kolonilerinin arasına bırakılırsa buna «Konvensalizasyon» denir.

Mikropsuz hayvan yetiştirmek için izolatörler :

Mikropsuz hayvan yetiştirmek ve deneme süresince aynı koşullar altında tutabilmek için bir çok teknikler ve izolatörler geliştirilmiştir. İlk kullanılan alet Nuttal ve Thierfelder (1895) tarafından yapılmıştır. (Şekil : 1)

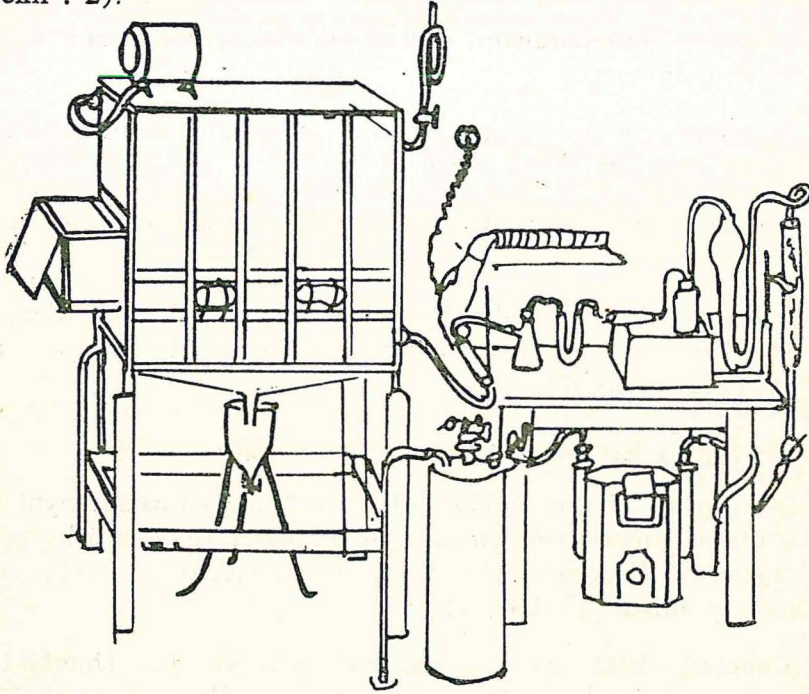
Cohendy (1912) civciv yetiştirmek için Nuttal - Thierfelder'inkine benzer yapıda bir izolatör sistemi kullanmıştır (9). Küster (1915) keçi yetiştirmek için geliştirdiği alet bugün kullanılan



ŞEKİL : 1

Nuttali ve The erfelder'in kobay yetiştirmek için kullandıkları sistem.

ların temelini teşkil edecek bir tekniğe ulaşmış bulunmakta idi (Şekil : 2).



ŞEKİL : 2

Küster'in keçi yetiştirmede kullandığı izolator

Zamanımızda gelişen teknik ve ilmin ışığı altında çok mükemmel izolatörler imâl edilmiş ve piyasaya arz edilmiştir. Bunları 2 ana bölüme ayırmak mümkündür :

1 — Paslanmaz çelikten izolatörler :

- A — Reynniers'in izolatörü
- B — Gustafsson'un izolatörü
- C — Miyagawa'nın Manipulatörlü izolatörü

2 — Plâstik izolatörler :

Trexler'in izolatörü

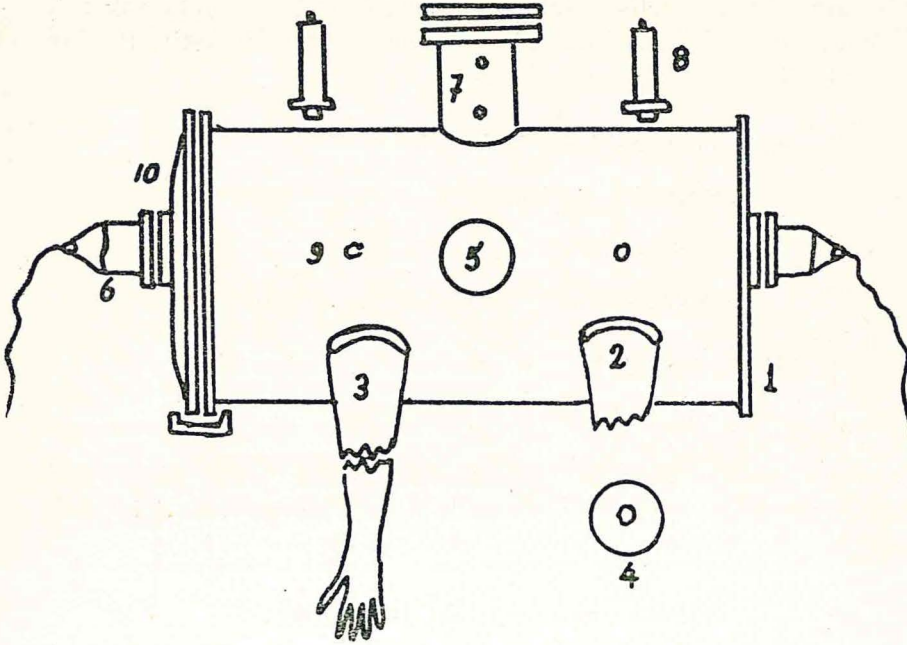
Bunların dışında uzak yerlere mikropsuz hayvan göndermek için «Sevk izolatörleri» ve çok sayıda hayvan yetiştirmek için «Oda ünite»leri de paslanmaz çelikten veya plâstikten yapılmıştır.

Paslanmaz Çelikten İzolatörler :

Reynniers'in izolatörü : Yuvarlak otoklav biçiminde bir alettir. Hava giriş - çıkış filtirelerine, iki adet bakma penceresine ve kol uzunluğunda neopren iki çift eldivene sahiptir. İçini ısıtmak ve aydınlatmak için özel tertibatı ve çift cidarlı, çabuk açılıp kapanabilen bir kapı sistemi bulunmaktadır. Alet tazyikli buharla sterilize edilir. Ayaklara takılan 4 adet tekerlek yardımı ile hareket kabiliyeti artırılmıştır. İzolatör pahalı ve ağırdır. Son yıllarda daha gelişmiş tipleri imâl edilmiştir (72). (Şekil : 3)

Gustafsson'un İzolatörü : İnce kenarlı paslanmaz çelikten yapılmış ve dört köşe bir kutu biçimindedir. Aletin 200 litre (10 ratlık) ve 700 litre (20 - 30 ratlık) kapasitelerinde örnekleri vardır. İzolatörün üstü tamamiyle camdan yapıldığından geniş bir görüş sahası temin eder. İki çift eldivene (uzun), hava filtirelerine, ısıtma ve aydınlatma tertibatına sahip olup içinde su kapları ile kafesler de bulunmaktadır. Reynniers'inkine nazaran daha basit bir yapıdadır. Altta 4 adet tekerleği bulunur ve alet buharla sterilize edilir (26). (Şekil : 4)

Miyagawa'nın Manipulatörlü İzolatörü : Bu alet diğerlerine göre daha ağır, pahalı ve komplikedir. Hareket kabiliyeti de yoktur.



