

# A GAZDASZERVEZET—MIKRÓBA KAPCSOLAT ÚJ VIZSGÁLÓESZKÖZE: A CSÍRAMENTES ÁLLAT

GORDON HELMUT és PESTI LÁSZLÓ<sup>1</sup>

Department of Pharmacology, College of Medicine, University of Kentucky, Lexington,  
Kentucky, USA

## Bevezetés

A csíramentes (gnotobiota) állatok, amelyek csírák nélkül vagy ismert csírákkal együtt élnek, legjobban a mikrobiológiában használt „tisza tenyészet” elnevezéssel jellemezhetők. A gnotobiotákkal végzett kísérletek segítségével tanulmányozhatjuk a gazdaszervezet és a benne élő vagy bekerülő mikrobák kapcsolatát, mivel (1) ezek a kísérletek képet adnak a „magára hagyott” vagy a mikrobák által befolyásolt gazdaállatok szervezetéről; (2) a kísérletek lehetővé teszik a flóra tagok egymásra kifejtett hatásának tanulmányozását a szervezeten belül; és (3) a kísérletek segítségével vizsgálhatunk sok exogén és endogén faktort a szervezeten belül, baktérium hatás kizárása mellett. Más szóval, a csíramentes állatokkal végzett kísérletekben olyan állatokat használunk, amelyek mikrobiológiai értelemben is standardizáltak egyéb jellemzőik (tartás, takarmányozás módja, törzs stb.) mellett.

A csíramentes kísérletek koncepcióját általában PASTEUR-nek (223) tulajdonítják. Azt azonban már PASTEUR előtt is felismerték, hogy a biológiai kísérletekben „tisza” kísérleti alanyokra van szükség. Erre utalnak PASTEUR, DUCLAUX munkájára (71) tett megjegyzésén kívül BOUSSINGAULT (33) kísérletei is, amelyeket a szerző a múlt század első felében a növények nitrogén megkötésével kapcsolatban „steril” talajban végzett. A csíramentes kísérletekkel foglalkozó összefoglaló munkák jó része (pl. 164, 178) részletesen foglalkozik PASTEUR koncepciójával. Kevésbé ismert azonban, hogy SCHOTTELIUS (290), aki a csíramentes kutatások egyik úttörője volt, és fiatal korában néhány évet PASTEUR laboratóriumában is eltöltött, kiegészítette mesterének szófukar módon közölt gondolatait: PASTEUR, a csíramentes kísérletek lényegét vázolva arról beszélt, hogy a mikroba társak kiküszöbölése után a csíramentes állat élete valószínűleg lehetetlenné válik. Feltételezte, hogy a filogenezis során a mikroba társak szinergistákká és ezáltal az állat életéhez nélkülözhetetlenekké váltak. Csaknem ezzel egyidőben NENCKI (209) és később METCHNIKOFF (190, 191) ennek az ellenkezőjét állították. Szerintük a mikrobák a szervezet kárára vannak.

<sup>1</sup> „Visiting scientist” a Magyar Tudományos Akadémia Állategészségügyi Kutató Intézetéből, Budapest.

REYNIERS és munkatársai az 1940-es években, a Notre Dame-i Egyetem (USA) Lobund Intézetében voltak az elsők, akik minden kétséget kizáróan bebizonyították, hogy a magasabb rendű szervezetek mikrobák nélkül képesek élni: csíramentes patkányokat (267) és csirkéket (268) neveltek és tenyésztettek több generáción keresztül. Ezeknek a kísérleteknek az eredménye egyértelmű választ adott az előbb felvetett kérdésre, és egyben a csíramentes állatokat a kutatás céljaira első ízben rendelkezésre bocsátotta. Az 1950-es években az említett kutatócsoport az USA-ban és Gustafsson Lundban (Svédország) csíramentes patkány és egerkolóniákat létesítettek.

A csíramentes állatokkal végzett vizsgálatok során kezdettől fogva látni lehetett, hogy a csíramentes életnek a konvencionális élettől bizonyos mértékig eltérő jellemzői vannak, és ezek az állatok egyes külső behatásokra másképpen reagálnak. A celluláris és humorális védekező mechanizmusuk fejletlenségére (l. később) az antigén ingerek hiánya vagy erősen csökkent volta magyarázatul szolgált. A csíramentes állatoknak egyes „stressor” ágensekkel szemben tanúsított nagyobb ellenállóképességét (röntgenbesugárzás, WILSON és PIACSEK 344) vagy hosszabb életkorát (l. később) a mikrobás „teher”-től való megszabadulásnak tulajdoníthatjuk. Ilyen értelmezésben a mikrobiális flóra a konvencionális állat szervezetében komplikáló faktorként szerepel, sőt adott esetben károsan hat. Másfelől meg lehet állapítani, hogy a csíramentes állatokban a mikrobiális flóra hiánya az állatok normális növekedésében és szaporodásában jelentős változást nem okozott. Ezek az utóbbi tények akkor váltak nyilvánvalóvá, amikor már a csíramentes kísérletek körülményeit egyre jobban standardizálni lehetett, és az alapos vizsgálatok számára egyre több normális úton született, anya által szoptatott, felnőtt csíramentes eger és patkány állt rendelkezésre. Kiderült az is, hogy a csíramentes és a konvencionális állatok sok morfológiai és funkcionális tulajdonsága hasonló. Ez a megállapítás főleg azokra a szervekre vonatkozik, amelyek baktériumokkal a konvencionális életben sem érintkeznek.

Végül meg kell említeni azokat a megfigyeléseket, amelyek szerint csíramentes állatok bizonyos vonatkozásban a normálistól eltérő, a kórossal határos működést mutatnak. Ezeket a később tárgyalandó elváltozásokat — bár végső soron a baktériumok hiányára visszavezethetők — nem lehet csupán a mikrobiális inger hiányára és az ennek következtében kialakuló szövetfejletlenség rovására írni. Szaporodik azoknak a megfigyeléseknek a száma, amelyek szerint a csíramentes állatok különféle szerveinek szerkezete, kémiai összetétele és működése a konvencionális állatokétól eltér. Ezeknek az elváltozásoknak egy része nem látszik befolyásolni a csíramentes állat szervezetének „ökonómiáját”; ezzel kapcsolatban utalunk arra a megfigyelésre (l. később), hogy a csíramentes állat bélsatornájában az emésztő fermentumok nagyobb koncentrációban vannak jelen. Más elváltozások viszont (mint például a megnagyobbodott vakbél) kifejezetten károsak a csíramentes állatok egész-

ségére. Ezek a megfigyelések arra mutatnak, hogy a gazda-állat szervezete önmagára hagyva nehezen állja meg a helyét, és normál baktériumflóra vagy a flóra egyes összetevőinek jelenléte szükséges a szervezet élettani egyensúlyának fenntartásához. Az antibiotikumokkal kezelt konvencionális állatokban kifejlődő egyes csíramentes sajátosságok (fejletlen védekező apparátus, GORDON és mtsai, 108; vakbél anomáliák, MEYNELL, 192) mutatják, hogy a gazdaszervezet és baktériumflórája közt fennálló szinergizmust a konvencionális élet körülményei között is meg lehet szakítani.

A csíramentes kutatásokkal kb. 2000 közlemény foglalkozik. Ez lehetővé teszi azt a kísérletes biológiában és orvostudományban ritkán előforduló körülményt, hogy az érdeklődő eredetiben olvashatja a témakör irodalmát. Mindazonáltal javasoljuk és hasznosnak tartjuk a régebbi, részben összefoglaló jellegű cikkek elolvasását is: KÜSTER (164), GLIMSTEDT (94), REYNIERS (261—263), REYNIERS és TREXLER (266), GUSTAFSSON (118), PHILLIPS és SMITH (230), GORDON (96, 98), MIYAKAWA (200), LUCKEY (178, 179), TREXLER (322, 323), PODOPRIGORA (243) és POLLARD (244). TEAH (312) jelentős mértékben megkönnyíti ilyen természetű munkánkat azzal, hogy a csíramentes kutatással foglalkozó dolgozatok címét és megjelenési helyét évenként egy füzetben összefoglalva közrebocsátja.

Közleményünkben igyekszünk rámutatni a csíramentes állatokkal végezhető kísérletek lehetőségeire és korlátaira. Munkánk tekintélyes része a normál baktériumflóra hatásaival foglalkozik a csíramentes és konvencionális állatokkal végzett összehasonlító vizsgálatok tükrében. Foglalkozunk egyes flóratagoknak a szervezetre kifejtett hatásával. Kevés adatunk van arra vonatkozóan, hogy (1) az egyes flóra tagok egymásra hogyan hatnak, és (2) a gazdaszervezet a flórát milyen mértékben befolyásolja. Azokat az irodalmi adatokat választottuk megbeszélésre, amelyekben megítélésünk szerint a flóra jelenlétét vagy hiányát megbízható módon úgy tanulmányozták, hogy az eredményeket az állatok esetleges nem megfelelő felnevelése, tartása és takarmányozása nem zavarta. A kísérletek optimális feltételeit azokban az emlősökben találjuk meg, amelyek csíramentes állapotban szaporodni képesek, és csíramentes kolóniákból származnak. Mindezeket figyelembe véve a patkányt és az egeret (és adott esetben a csirkét) előnyben részesítettük azokkal az állatfajokkal szemben, amelyeket csak újabban sikerült a második generációig csíramentesen tenyészteni (nyúl, tengerimalac, kutya); és azokkal szemben is, amelyek jelenleg is csak császármeteszéssel nyerhetők (juh, sertés, macska).

A csíramentes kutatás néhány speciális területét (vírusokkal történő kontaminálás, 246; a flóra semlegesítése antibiotikumokkal, 325; a csíramentes állatok táplálkozásélettana, 43; a röntgenbesugárzás hatása, 28 és a rák keletkezése, 281) újabban összefoglalták, ezekre a kérdésekre mi nem térünk ki.

### Terminológia, kritériumok

A csíramentes kutatások terminológiája lényegében REYNIERS és mtsai (269) közleményén nyugszik. Az Egyesült Államok Tudományos Akadémiájának Laboratóriumi Állatokkal Foglalkozó Intézete (The Institute of Laboratory Resources of the National Academy of Sciences, Washington, D.C.) egyik monográfiájában (95) a következőket írja: „Számos kísérlet történt a csíramentes technológia terminológiájának rendszerbe foglalására, de egyetlenegy sem került általános bevezetésre. Az alábbiakban azokat az elnevezéseket említjük, amelyek legjobban elterjedtek, és amelyeket az ezen a területen dolgozó kutatók zöme ismer. *Gnotobiotikus* (állat vagy növény): a görög ‚gnotos‘ és ‚biota‘ szavakból származó melléknév, amely ismert flórájú és faunájú gazdaszervezetet jelez. *Gnotobiota*: olyan állatot, állattörzset vagy tenyészetet jelent, melyet steril császarmetszéssel (vagy tojások steril keltetésével) nyertek és csíramentes technika segítségével, megszakítás nélkül steril izolátorokban tartottak és neveltek; a gnotobiota elnevezés olyan állatokat is megillet, amelyekben a rendelkezésre álló legújabb és legjobb módszerek szerint meghatározott, ismert összetételű baktérium vagy egyéb mikroorganizmus populáció található. *Csíramentes* (germfree vagy axenic) *állat*: olyan gnotobiota, amely mentes minden kimutatható mikroorganizmustól (baktérium, vírus, gomba, protozoon, egyéb szaprofita vagy parazita organizmusok). *Meghatározott flórájú állat* (defined flora animal): olyan gnotobiota, amelyet steril izolátorban tartunk és sajátmagunk asszociáltunk egy vagy több *ismert* mikroorganizmussal.”