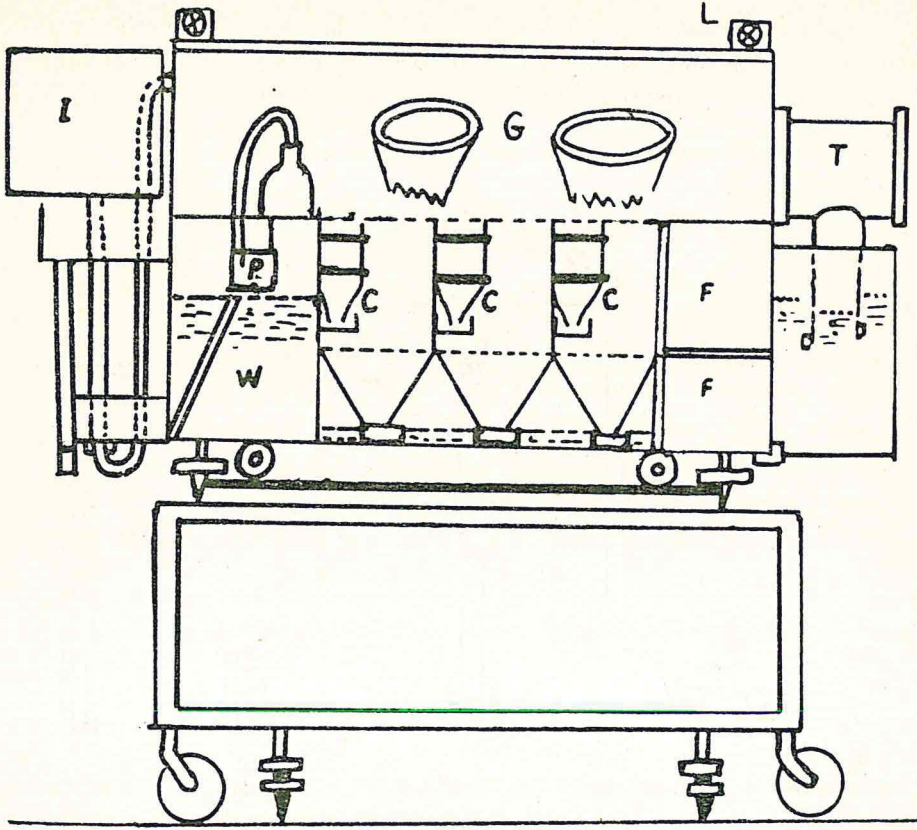
ŞEKİL : 3

Reyniers'in izolatörü. 1 - Gövde kısmı, 2 - 3 - Eldiven ve eldiven deliği, 4 - Eldiven sıkılaştırma çemberi, 5 - Pyrex camlı pencere, 6 - Vantilatörlü lamba, 7 - İki cıdarlı ve çabuk açılır - kapanabilir kapı, 8 - Hava filtreleri, 9 - Hava filtrelerinin geçtiği delikler, 10 - İzolatörü kapayan kapı,

Eldivenler yerine içeri doğru uzanan ve el ödevini gören demirden iki adet robot kollara sahiptir. Dışardan, bu kollara istenen hareket ve emirler verdirilebilir. Bu kollar yardımı ile içerdeki hayvanları tutmak ve şırınga yapmak kâbilirdir. Kontaminasyon ihtimali bu izolatörde yok gibidir (44). (Şekil : 5)

Plâstik İzolatörler :

Trexler'in İzolatörü : Ucuz, hafif, hareket kabiliyeti fazla ve kullanışlıdır. Çok az yer işgal eder ve her yandan görüş kolaylığı sağlar. Bunlara karşılık tek mahzuru, delinme ihtimalinin, diğerlerine göre, daha fazla olmasıdır. Isıya dayanıksız olduğundan kimyasal yolla sterilize edilir (Perasetik asit veya Beta - propiolakton). Bu izolatörde de hava giriş - çıkış filtreleri, iki çift uzun lâstik eldiven ve özel tertibatlı kapı sistemi bulunmaktadır. Alet çok hafif



ŞEKİL : 4

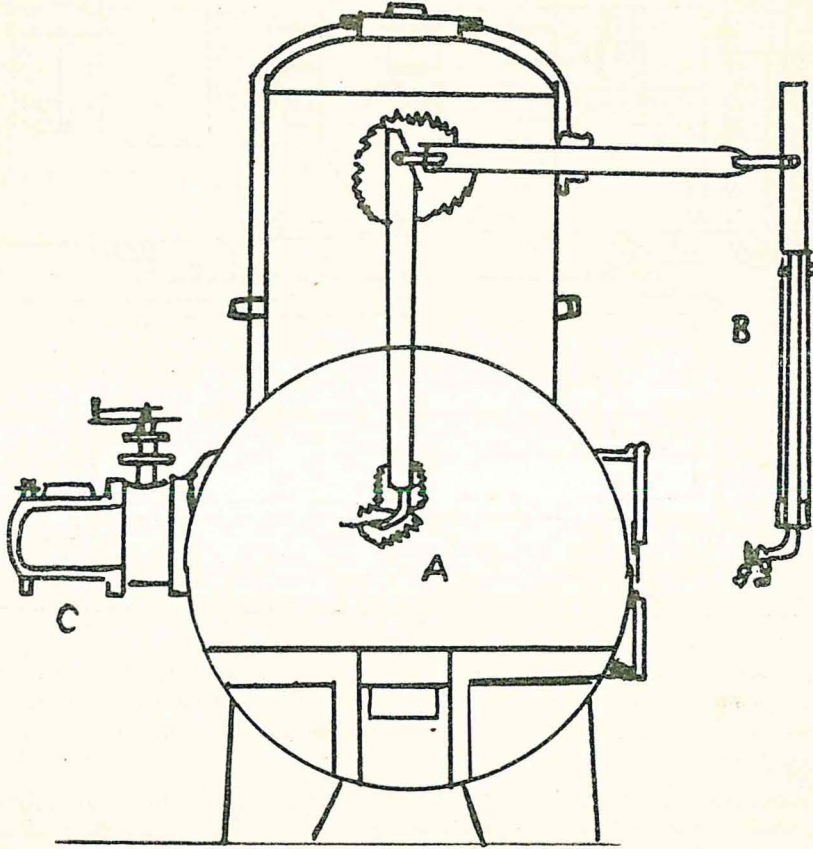
Gustafsson'un izolatörü. L — Işık, I — Hava Sterilizatörü, W — Su tankı ve Pompası (P), C — Kafesler, G — Lastik eldiven delikleri ve lastik eldivenler, F — Gıda kabı, T — Gıda otoklavı ve transfer ünitesi.

olduğundan kaldırmak ve yerini değiştirmek mümkün olduğu gibi

bir kaç tanesini de rafa yerleştirmek kâbilidir. Masa üzerine tatbik edilen ve ısı ile sterilize edilebilen dayanıklı örnekleri de yapılmıştır (81). (Şekil : 6)

Sevk İzolatörleri : Mikropsuz koşullar altında üretilen veya yetiştirilen deneme hayvanlarını çok uzak ülkelere göndermek ve orada çalışmalarını devam ettirebilmek için paslanmaz çelikten veya sağlam plâstikten yapılmış özel izolatörler kullanılır. Hayvanlar bunlar içinde hırpalanmadan ve en seri vasıta (uçakla) ile gönderilir (81).

Oda Üniteleri : Son yıllarda çok sayıda hayvan yetiştirmek için büyük odalar yapılmıştır. Bunların içi plâstik veya madeni olup içinde bir insan rahatlıkla hareket edebilir ve girip-çıkabilir (81).



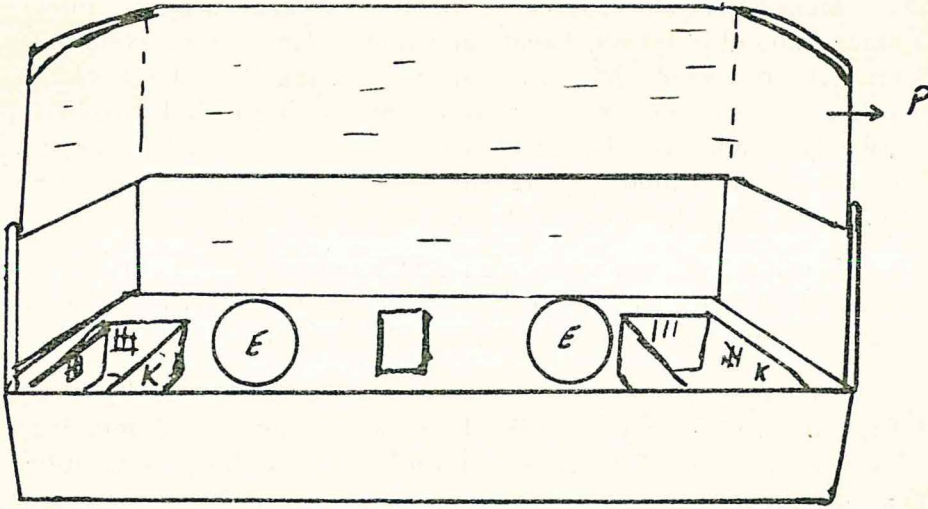
ŞEKİL : 5

Miyagawa'nın M-57 izolatörü. A — Gövde kısmı, B — Uzaktan kontrol sistemi, C — İçeri gıda koyma kısmı.

Mikropsuz Hayvanların Elde Edilmeleri ve Bakımları

Kanatlıları veya memelileri mikropsuz olarak elde etmek genellikle kolay olmasına karşılık, bunların aynı koşullar altında bakım, besleme, yetiştirme ve mikropsuz şartların kontrolü oldukça güçtür.

Kanatlıların elde edilmesi : Genellikle, kabuk içinde teşekkül eden embriyolar steril olarak kabul edilmektedir. Bu durum her zaman böyle ümit verici olmamaktadır. Çünkü yumurta ile birçok bakteriyel ve viral etkenler, PPLO grubu mikroorganizmalar çıkmaktadırlar. Bu ajanlar embriyo gelişirken üreyerek ölümler meydana getirdiği gibi bazıları da öldürmez ve civcivle birlikte bulunurlar. Bu nedenle de yumurtadan çıkacak her civcivin mikropsuz olduğuna inanmak doğru değildir. Bu engeli ortadan kaldırmak için her türlü hastalık etkenlerinden arı ve aşılammamış özel damızlık tavuk gruplarının yetiştirilmesi gereklidir. Ancak bunlardan elde edilen yumurtalara güvenilebilir.



ŞEKİL : 6

Trexlerin Plastik İzolatörü. P — Plastik Gövde, E — Eldiven delikleri, K — Kafesler.

Fertil, temiz, şekilleri muntazam, kabuk teşekkülâtı iyi ve orta büyüklükteki yumurtalar bu gaye için kullanılırlar. Oda ısısında bir deterjanla yıkandıktan sonra **Merkürü klorür** (% 2 $HgCl_2$) solüsyonuna 5 dakika süre ile daldırılır ve ilâcın kabuk üzerinde kuruması temin edilir (başka deterjanlar da, **tergusson** gibi, kullanılabilir). Yumurtalar temiz, dezenfekte edilmiş ve iyice ayarlanmış kuluçka makinesine 20 gün süre için bırakılır. Embriyoların iyi gelişmesi için rutubet ayarı ve yumurta çevrilmeleri dikkatli

ce yapılır. Bu sürenin sonunda yumurtalarda canlılık kontrolleri uygulanır içlerinden bir veya birkaç tane iyi gelişmiş olanlar seçilerek, izolatöre yerleştirilmiş bir kap içinde bulunan merkürük klorür solüsyonuna 5 dakika müddetle daldırıldıktan sonra hemen izolatöre konur. Aletin ısısı ayarlanarak civcivin çıkması beklenir. Çıkan civcivler arasında iyi gelişmiş olanlardan lüzumu kadar alı konur diğerleri dışarı çıkarılır (9, 12, 49, 70, 71, 73, 76).

Yeni çıkan civcivlerin bakım ve beslenmelerinde herhangi bir güçlük yoktur. Bunlar için de özel steril diyetler hazırlanmıştır (37). Hayvanların diğer su ve hava gibi ihtiyaçları da steril olarak temin edilir.

Memelilerin elde edilmesi : Memeli hayvanların elde edilmesinde kullanılan teknik, kanatlılarınkinden daha zor ve zaman alıcıdır. Uterus içinde gelişen yavru da, aynı şekilde, steril olarak kabul edilmektedir. Ancak, gebelerin her türlü sağlık kontrollerinin çok iyi yapılmış, kanların serolojik yoklamalardan geçmiş olması şarttır. Bilindiği üzere, uterusdaki fetus, plasentadan geçen mikroorganizmalar tarafından kontamine edilebilmektedirler.

Doğumu çok yaklaşmış olan gebelerden sezariyenle yavruları alınarak hemen izolatöre yerleştirilir (veya önce uterus çıkarılarak izolatöre konur burada yavrular çıkartılır).

Memelilerden rat (24, 57, 58), fare (57), kobay (20, 28, 49, 55, 69), tavşan (57), maymun (68), keçi (34), köpek (22), domuz (92) aynı usulle alınarak mikropsuz koşullarda üretilmiş veya tutulmuşlardır.

Memeli hayvanların bakım ve beslenmeleri oldukça güçtür. Özellikle rat, fare ve tavşan yavruları elde beslenirler. Çünkü, bunlar doğdukları anda kendilerini idare edecek durumda olmadıkları gibi yiyecek te yiyemezler. Kobaylar ise daha zahmetsiz üretilirler. Genellikle bu tarzda elde edilen hayvanlara özel bir itina göstermek gerekmektedir. Hayvanları elde beslerken yaralanmalarına dikka tetmek, urinasyon ve defekasyona zorlamak gereklidir. İzolatörün ısısı başlangıçta 35°C. civarında olmalıdır.

Mikropsuz hayvanların gıda ihtiyaçları kalitatif yönden normal hem cinslerinden pek farklı sayılamaz. Bazılarının diyetlerinde de (rat-fare) özel vitaminler katmak lüzumdur. Hayvanlara gıdalar

sterilize edildikten sonra verilir. Sıvı diyetler filtrasyonla, katılar ise buharla sterilize edilirler. Son senelerde radyasyonla sterilize edilen gıdalar da kullanılmıştır. Filtirasyonla sterilize edilen gıdalar içinde herhangi bir etken bulunmamasına karşılık, buharla sterile edilen kuru gıdalar içinde ölü mikroorganizmalara raslanılmaktadır. Bunlar gıda hazırlanırken içerlerinde bulunan floradan ileri gelmektedir. Sterilizasyonda ölen bu mikroplar hayvanlarda antikorların oluşmasına sebep olmakta ve gaitadan yapılan frotilerde görülmektedirler. Bunları canlı olanlardan ayırmak çok güç olduğundan, sterilite kontrollerinde karışıklıklar meydana getirmektedirler. Bu nedenle de filtrasyonla sterilizasyon daha uygundur. Buharla sterilizasyonun bir mahzuru da yüksek ısıda vitaminlerin tahrip olmasıdır. Böyle durumlarda hayvanların diyetlerine vitaminler katılır. Ayrıca, thiamine'li gıdalarda, buharla sterilizasyonda bir antivitamin olan **oxythiamine** oluşmakta ve kısırlıklara sebep olmaktadır (62).

Memeli hayvan yavruları için bir çok özel diyetler hazırlanmıştır (55, 57, 91).

Mikropsuz Hayvanların Kontrolü

Mikropsuz koşullara konan hayvanların, bu şartlarının devam ettiğinin kontrolleri muntazaman yapılması gerekmektedir. Aksi halde herhangi bir avantaj sağlamaz. Kontroller her hafta veya 15 günde bir defa olmak üzere bir ekip tarafında dikkatlice uygulanır.

Mikropsuz hayvanların kontrolü sadece kontamine edici ajanlar yönünden değil bir kaç yönden uygulanır.

1 — **Kontaminasyon kontrolü** : Mikropsuz hayvanlar çeşitli nedenlerle mikroplarla bulaşabilirler. Bunun kaynağının nereden geldiğini anlamak oldukça güçtür. Bir kontaminasyon halinde, başta hayvanlar olmak üzere, su, gıda, hava, kafesler, eldivenler ve izolatörün içindeki diğer malzeme ile birlikte, aletin bizzat kendisi de gözden geçirilir. Kontaminasyonlar genellikle eldivenlerin delinmesi ve alette meydana gelen deliklerden ileri gelmektedir. Mikroorganizmaların izolasyonu için çok dikkatli çalışılması lâzımdır. Hayvanların ve diğer maddelerin kontaminasyonunda başlıca ma-