A szervezetben (bélesatorna, légutak és a bőrtakaró) élő kommenzális baktériumokat általában, összefoglaló névvel, normál baktériumflórának nevezzük. A csíramentes terminológiában használják a *kontamináló* baktérium elnevezést is. *Ex-csíramentes* az az állat, amely csíramentesen született, és egy ideig csíramentesen élt. *Konvencionizált ex-csíramentes* állatok konvencionális társaik normál flóráját (rendszerint vakbél tartalmát) kapták. A rendszer, megszokott körülmények között tartott állatokat *konvencionális* állatoknak nevezzük. A csíramentes kísérletekben használt *konvencionális kontrol* („open conventional” vagy csak „conventional control”) állatok alatt értjük azokat a nyílt környezetben tartott állatokat, amelyeknek a csíramentes állatokkal megegyező genetikai hátterük van, és ugyanazt a sterilizált tápot eszik, mint csíramentes társaik. Az *izolátor konvencionális* állatok normál flórával rendelkeznek, izolátorban élnek, és sterilizált tápot kapnak. Tekintettel arra, hogy egyes állatfajokban (főleg rágcsálókban) a császarmetszés utáni mesterséges tápetetés maradandó anomáliákat okozhat, szükségesnek látszik különbséget tenni ezek az állatok és a csíramentes környezetben normálisan született, anyjuk által szoptatott állatok között. Az előbbiekre a csíramentes „császarmetszéssel született” („cesarean born”) elnevezést, az utóbbiakra a

csíramentes „*normálisan született*” („normal born”) nevet használjuk. A felsorolt „terminus technicus”-okat széles körben használják. Más szerzők által esetenként használt, az előbbiektől eltérő elnevezések értelmezéséhez az illető szerző közleményének elolvasását javasoljuk.

A csíramentes állatok sterilitásának megőrzését, mindennemű csíra távol-tartását nem lehet abszolút kritériumok szerint biztosítani. Az állatok már az anyjuk méhében, a magzati fejlődés során fertőződhetnek (főleg egyes vírusok esetében, egérben); mikrobák behatolhatnak steril izolátorba az elégtelenül csíráatlanított táp, levegő és használati tárgyak közvetítésével. Nehézségeket okozhat az is, hogy egyes mikroorganizmusokat csak bonyolult módszerek segítségével lehet kimutatni. A sterilitás kimutatására szolgáló, széles körben elterjedt módszereket WAGNER (327) munkájában találhatjuk meg. Az újabb tudnivalókat FULLER (89) foglalta össze. Egy korábban már idézett (85) közlemény erről a kérdésről a következőket írja: „A csíramentes állatot olyan gnotobiotának lehet nevezni, amely mentes minden egyéb mikroorganizmustól, amennyire ezt a tényt a rendelkezésre álló vizsgáló módszerek korlátai megengedik kimondani. Állatokat baktérium-, gomba-, protozoon- és metazoonmentesen nagy biztonsággal lehet nevelni. Ezeknek az állatoknak a vírusmentessége azonban nyitott kérdés marad, mivel látens, nem kimutatható vírusok jelen lehetnek.” GUSTAFSSON (119), POLLARD (246, 247), PARKER és mtsai (222) és POLLARD és KAJIMA (248) vírust csíramentes patkányokban és egerekben az esetek túlnyomó többségében nem találtak, pedig különböző vizsgáló eljárások egész sorát használták. POLLARD és MATSUZAWA (250) csíramentes egerekben teljes test röntgen besugárzással rejtett leukémia vírust mutattak ki. Újabbán ASHE és mtsai (11) csíramentes patkány állalatti nyálmirigyében vírus-szerű ágenst találtak. Az utóbb idézett inkonzisztens eredményeknek oka lehet, hogy a csíramentes állatokat adó konvencionális kolóniákban esetenként vírusok jelenhetnek meg, és a vírusok a placentán keresztül a magzatba juthatnak.

A kísérleti állatok csíramentes állapotának megőrzésére és fenntartására szolgáló berendezésekre és eljárásokra vonatkozóan irodalmi adatokat bőven találunk (116, 119, 198, 264, 321). Ezek leírják azokat a berendezéseket, felszereléseket, amelyek segítségével az érett magzatokat az anyaméhéből vagy a csirkeembriókat a tojásból a levegőszűrőkkel és gumikesztyűkkel ellátott, hővel vagy vegyszerrel sterilizált, rozsdamentes acél vagy plasztik izolátorokba lehet juttatni. Foglalkoznak a csíramentes tenyészetek fenntartásához szükséges mindennapi feladatokkal, a tápok, ivóvíz, alom és egyéb felszerelési tárgyak autoklávval, besugárzással vagy szűrővel történő sterilizálásával. A csíramentes állatokat és egyéb tárgyakat az izolátorokból egy sterilizálható „átadó zszipen” keresztül juttatjuk ki vagy be.

A flexibilis plasztik izolátor bevezetése, az ezzel az izolátorral kapcsolatos egyszerűsített felszerelések és módszerek (321), a csíramentes állatoknak

és sterilizálható tápnek a kereskedelmi forgalomban történő megjelenése, a csíramentes állatok szállításának „szállító-izolátorokkal” történő megoldása a csíramentes állatokkal végzett kísérletek végzésének lehetőségét majdnem minden laboratórium elérhető közelségébe hozta.

### A gazdaszervezet mikróbatársai

ANTHONY STANDEN, a jó humorral és filozófusi bölcsességgel megáldott tudományos kutató a csíramentes kutatás úttörőiről 1952-ben (305) azt a megjegyzést tette, hogy azok az emberek, akik életük java részét arra áldozták, hogy kiderítsék: hogyan lehet a gazdaszervezettől a baktériumokat távoltartani, munkájuk sikeres befejezésével rögtön azon törik majd a fejüket, hogy a baktériumokat a korábbi helyükre hogyan tegyék vissza. Ebben a megállapításban sok igazság van.

Az a kutató, akit főleg a gazdaszervezet reakciói érdekelnek, hajlamos arra, hogy a baktériumflórát egy egységnek, egy egységes „csomagnak” tekintse, amelynek sokféle hatása van az állati szervezetre. Ilyen értelemben CSÁKY (54) kifejezését kölcsönvéve azt mondhatnók, hogy a flóra a testnek egyik „szerve”. A mikrobiológus számára azonban, aki a bonyolult összetételű és sokféle hatást kifejtő flórával dolgozik, ezek a megfogalmazások túl leegyszerűsítetteknek látszanak. Ilyen ellentmondások, amelyek különböző tudományágak sajátosságaiból származnak, az irodalomban gyakran találhatók.

A kutatónak a mikrobiális flóravizsgálatokkal kapcsolatban két, nem is nagyon könnyen megválaszolható kérdés merül fel: (1) Vajon a flórának a szervezetre kifejtett hatása „összflóra” hatás-e, tehát valamennyi flóratag egyformán pozitívan részt vesz-e benne; vagy pedig a hatás azon alapszik, hogy egyes flóratagok a többi flóratagot „ellenőrzésük” alatt tartják vagy éppenséggel inaktíválják? (2) A flórának a szervezetre kifejtett hatását színergetikusnak, indifferensnek vagy egyszerre mind a háromnak értékelhetjük-e?

A mikrobiális flórára vonatkozó terjedelmes irodalom a részletesebben érdeklődőt kielégíti; utalunk ezzel kapcsolatban ROSEBURY (272), HAENEL (130), DUBOS és mtsai (69), MOORE és mtsai (204), SMITH (301) és DONALDSON (65) összefoglaló jellegű munkáira.

### *A normál flóra kialakulása és jellemzői*

Konvencionális anyától történő születés után az újszülött állat a bélcsatornájában (és egyéb, bakteriális szennyeződésnek kitett helyeken) rövidesen nagyszámú és vegyes baktériumtömeget halmoz fel. Az újszülött a

mikrobákat az anyjától és a környezetétől válogatás nélkül kapja (ROSEBURY, 272). A baktériumok száma és minősége igen változó. SMITH és CRABB (300) emlősök (beleértve embert is) első élethetében található flóráját vizsgálva bizonyos fokú flórahasonlatosságot vélt felfedezni az egyes fajok között. Az állatok életkorának előrehaladtával jellemző, eléggé gazdaspecifikusnak tekinthető minőségi flórákülönbségek alakultak ki. PESTI (226) 24 órás malacok vastagbélében nagyszámú *E. coli* baktériumot talált. A malacok életének első hetében az *E. coli* száma nagy maradt, azután pedig a clostridiumok száma kezdett emelkedni. A 4 hetes kor elérése után a bélflórában a lactobacillusok és enterococcusok uralkodóvá váltak, és az *E. coli* és a clostridiumok száma csökkent. A malacok duodenumában és jejunumában csupán kisszámú lactobacillust és enterococcust talált; az ileumban, vakbélben, vastagbélben és végbélben ezeknek a száma lényegesen nagyobb volt, és a bélszakaszok *E. coli*-t is tartalmaztak. A vastagbélben kis számban clostridiumok is kimutathatók voltak. Idősebb állatokban (másfél éves korig) nagyjából ugyanezt a flóráképet találta azzal a különbséggel, hogy az *E. coli* és a clostridiumok a felsőbb bélszakaszban is előfordultak. Nagyjából hasonló megfigyelésekre jutottak WILBUR és mtsai (340) is.

RAIBAUD és mtsai (251) fiatal patkányok belében, nem sokkal a születés után, nagy és állandó számban lactobacillusokat találtak. Ezenkívül, az elválasztás korának eléréséig veillonellákat, actinobacillusokat, streptococcusokat és *E. coli*-t mutattak ki. Az elválasztás után a colibaktériumok száma csökkent. RAIBAUD és mtsai (252) arra is utaltak, hogy felnőtt patkányokban az uralkodó flóratagok a lactobacillusok, streptococcusok, enterobaktériumok, clostridiumok és a gombák.

DUBOS és mtsai (70) szerint az egészséges egerek bélsatornájában, születés után, a lactobacillusok, streptococcusok és bacteroidesek vannak legnagyobb számban. Az első két baktériumfaj a gyomorban és az összes bélszakaszokban egyaránt előfordul, a bacteroidesek azonban csak a vastagbélben telepednek meg. Mindhárom baktériumfaj legnagyobb számban a bél nyálkahártyáját normális körülmények között borító nyálkarétegben volt. E baktériumoknak nagy az igényük a táptalaj iránt, és kitenyésztésük rendszerint csak anaerob körülmények közt sikerül. Az említett összetételű bélflóra a vizsgált állatok életének végéig (két év) gyakorlatilag nem változott. Eltérő genetikai háttérrel és eltérő származási helyű egerekkel hasonló eredményeket kaptak. A rendkívül tisztán tartott, ún. NCS egerek belében (287) gyakorlatilag csupán lactobacillusok, streptococcusok és bacteroidesek voltak kimutathatók; a kevésbé tisztán tartott kontrol egér csoportok béltartalmában *E. coli*-t, egyéb coliform baktériumokat, *Proteus vulgaris*-t, pseudomonast és clostridiumot is találtak. A szerzők feltételezése szerint a lactobacillusok, streptococcusok és bacteroidesek az autochthon („őslakó”) bélflórát alkotják, amely az evolúció folyamán a gazdaszervezettel szimbiózisba lépett.

Az autochthon flóra és az esetenként felszedett flóra alkotná egy adott állat-közösség normál („indigenous” vagy „bennszülött”) bélflóráját. A valódi és a potenciális patogén baktériumok az alkalmi flóratagok közé sorolandók. A szerzők szerint hasonló körülményeket találunk más állatfajokban is.

SAVAGE és mtsai (285) beszámoltak arról, hogy a bélsatorna baktérium-flórájának vizsgálata során a bakteriológiai vizsgálatokat szövettani megfigyelésekkel egészítették ki. A konvencionális, normális úton született, anya által szoptatott egerekben a születés után néhány nappal azt látták, hogy a nyelőcső alsó részén található hámsejteken és a gyomor laphámsejtekkel borított részén nagyszámú Grampozitív pálcá és coccus rétegben helyezkedik el. Az első élethét végén végzett vizsgálatokból kiderült, hogy az említett, főleg baktériumokból álló réteg a lumenben is megtalálható lactobacillusokból és streptococcusokból áll. Hasonló baktériumokat találtak a vékonybél szövettani készítményeiben is, azonban ott csak a lumenben voltak találhatóak, réteget nem képeztek. Az egyhetes egerek vakbelének és vastagbelének szövettani vizsgálatával Grampozitív és Gramnegatív pálcákat és streptococcusokat mutattak ki. Ezután a baktériumoknak említett csoportja fokozatosan eltűnt, és helyüket fusiform pálcák foglalták el, amelyek a bélnyálkahártya felületén nyálkába ágyazott réteget alkottak. Ezeknek a fusiformisoknak a száma egyre nőtt, és mennyiségük valamennyi egyéb, ott található baktériumfajhoz viszonyítva lényegesen (1 : 1000 vagy több) nagyobb volt. Noha a vastagbélből bacteroideseket és clostridiumokat tenyésztani lehet 12 napos korban is, a szövettani készítményekben ezek a fusiformisokkal nem téveszthetők össze. Ezenkívül BROWNLEE és MOSS (36), valamint SAVAGE és DUBOS (284) konvencionális patkányok és egerek gyomrában egy állandó „ottlakó” gombát is találtak.

A rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján az a benyomásunk, hogy a születés után a bélbe kerülő baktériumok túlnyomó része nem tud a bélben megtelepedni, kénytelen a szervezetből távozni. A felnőtt kor felé tartó állatokban azok a baktériumok képesek tartósan megmaradni, amelyek a gazdaszervezettel szimbiózisba lépnek. ROSEBURY (272) szerint azok a baktériumok érnek el „sikert, amelyek a szervezet egy megfelelő részét kellő számban érik el, ott kedvükre való szaporodási feltételeket találnak, és a megtelepedésük akadályait le tudják küzdeni”. A megtelepedett baktériumokhoz, főleg a kor előrehaladtával, átmenetileg potenciálisan patogén vagy egyéb baktériumok is csatlakozhatnak.

Az a felismerés, hogy a baktériumflóra vagy annak egyes tagjai a bélsatorna nyálkahártyáján nyálkába ágyazott réteget képeznek, megváltoztatja azt az elképzelésünket, hogy a bél baktériumpopulációja a bélsatornában egyenletesen oszlik el. SAVAGE és mtsai (285) figyelmünkbe ajánlják, hogy a szervezet egyes helyein önálló életközösségek alakulnak ki, amelyek 1—2 fajta baktérium szintenyészetének vehető, nyálkával védett tömegéből



állnak, és egyszerre fejtik ki hatásukat a gazdaszervezetre és a velük érintkező (pl. a bél lumenében levő) egyéb baktériumpopulációra is. Ez a tény a jövőben nem hanyagolható el, különösen abban az esetben kell számításba venni, ha csíramentes állatokban a bélnyálkahártya élettanát kívánjuk tanulmányozni.

### *Kísérletek a flóra meghonosítására csíramentes állatokban*

Számos meggyőző bizonyítékkal rendelkezünk arra, hogy a konvencionális állatok normál flórája az ugyanolyan fajú csíramentes állatokban könnyen megtelepíthető. GORDON és WOSTMANN (109) rámutatott arra, hogy csíramentes patkányok néhány hét leforgása alatt a konvencionális életükre jellemző morfológiai és élettani sajátságait visszanyerik, ha az állatokba a konvencionális kontrol állatok vakbél tartalmának kis részét szájon át bejuttatjuk. Ugyanez történik a csíramentes állatokkal akkor is, ha módjuk van konvencionális társaikkal közvetlenül érintkezni. A konvencionális béltartalommal néhány órája „fertőzött” állatok vakbél tartalmának bakteriológiai vizsgálatok kiderült, hogy a vakbél összcsíraszám és a fontosabb flóra-összetevők száma a konvencionális állatok vakbélflóra értékeitől nem sokban tér el. Általánosságban ki lehet jelteni, hogy az említett módokon ex-csíramentessé tett állatok közt a konvencionális állapotba való átváltás következtében elhullások nem jelentkeztek. A csíramentes állatok időnkénti konvencionális állapotba való átváltását a tenyésztők rutinszerűen végzik abból a célból, hogy a kétfajta állatcsoport között a szoros genetikai kapcsolatot megtartsák.

A vizsgálatok egy másik része arra irányult, hogy a normál flóra ismert elemeiből baktérium tenyésztési eljárásokkal, *in vitro*, egy mesterséges flórát állítsanak össze, amely csíramentes állatokba bevive, a bélsatornában ugyanúgy eloszlik, és ugyanolyan hatást fejt ki, mint a konvencionális állat bélflórája. Ezek a mesterséges, ismert normál flóra előállítására irányuló kísérletek a gazdaszervezet—mikróba kölcsönhatás vizsgálatának kritikus pontjai. A korábbi próbálkozásokat LUCKEY (179) foglalta össze. SKELLY és mtsai (298) a konvencionális egerek vakbél tartalmát csíramentes egerekbe juttatták, és ezt az eljárást ötször megismételték úgy, hogy az ex-csíramentessé tett egerek vakbél tartalmát használták a következő csíramentes csoport kontaminálására. A vakbél baktériumflóráját minden csoportban meghatározták. Azt látták, hogy az első passzázs ex-csíramentes egereinek vakbélében *E. coli*, *aerobacter*, *proteus*, *bacteroides*, *micrococcus* és *clostridiumok* fordultak elő. A negyedik átvitelről kezdve a vakbélből a *proteus* és a *micrococcusok* eltűntek. A megnagyobbodott vakbél (a csíramentes rácsálók legjellemzőbb tulajdonsága) minden esetben konvencionális méretűre csökkent. Ezután a szerzők csíramentes állatok egy-egy csoportjába *clostridium* törzset és két *bacteroides* törzset vittek be. A kontaminálás után 2—4 nappal az állatok vakbél súlya a konvencionális kontrolok vakbél súlyához közeledett, és a kísérlet befejezéséig

(3 hét) azon a szinten is maradt. A clostridium törzset *Clostridium difficile*-nek azonosították. Az ATCC (American Type Culture Collection) 90556 számú típus-törzse hasonló eredményt adott. Konvencionális egerekből kitenyésztett aerob baktériumtörzsek a vakbél súlyát nem csökkentették. HUDSON és LUCKEY (148) arról beszél, hogy egy, a konvencionális patkány féceszéből kitenyésztett streptococcus törzs a csíramentes patkányok vakbél súlyát 24 óra alatt 40%-kal csökkentette.

SCHAEDLER és mtsai (289) az említett NCS egerek meghatározott bélflóratagjait csíramentes egerekbe ültették. A lactobacillusokkal, streptococcusokkal és bacteroidesekkel kontaminált ex-csíramentes egerekben ezek a baktériumok az NCS egerekben talált számban és eloszlásban (70) voltak kimutathatók. Ezekben a gnotobiotákban és az utódaikban a vakbél alakja, szerkezete és méretei normálisaknak tűntek. Az előbbi kísérlet folytatásaként SCHAEGLER és mtsai (289) csíramentes egereket szájon át egy laktózt hosszú idő alatt bontó coliform baktériummal monokontamináltak; ez a baktérium az egész bélsatornában elszaporodott. Amikor ezeket a baktériumokat csíramentes egerekben továbbvitték, az izolált baktériumok legnagyobb része a laktózt rövid idő alatt bontotta. Abban az esetben, ha a lassú laktózbontó törzset NCS (konvencionális) egerekbe vitték, a törzs nem tudott elszaporodni, és megmaradó példányai lassú laktózbontók maradtak. Eljártak úgy is, hogy az NCS egerekből származó törzsekkel (lactobacillus, streptococcus, bacteroides) csíramentes állatokat oltottak be; ezáltal az egerek az NCS egerekhez hasonlóvá váltak. Ha ezekkel az ex-csíramentes állatokkal a laktózt lassan bontó coliform törzset megvitték, a törzs elszaporodott a bélsatornában, de laktózbontó képessége nem változott. Végül olyan kísérleteket is végeztek, hogy tetraasszociált (lactobacillus, streptococcus, bacteroides, coliform baktériumok) ex-csíramentes egereket NCS (konvencionális) egerek féceszével etettek; ekkor az addig nagyszámban található coliform baktériumok száma rövid idő alatt alacsonnyá vált. A szerzők ezeknek a kísérleteknek az alapján azt látják, hogy az NCS egerek egy időig még nem ismert, átvihető ágenszt adtak át az ex-csíramentes egereknek, amely képes a bélflóra összetételét megváltoztatni. A coliform baktériumok laktózbontó képességének változására magyarázatot nem találtak.

SASAKI és mtsai (282) kimutatták, hogy a konvencionális egér bélflóra tagjai ex-csíramentes egerekben monokontaminánsként több hétig megmaradnak. Ha csíramentes egereket konvencionális egerek kitenyésztett flóratagjainak kombinációjával (*E. coli*, streptococcus, lactobacillus, clostridium és bacteroides) etettek, akkor a bélsatornában valamennyi mikroorganizmus nagyszámban elszaporodott, és köztük antagonizmus nem volt észlelhető. PESTI és mtsai (228) kontaminálási kísérleteikben több olyan baktériumfajt használtak (*Clostridium difficile*, *Lactobacillus casei*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus* sp.), amelyeknek előzőleg csíramentes állat vakbél-anómália meg-

szüntető képességet tulajdonítottak; azt találták, hogy az alkalmazott baktériumfajok egyike sem volt képes a csíramentes egerek vakbelének *valamennyi* elváltozását megszüntetni. Azt azonban látták, hogy egyes vakbél-elváltozásokat az alkalmazott baktériumfajok képesek voltak megszüntetni (pl. a clostridium semlegesítette a csíramentes vakbél-tartalom bioaktív alfa pigmentjét; a lactobacillus a csíramentes vakbél-tartalom pozitív redox potenciálját a konvencionális egérben található erősen negatív értékre szállította le stb.).

Bizonyítást nyert tehát az a tény, hogy a konvencionális állat bélflórája vagy a flóra egyes elemei csíramentes állatokban könnyen megtelepíthetők. Ezt alapul véve azt mondhatjuk, hogy a csíramentes állat, kis megszorítással, jó mikrobiológiai tenyésztő talajnak bizonyul. Az eddig végzett alapos flóravizsgálatok azonban még nem adnak egyöntetű választ arra, hogy melyek azok a flóraösszetevők, amelyek önmagukban vagy több tag kombinációjában képesek a csíramentes állat valamennyi anomáliáját megszüntetni.