ya, mantar, aktinomiçes, bakteri, PPLO, virus, protozoa, artropod, helmint, vs. etkenler rol oynamaktadırlar. Kontrol gayesi ile hayvanların gaitası, idrar, ağız, burun, deri, genital organlardan, icap ederse kan ve organlardan (öldürüldükten sonra) frotiler ve ekimler yapılır. Bakteriyolojik bakımdan yapılacak yoklamalarda laboratuvarlarda kullanılan özel sıvı ve katı besi yerleri yeterlidir. Viruslar için doku kültürleri, embryolu yumurtalar ve deneme hayvanları, PPLO'lar için özel besi yerleri (VF buyyonu ve agarı gibi), embryolu yumurtalar ve doku kültürleri kullanılabilirler. Protozoalar için natif preparatlar, helmintler için yine natif preparatlarla birlikte ZnSO₄ ile flotasyon metodları, artropodlar için de bit, pire, kene vs. aranması uygulanır. Bunların dışında hayvanların serumları bakteriyel ve viral ajanlar yönünden serolojik yoklamalara tabi tutulur. Bu tekniklerin yanısıra histopatolojik ve elektron mikroskopik çalışmalar da yapılmalıdır. Bazı mikroorganizmaları üretmek oldukça güçtür. Bu nedenle değerlendirmeleri yaparken dikkatli davranmalı ve üreme için gerekli zaman ayırmalıdır. Kuru gıdalarla beslenen hayvanların gaitalarında, sterilizasyonda ölen mikroorganizmalara raslanabilir. Böyle durumlarda hareket muayeneleri ve ekimler yapılır. Her çeşit mikroorganizmayı üretebilmek için diferansiyel ve selektif besi yerleri kullanıldığı gibi, anaerob ve aerob koşullar, çeşitli ısı dereceleri de denemelidir. Bazıları için de % 5-10 CO₂ li ortamlar gerekmektedir. Bazı virusları (radiojenik Leukemia virusu) hayvanlarda bulunmasına rağmen, izole etmek mümkün değildir. Ancak hayvanları radyasyonlara maruz bırakma sonu ortaya çıkmaktadırlar. Bu bakımdan da bazı stres faktörlerini denemek lüzumludur (12, 23, 55, 84).

2 — **Genetik kontrol** : Mikropsuz hayvanlar arasında genetik varyasyonlara fazlaca raslanır. Bir örnek hayvan gruplarının elde edilebilmesi için bu değişikliklerin önlenmesi ve hayvanların devamlı kontrollerinin yapılması gereklidir. Aksi hallerde, denemelerde mikroorganizmalara karşı değişik reaksiyonlar elde edilir. Bu durum da çalışmaların iyi sonuca varamamasına ve iyi değerlendirilmemesine yol açar. Bu varyasyonları önlemek için mütehasıs elemana ihtiyaç vardır (12, 13).

3 — **Fizyolojik kontrol** : Mikropsuz koşullar altında yetiştirilen hayvanların fizyolojik karakterleri (hareket, yeme, soluma, de-

fekasyon, urinasyon, doğurma, laktasyon, vs.) devamlı olarak kontrol edilir. Bu karakterlerinde anormalikler gösterenler dışarı alınır veya konvensiyonalize edilirler.

4 — **Genel sağlık kontrolü** : Hayvanların her gün sağlık kontrolü yapılarak sıhhatli görülenler deneme için alıkonurlar. Düşkün, iştahsız, etrafı ile ilgilenmeyen, hareketsiz ve hasta görülenler dışarı alınır.

5 — **Delik kontrolü** : İzolatörlerde meydana gelen delinmeleri farketmek ve bunları bulmak genellikle güç olmakla beraber bazı teknikler de ortaya konulmuştur. İzolatörler bu bakımlardan devamlı kontrol altında tutulmalıdırlar (32).

Mikropsuz Hayvanların Özellikleri ve Normal Hayvanlardan Ayrımları

Önceleri, mikropsuz hayvanlarla, normalleri arasındaki farkın sadece birincilerde, mikrop florasının olmaması şeklinde tasavvur edilirdi. Bugün ilerleyen teknik ve imkânlar yardımı ile aradaki ayrımların, daha başka karakterlerde de bulunduğunu ortaya koymuştur. Bunlar kısaca şöyledir :

1 — Morfolojik ayrımlar

Kanatlılarda : Mikropsuz kanatlılarla konvensiyonal hemcinslerini morfolojik olarak birbirlerinden ayırmaya imkân yoktur. Görünüş, büyüklük, ağırlık, tüyler, gaga, ibik, tırnak ve iç organlarının görünüşü aynidir. Yalnız, mikropsuz hayvanların lenfoid dokuları az gelişmiştir (38, 54).

Memelilerde : Ratlar arasında görünüş, büyüklük, ağırlık, iç organları arasında morfolojik herhangi bir fark yoktur. Yalnız, kanatlılarda olduğu gibi, bunlarda da barsak ve lenfoid dokularında az bir gelişme vardır. Mikropsuz rat ve fare ile, normalleri arasındaki en önemli ayırım, gnotobiyotik olanlarda çok büyümüş olan sekumdur. Sekumun içi kokusuz bir sıvı ile dolu olup hayvanın ağırlığının % 30-90 nını teşkil eder. Hayvanların gebe zannedilmesine ve karınlarının çok büyük görünmesine yol açar. Bu büyük sekum, hayvanların gelişmesine engel teşkil ettiği gibi genç-

ler arasında ölümlere de sebep olabilir. Normal hayvanların sekumlarından izole eden Streptokok türlerinin şırıngası ile, sekum 24 saat içinde % 50 kadar küçülebilir (30). *Cl. difficile* ile monokontaminasyon, 24 saat içinde sekal ölçüyü küçültür ve muhteviyatını değiştirir (3,77). Sekumu büyük olan rodentlere, *CL. difficile*, *Pr. vulgaris*, *E. coli*, veya *Strep. faecalis*'lerden biri verildiğinde de sekum küçülebilir (38,82). Kobaylarda da büyük sekum genellikle meydana gelmektedir (55). Generasyonlar ilerledikçe veya yemlere % 3 kadar fiber ilâvesi ile sekumun küçüldüğü ve normal duruma geldiği bildirilmiştir (12).

Mikropsuz rodentlerin lenf yumruları çok küçük olduğu gibi gelişmemiştir de. Retikuloendotelial sistemleri az gelişmiş ve inaktif bir durumdadır. Ancak monokontaminasyon sonu aktive olabilir (45).

Gnotobiyotik hayvanlar çok fazla su içtiklerinden gaitaları yumuşak ve herhangi bir bakteriye sahip olmadıkları için de kokusuzdur. Hayvanlar ölünce kokuşmazlar, kuruma ve mumyalaşma meydana gelir. Barsaklar fazla dolu ise otolize olurlar (12).

2 — Histolojik ayrımlar

Kanatlılarda : Organ ve dokuları teşkil eden hücrelerin nevi bakımından, normal hayvanlarla, mikropsuzlar arasında bir fark yoktur. Ancak, germsizlerin iliösekal lenfoid dokuları az gelişmiş olduğundan buralarda bulunan lenfosit sayısı da azdır. Buna paralel olarak dalakta da az sayıda plazma hücreleri bulunur. Hayvanlar monokontamine edilirse, her iki hücre sayısında da artma meydana gelerek normallerinin seviyesine ulaşır (38, 54, 78, 79).

Memelilerde : Ratlarda organ ve dokuların histolojik yapıları bakımından mikropsuzlarla, konvensiyonal hemcinsleri arasında bir ayrım yoktur. Kanatlılarda olduğu gibi bunlarda da lenfoid dokuların az gelişmesi nedeni ile lenfosit ve plazma hücre sayıları çok azdır. Monokontaminasyon sonu hücre adetleri artar. Mikropsuz rodentlerin lenf yumrularında bulunan reaksiyon bölgeleri de çok az sayıda veya yoktur (38, 46, 54, 78, 80).

3 — Kimyasal ayrımlar

Kanatlılarda : Gnotobiyotik kanatlıların çeşitli organlarının bileşiminde bulunan yağ, kül, nitrogen, fosfor, potasyum, panto-tenat, niasin, biotin ve folik asit bakımından, konvensiyonallerinden bir ayırım göstermezler (37, 38, 54)

Memelilerde : Ratlarda da durum aynıdır. Mikropsuz ratların gaitalarında koku yapan maddeler (skatol, amin, H₂S) bulunmaz. Çünkü, bunların oluşa bilmesi için bakteri florasına ihtiyaç vardır. Ayrıca indol ve indican'a da raslanılamaz. Hayvanlar E. coli ile kontamine edilirse gaitalarında skatol çıkar (38,54).

4 — Fizyolojik ayrımlar

Gerek mikropsuz kanatlıların ve gerekse ratların fizyolojik fonksiyonları (sindirim, solunum, dolaşım, sinir sistemi çalışması, hareket, ekskresyonlar, bakış, vs.), normal hemcinsleri ile aynıdır. Üreme ve gelişme bakımlarından da birbirlerine benzerler (38, 54).