#### *A diéta hatása az állatokra*

A diétáról régen feltételezték, hogy a bélflórát befolyásolhatja, ugyanis a béltartalom nagy része a felvett táplálékból áll, s a gazdaállat szervezetén belül összetételénél fogva baktériumtenyésztő táptalajnak is vehető. A legismertebb példa erre az anyatejen vagy a tehéntejen nevelt csecsemő bélflórája közti különbség (bifidus flóra vs. Gramnegatív flóra, 129). Az elválasztás után a csecsemő bélflórája eléggé állandósul akkor is, ha különféle diéták széles skáláján tartjuk őket (131, 132). GRABER és mtsai (114) a rendes tápon tartott kontrolokhoz viszonyítva nagy zsírtartalmú diétán tartott patkányok bélflórájában csak csekély változásokat észleltek. Egy másik tanulmányukban (113) kimutatták, hogy patogén baktériumoktól mentes malacokban a nagy lipid- vagy nagy szaharóztartalmú diéta a bélflóra összetételét lényegében nem befolyásolta.

DUBOS és SCHAEGLER (68) fiatal NCS (patogén baktériumoktól mentesnek vehető) egereket kazeint és glutent mint egyedüli fehérje forrást tartalmazó, egyébként teljes diétán tartottak. Ezeknek az állatoknak a féceszében a rendes diétán tartott állatokhoz képest kisebb lactobacillus számot találtak. A szemisztetikus diétán tartott egerek féceszéből az R (rhizoid) típusú lactobacillusok is eltűntek. A rendes diétára visszatérve a fekális lactobacillusok száma növekedett. *Klebsiella pneumoniae* vagy *Staphylococcus aureus* intravénás befecskendezésére a szemisztetikus diétán tartott állatokban magasabb elhullási arányszámot találtak, mint a rendes diétán tartottak között. *E. coli* endotoxin intraperitoneális befecskendezése után a szemisztetikus diétán tartott állatok belében az enterococcusok és coliform bacil-

lusok száma hirtelen megnövekedett, a rendes diétán tartott állatokban ez a jelenség nem következett be.

WILKINS és LONG (342) rendes diétán tartott, felnőtt konvencionális egerek vakbelének és vastagbelének nyálkahártyáján fusiform baktériumokból álló vaskos réteget talált. Egy szintetikus, folyékony diétára (GREENSTEIN és mtsai, 115) áttérve a vastagbélből és vakbélből a fusiformisok eltűntek, és helyüket Grampozitív coccusok és pálcák foglalták el.

FITZGERALD és mtsai (84) szerint zsírt nem tartalmazó vagy magas zsírtartalmú diétán tartott konvencionális patkányokban a vastagbélflóra összetételét és a testsúlygyarapodást a koprofágia befolyásolja. A koprofágia megakadályozása (farokra illeszthető csésze segítségével) a féceszben a lactobacillusok számának csökkenését és a coliform baktériumok számának megnövekedését váltotta ki. A testsúlygyarapodás ezekben az állatokban 30%-kal alacsonyabb volt. A diéta összetétele (zsírtartalma vagy annak hiánya) az eredményeket nem befolyásolta.

Úgy tűnik, hogy a gazdaszervezet bélflórája érzékenyebben reagál a diéta változására az elválasztás előtt, mint az anyatejtől való megvonás után. A szervezet védekező erőinek (immunrendszerek stb.) a szoptatás alatt végbemenő fejlődése a flórára stabilizáló tényezőként hathat. Ha a felnőtt állat tápanyagokkal kellő mértékben ellátott, akkor a diéta változtatása a bélflóra fő komponenseinek számát és eloszlását nem változtatja meg. Másrésztől azonban, ha esszenciális tápanyagokkal nem mindig megfelelően ellátott szintetikus vagy szemiszintetikus diétát etetünk, számíthatunk arra, hogy az állat bélflórája lényeges mértékben megváltozik. A gazdaszervezet és a flóra versenghet a szűkösen levő tápanyagokért; egyensúlyi állapot alakulhat ki, ha a tápanyagok bőségben vannak. Szűkében levő tápanyagok esetében „cirkulusz viciózusz” alakul ki mind a gazdaszervezet, mind a bélflóra rovására. A koprofágia megakadályozása jó példa erre: a patkányoknál a természetes táplálék-körforgás megszakítása káros események láncolatát indíthatja el.

Itt lehet megemlíteni az ún. csíraszegény állatokat is, amelyek a sarkvidékeken élnek, az irodalomban ezekre már a századfordulón felfigyeltek (171). SIEBURTH (297) beszámol arról, hogy az Antarktison élő különféle madaraknak rendkívül kevés baktériumból álló bélflórájuk van, és ez az alacsony baktériumszám egy antibiotikum jellegű anyag (akrilsav) hatására vezethető vissza; ez a napi eledelüket képező planktonokból származó anyag a tartósan alacsony bélbaktériumszámmért valószínűleg felel. Ez a jelenség arra utal, hogy a diéta mérsékelt szelektív antibiotikum kiegészítésével a konvencionális életben talán lehetővé válik a bélflóra szinergista tagjainak megtartása és az antagonisták kiküszöbölése anélkül, hogy a gazdaszervezet egészségét veszélyeztetnénk.

### *A zárt környezet befolyása*

A csíramentes állatokkal végzett kísérleteket természetesen izolátorokon belül kell végezni. Ezek a kísérletek azonban konvencionális kontrolállatokat igényelnek, amelyek akkor megfelelők, ha az állatok a csíramentes csoporthoz közel állnak (fajta, kor, súly, diéta, stb.), és csíramentes típusú izolátorokban élnek. Az ilyen elrendezésű kísérletek elvégzését azonban megnehezítette, hogy az izolátorban tartott konvencionális állatok bélfloáját és a rendes konvencionális állatok flóráját nehéz volt azonos szinten tartani. Izolátorokban tartott tengeri malacokban és patkányokban (NELSON, 208, REBACK, 253) kimutatták, hogy az állatok bélfloája megváltozhat, és az állatok egészségi állapota az izolátorban eltöltött időtől, az izolátoron belül elvégzett takarítás minőségétől függ. Ezek a megfigyelések annak idején arra engedtek következtetni, hogy a konvencionális állatok izolátorokban való tartása, valamint a megváltozott bélfloa következtében fellépő egészségi károsodások közt összefüggés van, és úgy látszott, hogy ez a jelenség elkerülhetetlen.

REYNIERS és mtsai (270) ezeket a kérdéseket csirkékben vizsgálták. Frissen keltetett konvencionális csirkéket 50 napon keresztül rozsdamentes acélból készült, csíramentes típusú izolátorokban tartottak. A nemkívánatos „zárt” flóra kialakulásának megakadályozására az izolátorokba, naponként váltva, rendes konvencionális csirkéket vittek be („látogató rendszer”). Ezt azért tették, hogy a frissen bevitt csirkék normál flórájából (bélisrából) a bezárt csirkék a hiányzó flóratagokat felvehessék. A kísérlet befejezésekor azt látták, hogy a bezárt csirkék testsúlya és a vizsgált szervek súlya a normálistól nem tért el. GORDON és mtsai (104) látogatók bevitele nélkül, izolátor-konvencionális patkányokat vizsgáltak. A patkányokat szigorú higiénés körülmények között, 30 napos korukban az előzőleg sterilizált izolátorokba tették, és az állatokat 100 napos korukig figyelték. A kísérlet végén a bezárt patkányoknak normális testsúlyuk, szervsúlyuk és vörösvérsejtszámuk volt. Csupán, hasonlóan a csíramentes állatokban található értékekhez, a lép súlya és a fehérvérsejtek száma volt alacsonyabb. A bélfloában észlelt egyetlen változás a micrococcusok számának kismértékű emelkedése volt. PESTI és GORDON (227) 4 és 24 hónapos konvencionális egereket vizsgáltak. Azt tapasztalták, hogy a nyílt környezetben tartott egerek bélfloájában az életkor előrehaladtával a clostridiumok és staphylococcusok száma jelentős mértékben emelkedett. A csíramentes típusú izolátorokban tartott öreg állatokban ezeknek a mikroorganizmusoknak a száma alacsony szinten maradt.

E megfigyelések arra mutatnak, hogy az állatok izolátor típusú környezetben való tartása sem a bélfloát nem változtatja meg, sem az egészséget nem károsítja szükségszerűen. Az izolátoron belüli takarítás elhanyagolása károsan hathat a gazdaszervezetre és a flórára is, de ezt nem lehet értelemszerűen az izolátoron belüli élet rovására írni. Sőt, az izolátor barrierjei megakadályoz-

hatják a patogén baktériumok bejutását, amelyek iránt az öreg állatok szervezete különös vonzerőt gyakorol. Az izolátorban tartott konvencionális állat tehát előnyöket élvez, feltéve ha tisztán tartják. Ezt a feltételezést alátámasztja az is, hogy a SCHAEGLER és mtsai (287) által leírt, igen tisztán tartott NCS egerek kitűnő egészséggnek örvendtek, és patogén baktériumoktól gyakorlatilag mentesek voltak.

FUJIWARA és mtsai (88) figyelmeztetnek, hogy az élő szervezetnek plasztik izolátorban történő tartása káros is lehet. Ezek a szerzők azt találták, hogy a flexibilis plasztik izolátorokban sarjadt növények leveleinek kloroplaszt képzése csökkent. Feltételezték, hogy ennek oka a plasztik izolátor anyagából származó illó vegyület. Ezt a megállapítást figyelembe véve a szerzők egyike (P. L.) tanulmányozta a polivinil plasztik baktériumokra kifejtett hatását. Noha a folyékony táptalajba autoklávozott, kis darabokra vágott plasztik a staphylococcusok növekedését gátolta, a táptalajlemezen növekvő baktériumok szaporodását a néhány milliméterre a lemez fölött levő plasztik korong nem befolyásolta. Állatokkal ilyen jellegű kísérleteket még nem folytattak; azonban az a tény, hogy a rozsdamentes acélból vagy plasztikból készült izolátorokban tartott csíramentes állatok közt különbséget nem találtak, az ilyen természetű hatás létezését valószínűtlenné teszi.

### *Hogyan jutnak a mikróbák a gazdaszervezetbe?*

A gnotobiotikus kísérletek adatokat szolgáltatottak arra vonatkozóan is, hogy a mikróbák milyen úton kerülhetnek közvetlenül a szervezetbe. Feltételezték, hogy a mikróbák parenterális behatolásának egyik fontos helye a szájüreg. Erre abból következtettek (104), hogy a csíramentes patkányok állalatti nyirokcsomója a konvencionális kontrolokhoz képest lényegesen kisebb súlyú. A néhány órája konvencionálizált csíramentes állatok említett nyirokcsomójában található erős vérbőség alátámasztotta ezt az elképzelést. THONARD és mtsai (314) eredményei arra utalnak, hogy egyes antigének parenterálisan, az íny-fog határ mentén kerülnek a szervezetbe.

ABRAMS és BISHOP (4), valamint ABRAMS (1) megfigyelték, hogy hogyan kerülnek a *Salmonella typhi murium* baktériumok a csíramentes és konvencionális egerek bélszatornájából a regionális nyirokcsomókba. Megállapították, hogy a néhány óra alatt lezajló, a gyomorfalán és vékonybél falán keresztül történő mikrobiális passzázs (transzlokáció) a gyomor-bélszatorna lumenében található baktériumok számától függ; a transzlokációt nem a bél fal szövettani szerkezete (amely bizonyos különbségeket mutat csíramentes és konvencionális állatok között), hanem a baktériumok intraluminális populációja befolyásolja. Ha csíramentes és konvencionális egereket szájon keresztül egyforma számú *Salmonella typhi murium* csírával fertőztek, akkor az ex-csíramentes egerek bélszatornájában a konvencionális kontrolokhoz képest jóval nagyobb

számú baktériumot találtak, és a gyomorbélsatorna falán nagyobb számú csíra hatolt át. Ez arra utal, hogy a konvencionális állatok normál flórája gátolta a salmonellák elszaporodását. Ha csíramentes és konvencionális egerekben a belet lekötötték, és a lekötési helytől orálishan salmonellákat vittek be, akkor mindkét fajta állatban egyformán magas salmonella baktériumszámot kaptak; a konvencionális állatokban levő normál flóra salmonella elszaporodást gátló hatása tehát ilyen körülmények közt csökkent vagy megszűnt. Ezeknek a vizsgálatoknak az eredményei összhangban vannak MILLER és BONHOFF (194) észleleteivel. Utóbbi szerzők egerek belének mozgását vegyszerrel leállították, és az állatokat *Salmonella enteritidis*-szel fertőzték: a salmonella baktériumok a bélsatornában nagymértékben elszaporodtak. WOLOCHOW és mtsai (349) megerősítették ABRAMS és BISHOP (4) eredményeit. Patkányban végzett baktériumtranszlokációs kísérleteikben ők is azt tapasztalták, hogy párhuzam áll fenn a bél lumenében található mikrobák száma és áthatoló képessége között. Munkájukból arra is következtetnek, hogy a nem fertőző baktériumoknak bélfalon keresztül történő áthatolása a baktériumok méretétől is függ. CANADA és STRONG (38) a *Clostridium perfringens*-szel monokontaminált, ex-csíramentes és konvencionális egerek májában esetenként clostridium csírákat talált. Úgy tűnik, hogy bélbaktériumok „nem fertőző” passzázsát a bélfalon keresztül a bélmozgás csökkenése és a baktériumszám emelkedése segíti. Jelentős mértékű bakteriális transzlokáció léphet fel akkor, ha az ex-csíramentes szervezetben a mikroba monokontaminánsként van jelen (4). Ennek létrejöttében a mikrobiális antagonisták hiánya és a gátolt bélmozgás szerepet játszhat. Ez utóbbi anomália a csíramentes étellel együtt jár.

### A csíramentes vagy a mikrobák által befolyásolt gazdaszervezet

Csíramentes kísérletekhez túlnyomórészt patkányokat és egereket használunk. Ezek az állatok rendszerint csíramentes tenyészetekből származnak, és eredetük visszavezethető arra a néhány császármetszéssel nyert és mesterségesen felnevelt hímre és nőstényre, amelyek 15—17 éve a Notre-Dame-i (USA) és a Lund-i (Svédország) egyetemen láttak napvilágot. A törzstenyészetet úgy növelték, hogy császármetszéssel elvett újszülötteket tejelő csíramentes anyákkal szoptattak. Ezeknek az állatoknak több előnyük van: az állatok, illetve állományok kiegyenlítettek, normálisan gyarapodnak, megfelelő sterilizálható táp kapható részükre, és a kereskedelmi forgalomban könnyen megvehetőek. A csíramentes kísérletekben a csirkét is kiterjedten használják, részükre steril keltetési eljárásokat és megfelelő diétákat dolgoztak ki. Újabban a patkányokon és egereken kívül egyéb emlősöket is használnak. Ezek az állatok csíramentes állapotban általában nehezen vagy egyáltalán nem szaporíthatók; császármetszéssel nyerik őket és mesterségesen nevelik.

A gnotobiotikus kutató amikor a gazdaszervezettel foglalkozik, ismételtten felteszi a kérdést: „Létezik-e élet baktériumflóra nélkül?” A kérdést újabban módosítja: Létezik-e normális élet baktériumflóra nélkül? Igen gyakran hozzá teszi a harmadik kérdést is: Milyen hatást fejtenek ki a flóra vagy a flóra egyes tagjai a gazdaszervezetre? Mindezeknek a kérdéseknek vizsgálatában a konvencionális állatok használata a kísérleti terv szerves részét képezi.

#### *Anyagforgalom, táplálkozás-élettan, anyagcsere*

A csíramentes állatok anyagforgalmára röviden kitérünk, mivel ennek ismerete a mikrobiális flóra—gazdaszervezet kölcsönhatás további tárgyalását megkönnyíti.

*Patkányok és egerek.* A csíramentes patkányok, egerek és konvencionális társaik etetésére a megfelelő, szilárd tápok egész sora áll rendelkezésre (118, 168, 267, 350).

WOSTMANN és KELLOGG (358) olyan tápot állítottak össze, amelyben a tápanyagok, vitaminok és sók külön egységekben vannak, így a kísérlet igényeinek megfelelően az egyes alkotórészek a diétában változtathatók. Az említett tápok vagy szemiszintetikusak, vagy természetes összetevőkből állnak, és hővel vagy sugárzással sterilizálhatók. A tápokba a hőérzékeny összetevőkből feleslegben tesznek, hogy a sterilizálás alatt jelentkező veszteséget pótolni tudják. Az említett tápokon való tartás következtében a csíramentes állatok a konvencionális állatokhoz hasonlóan növekednek, és jól szaporodnak. Császármetszéssel elvett patkányok és egerek mesterséges tejdiétán történő felnevelése igen összetett munka (118, 267), manapság már ritkán alkalmazzák; noha MIYAKAWA (201) újabban fejlődésről számol be ezen a téren is.

Komoly érdeklődésre tarthatnak számot a kémiaiilag meghatározott, ismert, folyékony diéták amelyek kevés antigént tartalmaznak. Kidolgozásuk (238, 240, 364) GREENSTEIN (115) munkáján alapszik. REDDY és mtsai (259) szűrővel sterilizált, kémiaiilag ismert, vízben oldható, lényegében aminosavakból és glukozezból álló diétán csíramentes patkányokat megszületésüktől tenyészerett korig neveltek. PLEASANTS és mtsai (241) egereket tartottak ezen a diétán az 5. generációig.

DESPLACES és mtsai (61) kimutatták, hogy a csíramentes patkányok alapanyagcsereje és pajzsmirigyük jódmegkötő képessége a konvencionális kontrolokénál lényegesen alacsonyabb volt. WOSTMANN és mtsai (356) az alacsony alapanyagcsereje vonatkozó megállapítást megerősítették. Ugyanők megfigyelték, hogy a csíramentes patkány megnagyobbodott vakbelének sebészi eltávolítása után (37) az alapanyagcsere szintje normálissá vált. Tekintettel arra, hogy a vakbélmegnagyobbodás a flóra hiányának következménye, feltételezhetjük, hogy a csíramentes patkányok csökkent alapanyag-



cseréje valamilyen mikrobiális szabályozó mechanizmus kiesésének következménye (l. később).

LUCKEY (179) nem talált különbséget a csíramentes és a konvencionális patkányok takarmányfelvételének mértékében. COMBE és mtsai (48), valamint GORDON (101) csíramentes patkányokban és egerekben 10–20%-os takarmányfelvétel-növekedésről számolnak be. Utóbbi szerző egerek közt nagyobb vízfogyasztást is talált, az egerek nyilvánvalóan így kompenzálták az állandóan meglévő, enyhe diarrhéájuk által okozott vízhiányukat. LEVENSON és TENNANT (173), EVRARD és mtsai (78), LUCKEY (179) és REDDY és mtsai (259) csíramentes patkányokban a konvencionális kontrolokhoz képest megnövekedett fekális nitrogénürítést tapasztaltak.

A csíramentes és a konvencionális patkányok béltartalmának %-os nitrogén tartalmában alig lehetett különbséget találni, annak ellenére, hogy a csíramentes állatokból a mikrobiális fehérjék is hiányoztak, és az állatok több fekális nitrogént ürítettek (169). A csíramentes állatok béltartalmában és bélsarában lényegesen több, konvencionális állatokban lényegesen kevesebb szabad aminosavat, ureumot (48, 49, 78), hexozaminokat (174), mukoproteineket és mukopoliszaharidokat (175, 176) találtak; ezt a jelenséget vagy fokozott szekrécióval, vagy csökkent lebontási folyamatokkal hozták összefüggésbe.

A csíramentes állatok béltartalmának és bélsarának tripszin és kimotripszin tartalma lényeges mértékben megnövekedett (31, 175). REDDY és mtsai (254) megismételték és kiegészítették ezeket a vizsgálatokat azzal, hogy a hasnyálmirigy tripszinogén és kimotripszinogén szintje a csíramentes és a konvencionális patkányokban nagyjából azonosak. Ez arra enged következtetni, hogy a konvencionális életben a mikrobiális flóra, legalább is részben, felelős ezeknek az enzimeknek elbontásáért.

A baktériumok távollétében történő fehérjebontást vizsgálva COMBE és mtsai (48) és COMBE és SACQUET (49) csíramentes patkányok vakbelében nagyon kevés ammóniát találtak. Ez az észlelet indirekt módon alátámasztja WARREN és NEWTON (336) tengerimalacokon tett korábbi észlelését, akik szerint a csíramentes tengerimalacok portális vére a konvencionálisokhoz viszonyítva négyszer annyi ammóniát tartalmaz. LEVENSON és mtsai (172) csíramentes és konvencionális patkányokba parenterálisan  $C^{14}$ -el jelzett ureumot fecskendeztek be; a csíramentes patkányok által kilégzett levegőben  $C^{14}O_2$ -t csak nyomokban találtak, míg a konvencionális állatok kilégzett levegőjében  $C^{14}O_2$  bőséges mennyiségben volt. Ezek a vizsgálatok arra mutatnak, hogy a gazdaszervezetben a fehérjebontás végterméke az ureum. Az ammóniát elsősorban mikrobiális terméknek kell tekinteni. Ezt a felfogást alátámasztja DUCLUZEAU és mtsai-nak (72) az a megfigyelése, hogy csíramentes patkányok lactobacillussal, actinobacillussal vagy staphylococussal történő monokontaminálása az állatok vakbelében az ureumból ammóniaképzést váltott ki.

Más fajú lactobacillussal és proteussal ugyanezt a hatást nem tudták in vivo elérni, noha mindkét baktérium in vitro ureolitikusnak bizonyult.

A csíramentes állatok szénhidrátanyagcseréjével foglalkozó néhány munka a bélsatorna szénhidrátbontó enzimjeivel foglalkozik (57, 256). Konvencionális körülmények közt ezeknek az enzimeknek közvetlen vagy közvetett lebontásáért részben a mikrobiális flóra felelős (257).

EVARD és mtsai (78, 79) és HOET és mtsai (143) szerint csíramentes patkányokban a fekális zsírsavak telítetlenek, és páros szénatomszámú, hosszú zsírsavláncokból állnak. A konvencionális kontrolokban túlnyomórészt telített, ciklikus és elágazó láncú zsírsavakat mutattak ki, ez utóbbiak keletkezését általában bakteriális szintézisre vezetik vissza.

EVARD és mtsai (79) tisztított kukoricaolajat is tartalmazó diétával etetett csíramentes patkányok bélsarában a szterinek közül csupán koleszterint és bizonyos fajta fitoszterineket találtak. Az előbbi nyilvánvalóan endogén termék volt, az utóbbi a diétából eredt. A konvencionális kontrolok féceszében az említett 2 terméken kívül egy sor koprosztanol jellegű vegyületet és egyéb szterineket is kimutattak. Ez utóbbiak a szteroidok oxidációs és redukciós folyamataiból származnak, keletkezésüket nyilvánvalóan a bélmikroflóra tevékenységének rovására kell írni. Feltételezhetjük, hogy a bélflóra hasonló mechanizmusok segítségével a koleszterin anyagcseréjét is befolyásolja. WOSTMANN és WIECH (366) ugyanis azt találták, hogy a csíramentes patkányok májában a koleszterinszint lényeges mértékben emelkedett. Érdekes módon az idős konvencionális patkányok aortafalának koleszterin tartalma a csíramentes patkányokénál lényegesen magasabb volt, ami a baktériumflórának közvetett úton bekövetkező, vaszkuláris ártalmat okozó hatására is látszik utalni. DANIELSSON és GUSTAFSSON (58) csíramentes patkányok vérében magas koleszterinszintet találtak. WOSTMANN és KELLOGG (359) újabban egy clostridium-törzset izolált, amely mint monokontamináns excsíramentes állatokban a koleszterinnek a béllumenben való lebontását konvencionális szintre emelte. E mikroorganizmus hatására a fekális, neutrális szterinek mennyisége megkettőződött, azonban a baktériumok koprosztanolok keletkezését nem voltak képesek kiváltani.