Normal civcivlerin barsaklarında bulunan E. coli, Strep. liquefaciens gibi mikroorganizmalar, mikropsuzlara verildiğinde gelişme üzerine zararlı bir etkisi olmamasına karşılık, Cl. welchii A gelişmeyi önler. Normal hayvanlara penisilinli gıdaların verilmesi, Cl. welchii A'nın üremesine mani olduğu için, gelişmeyi artırıcı etkiye sahiptir. Halbuki, mikropsuzlarda, penisilinin gelişme üzerine etkisi yoktur (17).

Mikropsuz köpekler Strangulasyona, safra peritonitlerine konvensiyonallerinden daha fazla dayanıklıdırlar (47).

5 — Beslenme ayrımları

Mikropsuz ve normal hayvanların gıda almaları ve ihtiyaçları, kalitatif ve kantitatif olarak birbirlerine benzerler. Fakat ratlar bir istisna teşkil ederler. Bunların rasyonlarına biotin, folik asit ve vitamin - K ilâvesi gereklidir. Klâsik hayvanların bunlara ihtiyaçları yoktur. Bunların barsaklarında bulunan E. coli'ler folik asit teşekkülüne yardımcı olurlar (37, 55, 91).

6 — Serolojik ayrımlar

Kanatlılarda : Gnotobiyotik kanatlılarla, normalleri arasında serumlarında bulunan antikorlar bakımından ayrımlar vardır. Normal hayvanların serumlarında E. coli, laktobasil, Staph. aureus ve diğer etkenlere karşı antibakteriyel antikorlar bulunur. Germersizlerde ise yoktur (62). Yalnız, kuru gıda ile beslenenlerin serumlarında, ölü mikroorganizmalara karşı antikorlara raslanılmıştır. Fakat çok düşük titrededirler (85).

Germersiz piliçlerin (75 günlük) serumlarının yapılan muayenelerinde gamma - globulin seviyelerinin çok düşük olduğu bulunmuştur. Monokontaminasyon sonu titresi yükselir (90).

Normal civcivlerin kanlarında 4-5 haftalıktan itibaren spesifik antihuman - B kan grubu aglutininler bulunmasına karşılık, mikropsuzlarda yoktur. Eğer germsizler, canlı ve S-formlu E. coli O86 ile monokontamine edilirse veya etken gıdaları ile birlikte verilirse çok kuvvetli aglutininler teşekkül eder (78).

Memelilerde : Ratlarda (90 günlük) gamma - globulin seviyesi çok düşük olmakla beraber Alfa₂ ve Beta - globulin titreleri aynı şekildedir. Farelerde beta ve gamma, kobaylarda ise gamma globulinler olsa bile herhangi bir titre göstermezler (9). Germersiz ratların gamma - globulin seviyesi, normallerin, % 10 - 15 i kadardır. Gamma - globulinin yükselişi gençlerde yaşlılardan daha süratlidir (25). Normal flora, gamma - globulin'in tenbihi için lüzumludur (21,24). Germersiz ve normal ratlar, 250 gün içinde serumlarında, çeşitli hayvan alyuvarlarına karşı heterohemaglutininler meydana getirmezler. Properdin ve komplement gnotobiyotik hayvanlarda da vardır. Properdinin titresi aynı olmasına karşılık, komplementin 4 fraksiyonun titresi, normal hayvanlara göre daha düşük seviyededir (85). Oponik aktivite gerek normal ve gerekse germsizlerde aynı durumda bulunmuştur (74). Mikropsuz hayvanların lenfyumlarının kortikal bölgelerinde nadiren germinal bölgelere raslanır (63). Aynı zamanda lenfatik dokular da az gelişmiştir. Mikropsuz hayvanlarda fagositoz çok yavaş olduğu gibi fagositlerin de mikroplara karşı olan reaksiyonları yavaştır (38). Normal ve mikropsuz hayvanların serumlarında agar-jel diffüzyon, lâm aglutinasyon ve fluoresan antikor tekniği ile koagülaz pozitif stafilokoklara karşı antikorlar tesbit edilmiştir (8). Mikropsuz

hayvanlar E. coli ve bakteriyel endoksinlerine karşı, normallerinden daha dayanıklıdır (1, 31, 75). S. typhosa endotoksini gerek germsizlerde ve gerekse normal hayvanlarda (kobaylarda) hipotermi, lökopeni ve ölüm meydana getirir. Letal doz heriki grupta da aynı olmasına karşılık, hipotermi ve lökopeni teşkil eden doz, germsizlerin 1/3 ü kadardır (1). Germsiz ratların serumlarında opsonizan ve bakteriyolitik etkiler vardır. E. coli ile enfeksiyonda bu etkiler artar (41).

7 — Diğer ayrımlar

Mikropsuz rat ve fareler, X-ışınlarına karşı normal hemcinslerinden daha fazla dayanıklıdır. Hayvanların monokontaminasyonu, hassasiyetlerini artırır. Timektomi, konvensiyonal farelerde **Wasting sendromu** meydana getirmesine karşılık, mikropsuzlarda aynı operasyon bir etki yapmaz (63). Mikropsuz domuz yavrularının, Co⁶⁰ irradiasyonlarının supraletal dozlarına tahammülü, normal yavrulardan 3-4 defa daha fazla bulunmuştur (39). Viral enfeksiyonlara karşı hem mikropsuzlar ve hem de normal hayvanlar hassasdırlar. Yaşlı hayvanlara kortizon verilmesi veya X-ışınlarına maruz bırakılması viral enfeksiyonlara karşı hassasiyetlerini artırır (63). Mikropsuz civcivlerde Roux Sarcoma ultrafiltratı ile tümörler meydana getirilebilir (73). Germsiz ve konvensiyonal fare ve ratlara 3 — MCA (metilkolantren) şırıngası ile 24 hafta içinde multiple pulmoner tumorlar oluşturulabilir. Germsizlerdeki lezyon sayısı daha fazladır (33,59,64). Polycythemic virus şırınga edilmiş farelerdeki lezyon sayısı, normal hayvanlardan 9 misli daha fazla bulunmuştur (42). Polyoma virusu şırınga edilmiş germsiz farelerde wasting sendromuna tesâdüf edilememiştir (87).

Mikropsuz fareler damar içi yolla yalancı veba (Newcartle) virusu şırınga edildiğinde, dalak ve karaciğerin interferon reaksiyonları, normal farelerinkinden daha fazladır (16).

Mikropsuz fareler damar içi yolla yalancı veba (Newcastle) verilişinden 8 gün sonra yapılan analizlerde, fazla miktarda protein ve erimeyen nitrogenli bileşikler tesbit edilmiştir. Bu durum, sekumda bulunan proteinin hepsinin gıdadan gelmediğini, ekserisinin konakçıdan temin edildiğini göstermektedir (36). Gnotobiyotik

rat ve farelerin sekumlarında, normal hemcinslerine nazaran 10 misli fazla eriyebilir protein ve 20-200 misli eriyebilir karbonhidrat bulunur. Bunun yanısıra erimeyen materyaller 5-8 misli kadardır. Muhteviyatta yüksek moleküllü musin ve dahili anzimlerin bulunması, dijestiyon ve iç nitrogen rezorbsiyonunda bir bozukluğun olduğunu göstermektedir (35).

8 — Bakteriyel antagonizma

Mikropsuz kobaylar, *E. coli* ile monokontamine edilirse, bir kaç gün içinde ölürlür. Halbuki hayvanlara *Strep. faecalis*'de verilirse ölmezler. Kobaylar, biri insan diğeri kobaylara ait özel *E. coli* suşları ile dikontamine edilirlerse, hayvanlar kendilerine ait suşla enfekte olarak ölürlür. Kobaylar, *L.bifidus* ve *E. coli* ile enfekte edildiklerinde, birinci etken çok çabuk üreyerek barsak florasını kaplar. Buna karşılık *E. coli* yavaş ürer. Eğer, *L.bifidus* çok fazla verilirse, 12 gün içinde barsakta, *E. coli*'ye raslanılmaz. *L.bifidus*, *E. coli*'nin üremesini sınırlandırır (38).

E. coli kobayları, *Shigella flexneri* fareleri, pnömokok enfeksiyonlarına karşı korur (38). Fakat, *Shigella flexneri* 2a ya karşı koruyamaz (52). Colicinogenic *E. coli* (D. 955) suşu, barsakta, colicinogenik olmayan *E. coli* (681) suşunun üremesini durdurur (10).

Strep. faecalis var. *liquefaciens* mikropsuz ratlarda 3 ay içinde dişlerin dökülmesine sebep olmasına karşılık, klasik hayvanlarda bunlar görülmez, oral flora antagonizması buna mani olmaktadır (38). Gnotobiyotik ratlar, *Strep. faecalis* (ND - 547), *Strep. mutans* (GS - 5) veya *L. casei* suşlarından biri ile monokontamine edilip kariogenik diyetle beslenirse diş çürümeleri meydana gelir. Homolog bakteri ile immunize edilen ve aynı mikropla enfekte edilenlerde diş çürümesi görülemez (86).

Gnotobiyotik erkek fareler, dişilerden 6-15 misli daha fazla *N. brasiliensis*'e sahip olabilecekleri yapılan denemelerden anlaşılmıştır (66).

Kanatlıların normal barsak florası, *Candida* enfeksiyonlarına karşı hayvanları koruyabilir. Halbuki monoflora *B. cereus* veya *Strep. faecalis*, enfeksiyona mani olamaz. Diğer taraftan, kanatlı-

larda, *Alcaligenes faecalis*, *Staph. aureus* ve *B. subtilis*, ratlarda ise *B. anthracis*, mikrop florası olmadan daha etkilidirler (38).

Endamoeba histolytica, mikropsuz hayvanlarda hiç bir hastalık meydana getirmediği gibi barsakta 5 günden fazla da kalmaz. Hayvanların *E. coli*, *B. subtilis* ve *Aerobacter aerogenes* ile monokontaminasyonu ulseratif amöbiyazis'in oluşmasını sağlar (38,54). *E. histolytica*, ayrı ayrı 3 etkenle birlikte bulunursa hastalık yapabilir (56).

Gnotobiyotik hayvan	+	<i>E. histolytica</i>	+	<i>B. subtilis</i>	=	Yaygın ulserasyon
»	»	+	<i>E.</i>	»	+	<i>A. aerogenes</i> = Orta »
»	»	+	<i>E.</i>	»	+	<i>E. coli</i> = » »
»	»	+	—	—	<i>E. coli</i>	Lezyon yok
»	»	+	<i>E. histolytica</i>	+	— —	= » »
»	»	+	<i>E.</i>	»	+	Yaygın ulserasyon

Hindilerde *Histomonas meleagridis*, ancak barsak florası olduğu zaman veya monokontaminasyon hallerinde (*Strep. faecalis*) etkilidir ve karaciğerde lezyonlar yapar (38). Barsak normal florası, enterik enfeksiyonların seyrini değiştirebilir (2).

Gnotobiyotik Hayvanlar Üzerinde Yapılabilecek bazı Önemli Araştırmalar

- 1 — Üniorm hayvanlar üzerinde çalışarak iyi ve güvenilir sonuçlar elde etmek,
- 2 — Mikrop florasının beslenme üzerine etkisini araştırmak.
- 3 — Bakteri, PPLO ve virus kontaminasyonlarını ihtiva etmeyen doku kültürleri elde etmek ve kullanmak,
- 4 — İnterferens olayları,
- 5 — Mikroorganizmaların yaşlanma üzerine olan etkileri,
- 6 — Oral floranın dış çürümelerindeki rolü,

- 7 — Antibiyotiklerin etkisi,
- 8 — Kanserin etiyolojisinin incelenmesi ve onkolojik araştırmalar,
- 9 — Vitamin metabolizması ve diğer metabolik olayların incelenmesi
- 10 — Virolojik, allerjik, immunolojik araştırmalar,
- 11 — Monospesifik referense antiserumların elde edilmesi,
- 12 — Radyasyonların etkileri üzerinde araştırmalar,
- 13 — Mikrop florası olmadan çeşitli etkenlerin patogenitelerinin incelenmesi,
- 14 — Kimyasal maddelerin toksikolojik ve diğer etkilerinin araştırılması,
- 15 — Yaraların iyileşmesinde intestinal floranın ve diğer özel etkenlerin rollerini tetkik etmek,
- 16 — Sindirim olayı, barsak permeabilitesi ve rezorbsiyon deneyleri,
- 17 — Antikor formasyonunun incelenmesi,
- 18 — Operasyon fizyolojisini araştırmak,
- 19 — Diğer bir çok ilmi ve ekonomik araştırmalar.

LİTERATÜR BİLGİSİ

- 1 — **Aberbathy, R.S. and Landy, J.J. (1967):** Increased Resistance to Endotoxin in Germ Free Guinea pigs. Proc. Soc. Exp. Med., 124 : 1279 - 1283.
- 2 — **Abrams, G.D. (1969) :** The Normal Microbial Flora and Resistance of the Small Intestine. Advance Study Institute. The Germfree Animal as a Tool in Research Leuven, Belgium. Abstract No. 12.
- 3 — **Asano, T. (1967) :** Inorganic Ions in Secal Content of Gnotobiotic Rats. Proc. Soc. Exp. Biol. med., 124 : 424 - 430.
- 4 — **Betts, A.O. (1969) :** Some Uses of Gnotobiotic Farm Animals. Advanced Study Institute. The Germfree Animal as a Tool in Research. Leuven, Belgium. Abstract No. 39.

- 5 — **Bleby, J. (1967):** Specific Pathogen Free Animals. The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals, 201-215. Third ed. Livingstone
- 6 — **Burmester, B.R. and Waters, N.F. (1955) :** The Role of the Infected Eggs in the Transmission Visceral Lymphomatosis. *Poult. Sci.*, 34: 1415-1429.
- 7 — **Calhoon, J.R. and Matthews, P.J. (1964):** A Method for Initiating a Colony of Specific Pathogen Free Guinea Pigs. *Lab. Animal Care* 14 : 388 - 394.
- 8 — **Cohen, J.O.L., Newton, W.L., Cherry, W.B. and Updyk, E.L. (1963) :** Normally Occurring Staphylococcal Antibodies in Germ Free Mice. *J. Immunol.*, 90: 358 - 367.
- 9 — **Cohendy, M. (1912) :** Expériences sur la vie sans Microbes. *Ann. Inst. Pasteur*, 26: 106 - 137.
- 10 — **Craven, J. and Miniats, O.P. (1969) :** Antagonism Between *Escherichia Coli* Strains in Dualinfected Gnotobiotics Pigs. *Advances Study Institute. The Germfree animal as a Tool in Research Leuven, Belgium. Abstract No. 6.*
- 11 — **Davey, D.G. (1962) :** Use of Pathogen Free Animals. *Proc. Roy. Soc. Med.*, 55: 256 - 259.
- 12 — **Dinsley, M. (1967):** Germ Free Animals. The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals, Third ed. 216 - 238.
- 13 — **Dinsley, M. 1969):** Genetic Management in Gnotobiotic Colonies. *Advance Study Institute, The Germfree Animal as a Tool in Research, Leuven, Belgium. Abstract No. 1.*
- 14 — **Duciaux, E. (1885) :** Présentée par M. Pasteur, *Physiologie Vegetale. Sur la germination dans un sol riche en matières organiques, mais exempt de microbes. C.r. hebdomadaire. Séances Acad. Sci., Paris, 100.66.68. Site. Reyniers, J.A. (1969): (Pure culture concept and gnotobiotics.) Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 78 : 3 - 16
- 15 — **Fahey, J.E. and Grawley, J.F. (1954) :** Studies on Chronic Respiratory Disease of Chickens. III. Egg Transmission of Pleuropneumonia-Like Organisms. *Canad. J. Comp. Med. Vet. Sci.*, 18: 67 - 75.
- 16 — **Fitzgerald, G.R. and Pollard, M. (1967) :** Interferon Production by Germ Free Mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 126: 245 - 249.
- 17 — **Forbes, M., Park, J.T. and Lev, M. (1959) :** Role of the Intestinal Flora in the Growth response of Chicks to Dietary Penicillin. *Ann. Y. Acad. Sci.*, 78: 321 - 327.
- 18 — **Foster, H.L. (1961):** Development of Specific Pathogen Free and Germ Free Animals. *Bio-Medical Review*. 1: 77 - 85.