A kolsav a bélsatornába konjugált formában kerül, ahol — mint ismeretes — a bélmikroflóra hatására dekonjugálódik, és egy sor egyéb változáson esik át, amelyeknek következtében a bélben többfajta szteroid termék keletkezik. Ezek legtöbbje komplexet képezve a bélsárral kiürül. GUSTAFSSON és mtsai (121) a szájon át adott, jelzett taurokolsavat a csíramentes patkány féceszében változatlan formában találták. A 24 órás epesavkiválasztás csökkent, és a jelzett kolsav felezési ideje a csíramentes patkányokban ötször hosszabb volt, mint a konvencionális kontrolokban. Amikor a csíramentes patkányokat *Clostridium perfringens*-szel asszociálták, a jelzett kolsav felezési ideje a csíramentes állatokéhoz hasonló maradt, azonban az epesav dekon-

jugálódott. GUSTAFSSON és mtsai (127) arra is rámutattak, hogy az *E. coli*-val monokontaminált patkányokban a fekális kolsavkiválasztás csökkent, ezzel egyidőben azonban a vakbélben mikrobiális tevékenységre visszavezethető folyamatos 7-ketodeoxikolsav-képződést észleltek.

A baktériumoknak és esetleg a vírusoknak a lipidek és szterolok normális és kóros felszívódásában játszott szerepéről (malabsorption syndrome) több munka jelent meg (80, 81, 280), ezek tárgyalása azonban e munka kereteit meghaladná.

A bélflóra bilirubinlebontó tulajdonságát GUSTAFSSON és SWENANDER, LANKE (128) mutatták ki.

WOSTMANN és mtsai (362) csíramentes állatok májában következetesen alacsony tiamin szintet és ezzel párhuzamosan csökkent véráramlássebességet észleltek. Arra gondoltak, hogy a konvencionális állatokban észlelhető magasabb tiaminszint és fokozott véráramlássebesség annak a stimulációnak eredménye, amelyet a bélflóra a máj kémiai energia- és oxigénszükségletére fejt ki. Egy másik kísérletben WOSTMANN és mtsai (361) konvencionális patkányokkal jelzett tiamin prekursor vegyületeket etettek. A vastagbélben jelentős mennyiségű, a májban és egyéb szervekben kis mennyiségű jelzett tiamint találtak. Ez arra mutat, hogy konvencionális állatokban a mikrobák által szintetizált tiamin csak kismértékben szívódik fel, valószínűleg azért, mert a baktériumsejtekhez kötve marad.

DAFT és mtsai (56) folsavban szegény diétát etettek csíramentes patkányokkal. Ennek következtében enyhefokú folsavhiány lépett fel, ugyanez a diéta konvencionális kontrolokra nem volt hatással. A folsavhiány kifejlődését megakadályozta a csíramentes állatok *aerobacter*rel, *alcaligenesszel*, *proteusszal* vagy *E. coli*-val történő monokontaminálása. Pantoténsavmentes diétán tartott konvencionális patkányok az intesztinális flóra által szintetizált pantoténsavat csak abban az esetben voltak képesek felhasználni, amikor az állatoknak koprofágiát engedélyeztek (a mikrobák által termelt pantoténsav ily módon könnyen felszívódhat). A pantoténsavmentes diétán tartott és koprofágiában megakadályozott csíramentes és konvencionális patkányokban egyaránt pantoténsavhiányra utaló tünetek fejlődtek ki.

K vitamin-mentes diétán tartott csíramentes patkányokban a K vitaminhiány tünetei gyorsan kifejlődnek (120). Abban az esetben, ha ezeket az állatokat konvencionálizálták, vagy a diétájukat K vitaminnal kiegészítették, a vérárvadás ideje megrövidült, és a hemorrhagiás diatézis tünetei visszafejlődtek; GUSTAFSSON és mtsai (122) és WOSTMANN és mtsai (362) egyaránt rámutattak arra, hogy a K vitaminhiány tüneteit leggyorsabban a K<sub>1</sub> vitamin tünteti el, a különböző menadiolsók csak jóval nagyobb koncentrációban voltak hatásosak. Az *E. coli* vagy egy *sarcinaszerű* mikroococcus is képes volt a vitaminhiány tüneteit megszüntetni (122). Ezek szerint a bélflóra a K vitaminigényeket teljes mértékben kielégíteni képes.

Azt a feltételezést, hogy egy mikrobiális faktor szerepet játszhat az A és K vitamin antagonizmusában (187), WOSTMANN és KNIGHT (360) vizsgálta. Csíramentes patkányokkal a szokott mennyiségű A és K vitamint etették; az állatok K vitaminigénye ezalatt nem változott. K vitamin-hiány csak akkor lépett fel, amikor normális K vitamin ellátás mellett az A vitamin mennyiségét tízszeresre vagy még magasabbra emelték. Ezek alapján megdől az a korábbi feltevés, hogy konvencionális állatokban az A vitamin túladagolás a K vitamin mikrobiális szintézisét kedvezőtlenül befolyásolja.

*Egyéb állatfajok.* Ebben a fejezetben röviden egyéb olyan állatfajokkal foglalkozunk, amelyek a csíramentes kutatásba, jóllehet kisebb mértékben, bevezetést nyertek. Ezekre az állatokra egyes fejezetekben már korábban is kitértünk.

A tengerimalacot a gnotobiotikus munkában különösen szeretik, mivel az újszülött állatot csak rövid ideig kell szoptatni, és elválasztás után közvetlenül szemiszolid, természetes diétára fogható. Ennek köszönhető, hogy a császármetszéssel nyert tengerimalacokkal kezdettől fogva széles körben kísérleteket végeztek (94, 146, 197, 212, 235, 311). Javítván nevelési módjukon és diétájukon, sikerült ezeket az állatokat a 4. generációig csíramentesen tartani (242). Császármetszéssel nyert csíramentes nyulakat is sikerült nevelni több generáción keresztül tejet tartalmazó diéta (239) és természetes táp (255) segítségével. Csíramentes tengerimalac és nyúltenyészetek azonos problémával küzdenek. Mindkét állatfaj csíramentes egyedei a konvencionális állatokhoz viszonyítva gyengébben fejlődnek (239). Ezenkívül a patkányhoz és az egerhez hasonlóan a megnagyobbodott vakbél és bélelfűződés ebben a két állatfajban is előfordul.

Csíramentes malacokat császármetszéssel nyerhetünk (166, 337, 339). A legtöbb ilyen tárgyú közlemény hangsúlyozza, hogy a csíramentes malacok különösen a születésük utáni néhány napban-hétben kiváló kísérleti alanyok. Ebben a korban növekedésük a konvencionális kontrolokéval azonos, vagy éppenséggel jobban növekednek.

Bárányokat és kecskéket sikerült — egy régebbi közlemény (164) tanulságait felhasználva — 4 hónapos korukig csíramentesen felnevelni (299).

Kutyákat csíramentesen felneveltek tenyészerett korukig (138). Újabban csíramentes kutyákat a 2. generációig szaporítani is tudtak (139). Macskákat (271) és majmokat (348) csíramentesen 10 hónapos korukig sikerült tartani. A kutyák, macskák és majmok növekedése a konvencionális állatokéhoz hasonló volt.

A csíramentes csirkéket általában az egyik legértékesebb állatnak tartják, mivel előállítási technikájuk egyszerű, kitűnően és kiegyenlítetten növekednek, és több kutatási területen használhatók (42, 270). Csíramentes tyúkok által tojt tojásokból sikerült 2. generációs csíramentes csirkéket nyerni (268). A csíramentes fürjek a csirkékkel versengenek, mivel kis méretűek, és korábban érnek (42, 265). Csíramentes pulykákat is sikerült nyerni (180).

### *Egyes szervrendszerek felépítése és működése*

A csíramentes és a konvencionális tengerimalacokat morfológiai vonatkozásban először GLIMSTEDT (94) hasonlította össze. Megmérte és összehasonlította a csíramentes és a konvencionális állatok különböző szerveinek súlyát. Abból az ismert elvből indult ki, hogy a konvencionális szervek átlagos súlyától való bármilyen eltérés jelzi az illető szerv működésének megváltozását is. Néhány megfigyelést az egész állatra vonatkozóan is tett. Ezeket a vizsgálatokat később csirkékre (270) és patkányokra (104) is kiterjesztették. Általában véve a szerveket két csoportra lehet osztani: (1) azok a szervek, amelyek normális körülmények között mikróbákat hordoznak, vagy azokkal szoros összeköttetésben vannak, csíramentes állapotban lényegesen alacsonyabb súlyúak; (2) a baktériumokkal normálisan nem érintkező szervek a konvencionális társaikban található szervekkel azonos súlyúak mind a konvencionális, mind a csíramentes állatokban. CLAUDE BERNARD (30) kifejezését módosítva azt mondhatjuk, hogy a szervek két csoportra oszlanak attól függően, hogy a „külső” vagy a „belső” környezet (milieu) részét képezik. Az első csoportba tartoznak a keringési és légzési szervek, a gyomorbélelcsatorna és a bőrtakaró. A másik csoportba elsősorban az izom- és idegrendszer tartozik. PLEASANTS (239) összefoglalást nyújtott erről a témakörrel. A következőkben kitérünk az idevonatkozó lényegesebb tudnivalókra.

*A vérkeringés szervei.* Csíramentes patkányokban a szív súlya, a vér összmennyisége és a szívperctérfogat csökkent, a vörösvérsejtek száma és a hematokrit érték növekedett (111). A csíramentes patkányokban végzett véráramlássebesség mérések tanúsága szerint a mikrobiális flórával egyébként szoros érintkezésben levő szervekben (bőr, légzőszervek, emésztőcső és máj) a véráramlás esetenként 45%-kal is csökken. A belső környezet szerveit (vesék, lép, thymus) figyelembe véve általában semmi különbség nincs a csíramentes és a konvencionális állatok között (101). Ez a jelenség nyilván egyes szövetek oxigénellátásával kapcsolatos, erre utalnak MATSUZAWA és WILSON (188) vizsgálatai is, akik csíramentes egerek májában és bőralatti kötőszövetben csökkent oxigén résznyomást találtak.