- 19 — **Foster, H.L. and Black, C.L. (1969):** Utilizing the Germfree Rat in the Investigation of Clinical Manifestations Caused by a Filtrable Agent. Advance Study Institute. The Germfree Animal as a Tool in Research. Leuven, Belgium. Abstract No. 23.
- 20 — **Glimstedt, G. (1936):** Bacterienfreie Meerschweinchen. Acta Path. Microbiol. Scand. Suppl., 30: 1-295. Site. Reyniers, J. A. (1959): Pure Culture Concept and Gnotobiotics. Ann. N.Y. Acad. Sci., 78: 3-16.
- 21 — **Gordon, H.A. (1959):** Morphological and Physiological Characterization of Germ Free Life. Ann. N.Y. Acad. Sci., 78: 208-220.
- 22 — **Grisemer, R.A. and Gibson, J.P. (1963):** The Gnotobiotic Dog. Lab. Animal Care, 13 (pt): 648-649.
- 23 — **Gustafsson, B.E. (1948):** Germ Free Rearing of Rats. General Techniques. Acta Path. Microbiol. Scand. suppl. 73 : 1-130.
- 24 — **Gustafsson, B.E., and Laurell, C.B. (1958):** Gamma Globulin in Germ Free Rats. J. Exp. Med. 108: 251-258.
- 25 — **Gustafsson, B.E., and Laurell, C.B. (1959):** Gamma Globulin Production in Germ Free Rats after Bacterial Contamination. J. Exp. Med. 110: 675-684.
- 26 — **Gustafsson, B.E. (1959):** Lightweight Stainless Steel System for Rearing Germ Free Animals. Ann. N.Y. Acad. Sci. 78 : 17-28.
- 27 — **Hall, W.J., Legenhausen, D.H. and McDonald, A.D. (1949):** Studies on Fowl Typhoid. I. Nature and Dissemination. Poultr. Sci. 23 : 344-362.
- 28 — **Harven, E. (1964):** Virus Particles in Thymus of Conventional and Germ Free Mice. J. Exp. Med. 120 : 857-868.
- 29 — **Henthorne, R.D. and Kester, W.O. (1959):** Diseases Free Laboratory Animals as Related to Germfree Life. Ann. N.Y. Acad. Sci. 78 : 276-280.
- 30 — **Hudson, J.A. and Luckey, T.D. (1964):** Bacteria-Induced Morphologic Changes. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 116 : 628-631.
- 31 — **Jensen, S.B., Mergenhagen, S.E., Fitzgerald, R.J. and Jordan, H.V. (1963):** Susceptibility of Conventional and Germfree Mice to Lethal Effects of Endotoxin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 113 : 710-714.
- 32 — **Joshi, N., Blackwood, A.C. and Dale, D.G. (1964):** A Simple Chemical Method for Detection of Leaks in Flexible Isolator. Canad. J. Comp. Med. and Vet. Sci. 28 : 128-133.
- 33 — **Kelly, M.G., Newton, W.L. and O'Gara, R.W. (1963):** Susceptibility of Newborn Germfree Mice to Tumor Induction by 3-Methylcholanthrene. Cancer Res. 23 : 978-982. Site. The Year Book of Veterinary Medicine. (1964), Vol. 2, 361-362.

- 34 — **Küster (1915)** : Die Gewinnung, Haltung und Aufzucht Keimfreier Tiere und Ihre Bedeutung für die Erforschung Natürlicher Lebensvorgänge. Arbeiten Kaiser. Gesund. 48 : 1 - 79.
- 35 — **Loesche, W.J. (1968)** : Protein and Carbohydrate Composition of Cecal Content of Gnotobiotic Rat and Mice. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 128 : 195 - 199.
- 36 — **Loesche, W.J. (1968)** : Accumulation of Endogenous Protein in the Cecum of the Germfree Animals. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 129 : 380 - 384.
- 37 — **Luckey, T.D. (1959)** : Nutrition and Biochemistry of Germfree Chicks. Ann. N.Y. Acad. Sci. 78 : 127 - 165.
- 38 — **Luckey, T.D. (1965)** : Effects of Microbes on Germfree Animals. Advances in Applied Microbiol. 7 : 169 - 223.
- 39 — **Mandel, L., Miler, I. and Moravek, F. (1969)** : The Effect of Ionizing Radiation on Natural Resistance Factors in Germfree Piglet. Advanced Study Institute. The Germfree Animal as a Tool in Research. Leuven, Belgium. Abstract. No. 37.
- 40 — **Metchnikoff, E. (1903)** : Etudes sur la flore Intestinale. Ann. de L'Institut Pasteur. XXIII. 929. Site. Reyniers, J.A. (1959) : Pure Culture Concept and Gnotobiotics. Ann. N.Y. Acad. Sci. 78 : 3 - 16.
- 41 — **Midtvedt, T. (1969)** : Opsinizing and Bacteriolytic Effects of Sera from Gnotobiotics and Conventionalized Rats on 32 P - Labelled E. coli. Advanced Study Institute, The Germfree Animal as a Tool in Research. Leuven, Belgium. Abstract No. 35.
- 42 — **Mirand, F.A. (1969)** : The Response of a Polycythemie Virus in Germfree Mice. Advanced Study Institute. The Germfree Animal as a Tool in Research. Leuven, Belgium. Abstract No. 24.
- 43 — **Miyakawa, M., Iijima, S., Kobayashi, R., Tajima, M., Isomur, N., Shinizu, T., Kobayashi, I. and Asano, M. (1954)** : Report on Success of Long-term Rearing of Germfree Guinea pigs. Trans. Soc. Pathol. Japan. 43 : 450. Site. Reyniers, J.A. (1959) : Pure Culture Concept and Gnotobiotics. Ann. N.Y. Acad. Sci. 78 : 3 - 16.
- 44 — **Miyakawa, M. (1959)** : The Miyakawa Remote - Control Germfree Rearing Unit. Ann. N.Y. Acad. Sci. 78 : 37 - 46.
- 45 — **Miyakawa, M. (1959)** : The Lymphatic System of Germfree Guinea pigs. Ann. N.Y. Acad. Sci. 78 : 221 - 236.
- 46 — **Morris, J.H. (1963)** : Management of Specific Pathogen Free Guinea pig Colony. Lab. Animal Care, 13 : 96 - 100.
- 47 — **Nance, F.C., Cohn, I., Heneghan, J.B., Bornside, G.H., Kline, Crook, J.N., Tedesco, V.E. and Rusca, J. (1969)** : Germfree Dogs in the Study of the

- Surgical physiology of the Gastrointestinal Tract. Advanced Study Institute. The Germfree Animal as a Tool in Research. Leuven, Belgium. Abstract No. 19.
- 48 — **Nencki, M. (1886)** : Bemerkungen zur einer Bemerkung Pasteur's. *Naturyn. Schmiedeberg Arch. exp. Path. Pharmak.*, 20 : 385 - 388. Site. Dinsley, M. (1967) : Germfree Animals. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. 216 - 238. Third ed.,
- 49 — **Nuttal, G.H.F. und Thierfelder, H. (1897)** : Thierisches Leben ohne Bakterien in Verdauungskanal. (III. Mitteilung). *Versuche an Hühnern*. Hoppe - Seyler's *Z. Physiol. Chem.* 23 : 231 - 235. Site .Reyniers, J.A. (1959) : Pure Culture Concept and Gnotobiotics. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 78 : 3 - 16.
- 50 — **Paget, G.E. (1962)** : Pathologic State of Specific Pathogen Free Animals. *Proc. Roy. Soc. Med.* 55 : 262 - 263.
- 51 — **Pasteur, L. (1885)** : Observations Relatives a la note précédente de M. Duclaux. *C.r. Hebd. Séans. Acad. Sci. Paris*, 100, 68. Site. Dinsley, M. (1967) : Germfree Animals. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Lab. Animals*. S. 216 - 238.
- 52 — **Payzin, S. (1968)** : Gnotobiyoloji ve İmmunolojideki yeri. *Mikrobioloji Bulteni* 2 : 112 - 118.
- 53 — **Peter, W.L. (1962)** : Provision of Pathogenfree Animals. *Proc. Roy. Soc. Med.* 55 : 253 - 256.
- 54 — **Phillips, A.W. and Smith, J.E. (1959)** : Germfree Animal Technique and Their Applications. *Advances in Applied Microbiol.* 1 : 141 - 174.
- 55 — **Phillips, B.P., Wolfe, P.A. and Gordon, H.A. (1959)** : Studies on Rearing the Guinea-pigs Germfree. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 78 : 183 - 207.
- 56 — **Phillips, B.P. and Wolfe, P.A. (1959)** : The Use of the Germfree Guinea-pigs in the Studies on the Microbial Interrelationships in amoebiasis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 78 : 308 - 313.
- 57 — **Pleasants, J.R. (1959)** : Rearing Germfree Cesarean - Borne Rats, Mice and Rabbits Through Weaning. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 78 : 116 - 126.
- 58 — **Pleasants, J.R., Wostman, B.S. and Zimmerman, D.R. (1964)** : Improved Handrearing Methods for Small Rodents. *Lab. Animal Care.* 14 : 37 - 47.
- 59 — **Pollard, M. and Salomon, C. (1963)** : Oncogenic Effect of Methylcholanthrene in Newborn Germfree Mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 112 : 256 - 259.
- 60 — **Pollard, M. and Teah, B.A. (1963)** : Spontaneous Tumors in Germfree Rats. *J. Nat. cancer Inst.* 31 : 457 - 465. Site. *The Year BOOK of Vet. Med.* (1964). 2 : 360.

- 61 — **Pollard, M. and Matsuzawa, T. (1964)** : Radiation-Induced Leukemia in Germfree Mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 116 : 967-971.
- 62 — **Pollard, M. (1935)** : Germfree Animals and Biological Research. *Sci.* 145 : 247-251.
- 63 — **Pollard, M. (1967)** : Application of Germfree Animals to Problems in Comperative Medicine. *Advances in Vet. Sci.* 11 : 139-157.
- 64 — **Pollard, M. (1969)** : A Comparison of Neoplasma Induced in Germfree Rats by Chemical and Viral Oncogenic Agents. *Advanced Study Institute. The Germfree Animal as a Tool in Research.* Leuven, Belgium. Abstract No. 21.
- 65 — **Prier, J.E., Millen, T.W. and Alberst, J.O. (1954)** : Studies on Newcastle Disease. IV. The Presence of Newcastle Disease Virus in Eggs of Hens Vaccinated with Live Vaccine. *J. Amer. Vet. Med. Asso.*, 116 : 54-55.
- 66 — **Przjalkowski, Z. (1939)** : Parasitism in Germfree Laboratory Animals. *Advances Stundy Institute. The Germfree Animal as a Tool in Research.* Leuven, Belgium Abstract No. 7.
- 67 — **Raibaud, P., Dickinson, A.B., Sacquet, E., Charlier, H. at Mocquet, G. (1966)** : La Microflora du Tube Digestif du Rat. IV. Implantation Controlé chez le rat Gnotobiotique de differents Genres Microbiens Isolés du Rat Conventional. *Ann. d'Institut Pasteur*, 111 : 193-210.
- 68 — **Reyniers, J.A. (1942)** : Rearing of Cesarean borne M. rhesus Monkey under Sterile Conditions. *J. Bact.*, 43 : 778. Site. Reyniers, J.A. (1959) : Pure Culture Concept and Gnotobiotics. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 78 : 3-16.
- 69 — **Reyniers, J.A. and Trexler, P.C. (1943)** : The Germfree Tecnique and Its Application to Rearing Animals free from Contamination. In' *Micrurgical and Germfree Methods*, pp. 114-143. Ed. Reyniers, J. Springfield, III. Thomas. Site. Reyniers, J.A. (1959) : Pure Culture Concept and Gnotobiotics. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 78 : 3-16.
- 70 — **Reyniers, J.A. (1957)** : The Production and Use of Germfree Animals in Experimental Biology and Medicine. *Amer. J. Vet. Res.*, 18 : 678-687.
- 71 — **Reyniers, J.A. (1959)** : Pure Culture Concept and Gnotobiotics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 78 : 3-16.
- 72 — **Reyniers, J.A. (1959)** : Desing and Operation of Apparatus for rearing Germfree Animals. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 78 : 47-79.
- 73 — **Reyniers, J.A. and Sacksteder, M.R. (1959)** : Tumorigenesis and the Germfree Chickens. A Preliminary Report. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 78 : 328-353.
- 74 — **Saba, T.M., Filkins, J.P. and Luzio, N.R. (1967)** : Phagocytic and Opsonic Activites of Germfree Rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 125 : 634-636.

- 75 — **Schaedler, R.W. and Dubos, R.J. (1961)** : The Susceptibility of Mice to Bacterial Endotoxin. *J. Exp. Med.* 113 : 359 - 570.
- 76 — **Schottelius, M. (1908)** : Die Bedeutung der Darmbakterien für die Ernährung. III. *Arch. Hyg. Bakt.* 67 : 177 - 208. Site. Reyniers, J.A. (1959) : Pure Culture Concept and Gnotobiotics. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 78 : 3 - 16.
- 77 — **Skelly, B.J., Trexler, P.C. and Tanami, J. (1962)** : Effect of Clostridium Species upon Cecal Size of Gnotobiotic Mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 110 : 455 - 458.
- 78 — **Springer, G.F., Horton, R.E. and Forbes, M. (1959)** : Origin of Antihuman Blood Group B Agglutinins in Germfree Chicks. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 78 : 272 - 275.
- 79 — **Thorebecke, G.J., Gordon, H.A., Wagner, M. and Reyniers, J.A. (1957)** : Lymphoid Tissues and Serum Gamma Globulin in Young Germfree Chicks. *J. Infect. Dis.* 101 : 237 - 251.
- 80 — **Thorebecke, G.J. (1959)** : Some Histological and Functional Aspects of Lymphoid Tissue in Germfree Animals. I. Morphological Studies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 78 : 237 - 246.
- 81 — **Trexler, P.C. (1959)** : The Use of Plastics in the Design of Isolator System. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 78 : 29 - 36.
- 82 — **Trexler, P.C. and Skelly, B.J. (1963)** : Microbic Flora for the Gnotobiotic Laboratory Animal. *Lab. Animal Care* 13 : 609 - 615.
- 83 — **Uhr, J.W., Dancis, J. and Finkelstein, M.S. (1963)** : Passage of Bacteriophage ϕ X 174 Across Placenta in Guinea Pig. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 113 : 391 - 394.
- 84 — **Wagner, M. (1959)** : Determination of Germfree Status. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 78 : 89 - 101.
- 85 — **Wagner, M. (1959)** : Serologic Aspects of Germfree Life. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 78 : 261 - 271.
- 86 — **Wagner, M. (1969)** : Immunization Against Experimental Dental Caries in Gnotobiotic Rats. *Advanced Study Institute. The Germfree Animal as a Tool in Research. Leuven, Belgium. Abstract No. 16.*
- 87 — **Vandeputte, M., Sacquet, E. and DeSomer, P. (1969)** : Effect of Polyomavirus on Lymphoid Tissue of Germfree and Conventional Mice. *Advanced Study Institute. The Germfree Animal as a Tool in Research. Leuven Belgium. Abstract. No. 22.*
- 88 — **Wollman, E. (1911)** : Sur L'elevage des Mouches Steriles. *Ann. Inst. Pasteur*, 25 : 79 - 88.

- 89 — **Wostmann, E. (1913)** : Sur L'eleavage de tétards Stériles. Ann. Inst. Psteur, 27 : 154 - 161.
- 90 — **Wostmann, B.S. (1959)** : Serum Protein in Germfree Animals. Ann. N. Y. Acad. Sci. 78 : 254 - 260.
- 91 — **Wostmann, B.S. (1959)** : Nutrition of the Germfree Mammals. Ann. N. Y. Acad. Sci. 78 : 175 - 182.
- 92 — **Young, G.A. (1957)** : Özel Görüşmeler. Nebraska, Ziraat Fakültesi, Animal pathology Dept. Nebr. U.S.A.

Bu yazı, yazı kuruluna 5.VII.1970 de verilmiştir.