A csíramentes patkány cekális bélfodra mikrocirkulációját tanulmányozva kimutatták (16), hogy az erek vazomotorikus tevékenysége csökkent, és az ér simaizom lényegesen érzéketlenebb az adrenalin és vazopresszin iránt (az arány 20 : 1), az angiotenzinre adott válasz azonban mindkét csoportban egyforma volt. E rendellenesség okának kutatása során a csíramentes patkány és egér vakbél tartalmából kromatográfiás eljárással egy pigmentet (alfa) izoláltak (106), amely az ér és bél simaizom adrenalin iránti érzékenységet csökkentette. Hasonló pigmentet a konvencionális kontrollokból is sikerült nyerni, ez azonban biológiailag inaktívnak bizonyult. A csíramentes állatokból származó alfa pigment adrenalingátló hatása a redukált formájú ferritin

vagy apoferritin gátló hatásához hasonló volt (MAZUR és SHORR, 189). A tripszinkezelés ezeknek az anyagoknak (alfa pigment, ferritin, apoferritin) bioaktivitását nem változtatta meg, in vitro ferritin antiszérum kezelés vagy vakbélflórával (tartalommal) történő inkubálás azonban az anyagokat inaktíválta. A tripszinnel kezelt ferritin, apoferritin és csíramentes alfa pigment abszorpció spektruma hasonlóságot mutatott (182). Arra gondoltak, hogy az alfa pigment a bélhámsejtek ferritin fehérjéjéből származik, amelyikről ismeretes, hogy hámsejt deszkvamáció révén kimutatható mennyiségben kerül a bél lumenébe. A csíramentes bélben az emésztő fermentumok először a hámsejteket emésztik meg, azután a nagy ferritin molekulákat kisebb, felszívódásra képes, biológiai aktivitásukat megtartó alfa pigment molekulákra hasítják. Az említett mezocekális kis vérerek adrenalin iránti csökkent érzékenysége (16) talán arra vezethető vissza, hogy az alfa pigment bekerül a lokális keringésbe. Ezt a feltevést REDDY és mtsai (258) munkája is alátámasztja, akik csíramentes patkányok májában megnövekedett mennyiségű ferritin vasat találtak. Elfogadhatónak látszik az a feltevés, hogy a keringésbe bejutó alfa pigment részt vesz a csíramentes állatokban észlelt alapanyagcsere kialakításában azáltal, hogy az endogén adrenalin kalorigén hatását gátolja. Ezt a feltevést alátámasztja az is, hogy ha a csíramentes patkányok nagy „adag” alfa pigmentet tartalmazó megnagyobbodott vakbelét sebészi úton eltávolítjuk, az alapanyagcsere szintje normálissá, konvencionális állatban találhatóhoz hasonlóvá válik annak ellenére, hogy az állatok továbbra is csíramentes állapotban maradnak (356). A bélflóra által végzett alfa pigment inaktiválás irreverzibilis (106); az inaktiválás mechanizmusát nem ismerjük. A flóra távollétében bioaktivitását megtartó és állandóan termelődő alfa pigment jelenléte, a pigmentnek a szervezetre kifejtett káros hatása a bélflórának (vagy az e folyamatban részt vevő flóraellemeknek) mint a szervezet szinergistájának jelentőségét hangsúlyozza.

*A gyomor és vékonybél.* A csíramentes és a konvencionális állatok közt e szervrész tekintetében kevés különbség van, csíramentes állatokban következetesen csupán a vékonybél súlya csökkent (270). Ez valószínűleg a lamina propria szövetének csökkent mennyiségéből származik; ennek következtében a csíramentes állat vékonybelének nyálkahártyafelülete csökken (102). A csíramentes állatok bélhámja renyhébben újul meg (2). Ezekben a sejtekben a generációs ciklus minden fázisában redukciót észlelünk (170). A duodenum és ileum hámsejtjeinek mitózis indexe csíramentes patkányokban egyöntetűen alacsony, konvencionális patkányokban egyöntetűen magas (117). Nem tartjuk valószínűnek, hogy ennek a jelenségnek kialakításában a bélflóra közvetlenül részt vesz, mivel a konvencionális állat duodenumában és ileumában található flóra összetétele közti különbség nagy. Valószínűnek látszik, hogy egy ismeretlen mechanizmus következtében ezeknek a hámsejteknek a proliferáló képessége a csíramentes életben kárt szenved. A csíramentes patkányok-

ban a felvett takarmánynak a gyomorbélcsatornán való teljes áthaladási ideje hosszabb (5). HENECHAN (135) xilózét használva megállapította, hogy a csíramentes patkány vékonybeléből a felszívódás gyorsabb. Arra gondol, hogy a csíramentes állatok vékonybele jóval kevesebb „defenzív” sejtet tartalmaz, ezáltal a konvencionális állatok vékonybelénél efficiensebb felszívó hártának bizonyul.

*A csíramentes rágcsőlék megnagyobbodott vakbele.* NUTTAL és THIERFELDER (213) 1896-ban az általuk előállított fiatal csíramentes tengerimalacok vakbeléről a következőket írják: „Der Blinddarm war stark aufgetrieben und mit brauner, käsiger geronnener Flüssigkeit schwappend gefüllt.” Szopós patkányokban már a szopás ideje alatt vakbélmegnagyobbodást észleltek (354), amely az állat élete végéig megmarad. A természetes halállal elpusztult állatokban a legszembetűnőbb elváltozások a nagy vakbél, az ileocekális gyűrűnél található volvulusok és a bél izomtónusának fokozatos elvesztése (105). A vakbél-tartalom általában a testsúlynak 6–10%-át teszi ki, kivételes esetekben a 20–25%-ot is elérheti. A tartalom a konvencionális állatokénál lényegesen hígabb, pH-ja átlagban 1 pH egységgel lúgosabb (355), és redoxpotenciálja pozitív irányba tolódik el (233, 355).

A csökkent bélizomtónusnak többféle oka lehet. STALEY (303) patkány vakbél-simaizom-készítményeken mikrobiális ingerlő ágensek után kutatott, és azt találta, hogy a csíramentes patkány vakbél-simaizom összehúzó képessége a konvencionális érték 2/3-ára csökkent. Konvencionális patkány vakbél-tartalmából készült baktériummentes szűrletek a csíramentes patkány vakbél-simaizom csíkját *in vitro* majdnem a konvencionális szintig összehúzásra készítették. Ugyanezt a hatást konvencionális patkány vakbél-simaizom-készítménynél nem észlelték.

E jelenség kiváltásában az autonóm beidegzésben beállt változások vagy az endogén transzmitter anyagok iránti fokozott érzéketlenség is szerepet játszhatnak. DUPONT és mtsai (73) az *Auerbach* plexusban morfológiai elváltozásokat észleltek, és a csíramentes patkányok vakbelének mienterális neuronjai is hatalmasan megnagyobbodtak. Ezekben a sejtekben a difoszopiridin-nukleotid diaforaz aktivitása csökkent, jelezvén azt, hogy ezen a helyen a csíramentes állatok oxidatív jellegű energia „anyagcseréje” csökkent. STRANDBERG és mtsai (309) megfigyelték, hogy csíramentes patkányok vakbeléből készült preparátumban spontán összehúzódások nem következnek be, míg konvencionális patkányokból készült preparátumokban ez a jelenség következetesen megfigyelhető. A csíramentes izomkészítmények adrenalin és acetilkolin iránt kevésbé érzékenyek.

Azzal a lehetőséggel is számolni kell, hogy a flóra távollétében az endogén, izomműködést csökkentő anyagok a bélben felszaporodnak. A csíramentes patkányok és egerek vakbelében megnövekedett mennyiségű hipotenzív kinint felszabadító proteázét észleltek. Ezt az enzimet tentative fekális kallik-

reinnek (97, 100) vagy tripszinnek (12) azonosították. Úgy látszik, hogy összefüggés van ennek az enzimnek mikrobiális lebontása és az ex-csíramentes állatokban tapasztalható vakbélmegkisebbedés közt. A *Salmonella typhi murium*-mal monokontaminált patkányokban az átmeneti vakbélmegkisebbedés együtt jár az említett enzim mennyiségének csökkenésével, majd annak újbóli megnövekedésével (347). *Salmonella typhi murium* ellen immunizált és ezáltal rezisztenssé tett egerekben is észlelték az átmeneti vakbélcsökkentést és enzimmegkevesedést (346), ami arra utal, hogy immunológiai jelenségek a mikrobák által okozott vakbélmegkisebbedésben nem játszanak szerepet. Az öregedő csíramentes egerekben tapasztalható súlyosbodó vakbélmegnagyobbodással párhuzamosan a cekális kinint felszabadító enzim mennyisége növekedett (99).

#### *Egyéb bioaktív (autakoid) anyagok a csíramentes bélben*

BEAVER és WOSTMANN (27) vizsgálatai szerint a konvencionális kontrolokhoz képest a csíramentes patkányok béltartalmában a hisztamin mennyisége kisebb volt. Azt feltételezték, hogy a konvencionális állatok belében található magas érték a hisztidin mikrobiális dekarboxilációjából származik. GUSTAFSSON és mtsai (123) azt állítják, hogy a mikrobiális eredetű hisztamin a konvencionális gazdaállatban nehezebben szívódik fel, mivel a csíramentes és konvencionális rágesálók szöveteiben ennek az aminnak az eloszlása és mennyisége nagyjából hasonló. GORDON (97) beszámolt arról, hogy a csíramentes patkányok vakbél-tartalmának felülúszója egerek intraperitoneális befecskendezésekor toxikusnak bizonyult, míg a konvencionális kontrolokból származó hasonló anyag kevésbé volt mérgező. Úgy tűnik, hogy a csíramentes egér vakbele 5–8 halálos adagot tartalmaz abban az esetben, ha a vakbél-tartalmat csíramentes vagy konvencionális társaik hasüregébe fecskendezzük. A toxikus anyag természete ismeretlen (gyanítjuk, hogy a jelenség előidézésében az alfa pigment aktív formája szerepet játszik).

#### *Vízfelszívódás gátlás a csíramentes vastagbélben*

A csíramentes állatokra jellemző a híg vakbél- és vastagbél-tartalom és az idült, enyhefokú hasmenés. A jelenséget nemcsak rágesálókban figyelték meg (118, 267), hanem egyéb állatfajokban is: csirkékben (REYNIERS és mtsai 270); kutyákban (HENECHAN 137) és malacokban (MINIATS, 196).

CSÁKY (54) vizsgálatai szerint csíramentes patkányok kaudális vékonybélszakaszában a vízfelszívódás kezdetben késett, de végső fokon a csíramentes és konvencionális állatok vízfelszívódása közt különbséget nem talált. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a csíramentes állatok béltartalmában egy vízfelszívódást gátló anyag lehet jelen, amelynek mesterséges úton való kimosása



után a vízfelszívódás normális (konvencionális) mértéket ér el. A konvencionális életben a vízfelszívódást gátló anyagot a bélbaktériumok elbontják.

LOESCHKE és GORDON (177) *in vivo* végzett kísérleteikben a csíramentes patkányok vakbél tartalmát fiziológias konyhasóoldattal helyettesítették. Azt látták, hogy egységnyi vakbélnyálkahártya felületre számítva a konvencionális kontrolokhoz képest a csíramentes állatok vakbele 5—6-szor több vizet szívott fel. Ezek a megfigyelések arra mutatnak, hogy a csíramentes vakbélből történő gátolt vízfelszívódást nem a bélnyálkahártya károsodása, hanem a vakbél tartalom valamilyen tulajdonsága váltja ki. (A tartalmától megszabadított vakbélnyálkahártya megnövekedett vízfelszívóképességének mechanizmusát nem ismerjük.)

GORDON és NAKAMURA (107) vizsgálataik során abból indultak ki, hogy az imént említett jelenségben a csíramentes béltartalomban bőven található nyálka és nyálkához hasonló anyagok (48, 54, 174, 176) szerepet játszhatnak, ezért meghatározták a béltartalmak kolloid ozmózis nyomását (víz visszatartóképességét). Azt tapasztalták, hogy csíramentes patkányok vakbél tartalmának kolloid ozmózis nyomása átlagban 60—70 higanymilliméterrel magasabb volt, mint a vérplazma kolloid ozmózis nyomása, ugyanakkor konvencionális állatokban ezek az értékek nagyjában hasonlóak voltak. Ezek szerint a csíramentes bélben feleslegben található, felszívódásra nem képes makromolekulák a vízfelszívódás gátlását részben megmagyarázzák. E következtetést alátámasztja HOSKINS (147) munkája is: csíramentes patkány bélsarában a mukopoliszaharid típusú ABH(O) vércsoport antigént lebontó enzimaktivitás nem mutatható ki, konvencionális kontrolokban ez az enzimaktivitás megtalálható. A szerző arra is utal, hogy ennek az enzimaktivitásnak forrása egy obligát anaerob baktérium. WILKINS és GORDON (341) szerint a kolloid ozmózis nyomást növelő „készlet”-ben a csíramentes vastagbélben táplálékból származó, nem lebontott anyagok is találhatóak.

Úgy tűnik azonban, hogy az intesztinális bélflóra hiánya következtében fellépő csökkent mértékű vízfelszívódásban egyéb jelenség is szerepet játszik. ASANO (8—10) csíramentes patkány vakbél tartalmában kissé csökkent mennyiségű nátriumot és igen kevés klorid iont talált. Amikor ezekkel az állatokkal klorid iont szolgáltató gyantát etetett, a béltartalom klorid tartalma nőtt, és a vastagbélből történő vízfelszívódás lényegesen javult. Ilyen módon, a csíramentes állatok alsó bélszakaszaiban kimutatható gátolt vízfelszívódásban olyan ionok deficitje is szerepelhet, amelyek jelenléte a víz-transzport fenntartásában („solute coupled water transport”) elengedhetetlenül szükségesek (55). Nem ismerjük a módját annak, hogy a bélflóra milyen úton növeli a béltartalomban a hiányzó klorid ionok mennyiségét.

### *Egyéb szervrendszerek*

A csíramentes és a konvencionális állatok egyéb szerveivel kevés vizsgálatot végeztek. REYNIERS és mtsai (270) a csirkék szerveinek súlyát határozták meg. A már eddig is ismert adatokon kívül megfigyelték, hogy a csíramentes csirkecsoport bőrének súlya a kontrolokéhoz képest következetesen 10%-kal kisebb volt. A kontrolokhoz viszonyítva a csíramentes csirkék szerveiben súlygyarapodást általában nem észleltek, csupán a csíramentes állatok csontvázának súlya volt nagyobb.

Öreg, csíramentes egerek tüdejével végzett szövettani vizsgálatok (98) kiderítették, hogy, hasonlóan a fiatal konvencionális és csíramentes egerekhez, az alveolusoknak és a hozzájuk csatlakozó kapillárisoknak fala vékony maradt, és a metszetekben kevés retikuloendotheliális eredetű sejt volt látható. Öreg, egészséges, konvencionális kontrolokban az alveolusok fala 2—3-szor vastagabb és vándorsejtekkel gazdagon ellátott volt. Patkányokban az intravénásan adott, jelzett xenon tüdőn keresztül történő kiürülését tanulmányozták. Azt tapasztalták, hogy a csíramentes csoportban a ventilációs clearance következetesen jobbnak bizonyult (291). Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az öregedés következtében fellépő lélegző felület-, hanyatlás, legalábbis részben, a légutakban található baktériumflóra számlájára írható.

A baktériumflórának májra kifejtett hatásáról már szoltunk. Csíramentes és konvencionális patkányokban a vér ureum nitrogén mennyisége, a vesék koncentráló képessége (a vizelet és vérplazma ozmolalitásának hányadosa), valamint a kortikális, illetve medulláris véráramlássebesség nagyjából hasonlóak voltak (324).

Az endokrin funkciók közül csíramentes patkányokban a pajzsmirigy jódkötő képességének csökkenését már korábban említettük (61). A csíramentes állatok mellékveséjéről a vélemények megoszlanak. WAKABAYASHI és mtsai (334) szerint csíramentes patkányokban a mellékvese súlya kisebb, és kéreghipofunkciót észleltek. GORDON és mtsai (104) szerint ezekben az állatokban a mellékvese súlya, valamint a vizelet kortikoidok mennyisége kissé megnövekedett. CHAKHAVA és mtsai (41) fiatal, csíramentes tengerimalacok mellékveséjének súlyát, aszkorbinsav tartalmát, valamint vérük glukokortikoid tartalmát nagyobbban találták. Lehetséges, hogy az eltérő eredmények oka az eltérő állatfajban, törzsben, tartási módban, diétában rejlik. Újabban ERICSSON és GUSTAFSSON (77) a parenterálisan befecskendezett, jelzett szteroidok sorsát vizsgálták. Azt tapasztalták, hogy a csíramentes patkányok vizelete és széklete több szulfurilált formában levő szteroidot tartalmazott, míg a konvencionális kontrolokban zömmel a szabad formában levő szteroidok voltak kimutathatók. A szerzők feltételezik, hogy ezért a különbségért a bélflóra szulfhidrolaz-aktivitása felelős.

### *A gazdaszervezet védekező (immun) rendszerei*

Bevezetőnkben már szölkünk arról, hogy a csírámentes állatokkal végzett kísérletek egyik ösztönzője az a remény volt, hogy segítségükkel a szervezet védekező mechanizmusait képesek leszünk jobban megismerni. A Hellmann Lundi laboratóriumában dolgozó GLIMSTEDT csírámentes és konvencionális tengerimalacokat hasonlított össze (94) annak a kérdésnek megválaszolására, hogy a nyirokcsomó sejtet folyamatosan termelő „germinális” központ-e, vagy külső ingerek hatására limfoid szövet termelésével válaszoló „reakciós” központ-e? A kutatók azt gondolták, hogy a csírámentes állatok tisztázní fogják ezt a kérdést, mivel az állatok élő csírák által kiváltott antigén ingereket nem kapnak. GLIMSTEDT munkája az utóbbi feltevést látszott alátámasztani.

A GLIMSTEDT vizsgálatait követő években az antigénektől „szűz” csírámentes állat fogalma gyakorlati megfontolások alapján egyre inkább jelentőségét veszítette. Az egyik ilyen megfontolás az volt, hogy a teljes csírámentes-ségre nincsenek abszolút kritériumok, és a csíráktól való mentesség megállapítása a sterilitási próbák hatékonyságának függvénye (l. előbb). Ezenkívül, gyakorlatilag valamennyi rendelkezésre álló diéta mikrobális vagy valamilyen egyéb eredetű antigént tartalmaz, amelyek a sterilizálást valamilyen formában átvészelik, és szájon keresztül immunizálhatnak. Végül a csírámentes állatok védekező rendszere nem specifikus stresszreakciók hatására is változást szenvedhet. A stressz hatására egyebek közt létrejövő limfoid szövetvesztéséget a nem megfelelő takarmányozás is okozhatja, és az így keletkezett elváltozás ugyancsak nehezen különböztethető meg az antigéninger hiánya következtében előállt szövetdeficitől. Mind a folyékony, mind a szilárd tápok „túl szigorú” autoklávozása következtében nem megfelelő összetételű, deficiens diétákban a múltban bővelkedtünk (267), és ilyen természetű problémákkal még ma is találkozunk. Kémiailag meghatározott, antigénmentes, folyékony diéta etetésével újabban csírámentes rágesálókban majdnem tökéletes antigén stimulustól való mentességet és minimális táplálkozási stressz hatást sikerült elérni (kivételet természetesen az autoantigenitás jelensége képez, ha előfordul). A kolosztrumtól megfosztott csírámentes újszülött malacokra nagyjából ugyanez vonatkozik; amennyiben gyakorlatiasabb tápot etetünk, a diétában levő antigének jelenlétével meg kell alkudnunk.

### *A szervezet védelmében részt vevő sejtek, szövetek, szervek*

A nyirokcsomókban és lépben található makrofágok számában, eloszlásában és fagocitáló képességében a csírámentes és a konvencionális egerek között nem volt számottevő különbség (19, 21). A szénrészecske—clearance módszerrel tanulmányozott máj és lép fagocita index nagyságában sem volt eltérés a kétfajta állatsoport között (63, 317).

HEISE és MYRVIK (134) vizsgálatai szerint mind a csíramentes, mind a konvencionális állatok makrofágjai hasonló módon működtek, a csíramentes és a konvencionális patkányok hasüregéből vett makrofágok lizozim, savanyú foszfátáz és katepszin tartalma hasonló volt; a csíramentes egerek alveoláris falából származó makrofágok enzimtartalma azonban már jóval alacsonyabb volt. Újabban PERKINS és mtsai (224) kimutatták, hogy steril irritáló szer (gelatin) hasüregbe fecskendezésére konvencionális egerek lényegesen nagyobb számú fagocitasejtet (histiomonocita sejtet) termeltek, mint csíramentes társaik. Mindazonáltal a csíramentes és a konvencionális állatokból származó egyedi fagocita sejtek opszonizált birkavörösvérsejt-bekebelező kapacitása (in vitro vizsgálatok) nagyjából azonos volt.

A csíramentes rágszálókban esetenként alacsonyabb összfehérvérsejtszámot találni, a differenciált fehérvérsejtek számának alakulásában törvényszerűséget nem fedeztek fel. Csíramentes és izolátor konvencionális patkányok összehasonlításakor (104) azt látták, hogy a kétfajta állatcsoportban a kvantitatív és kvalitatív fehérvérsejtszámok megegyeztek. Mindazonáltal az egy éves korig élt csíramentes csirkékben az összfehérvérsejtek száma következetesen alacsony maradt a limfociták alacsony száma miatt (270).

A fiatal, első generációs, csíramentes tengerimalacokra jellemző a limfoid szövetképzés fejletlensége és a kisebb méretű nyirokcsomók (3, 94, 197, 202). Ugyanez található a csíramentes patkányokban és csirkékben, de kisebb nyirokcsomók jobbra csak azokon a testtájakon fordulnak elő, amelyek normális körülmények között a mikrobiális flórával szoros összeköttetésben vannak (104, 110, 270). Más szerzők (19, 20) szerint viszont a csíramentes és a konvencionális egerek limfoid rendszere közt az eltérés nem nagy.

Újabban vizsgálták a csíramentes állatok nyirokcsomóinak germinális centrumait (3, 19) és a citopoetikus aktivitás valamennyi fázisát (316, 318). Valamennyi szerző megegyezik abban, hogy a csíramentes állatok limfoid folliculusai általában kisebbek, kevésbé élesen demarkáltak, kevesebb mitózist látni, és a konvencionális kontrolokhoz viszonyítva kisebb számban fordulnak elő.

ABRAMS és BISHOP (3) fiatal csíramentes tengerimalacok bélnyálkahártyájában azt látták, hogy a lamina propria vándorsejt populációja kisebb, mint a kontroloké. Noha a plazmasejtek abszolút száma változó volt, legkisebb számban ezek a sejtek fordultak elő. Tengerimalacokban (302), csíramentes patkányokban és csirkékben (103) más szerzők hasonló eredményeket kaptak.

A csíramentes egerek mezenterális nyirokcsomóiból a gammaglobulint tartalmazó plazmasejtek csaknem teljesen hiányoztak, ugyanakkor konvencionális állatokban nagyszámban voltak jelen. A plazmasejtekben levő gammaglobulin kimutatása specifikus fluoreszcenciás módszerrel történt. Gammaglobulin tartalmú plazmasejteket sem a csíramentes, sem a konvencionális

egerek lépe nem tartalmazott (144). Ezeket a vizsgálatokat az egerek állalatti és mezenterális nyirokesomóival is elvégezték (19), valamint összehasonlítás-képpen az axilláris és popliteális nyirokesomókat is vizsgálták. Azt találták, hogy a csíramentes egerekben az állalatti és mezenterális nyirokesomókban a gammaglobulin tartalmú plazmasejtek száma lényegesen alacsonyabb volt, mint a konvencionális kontrolokban; az axilláris és popliteális nyirokesomó plazmasejtjei a lépben található sejtekhez hasonlóan viselkedtek. Újabban CRABBÉ és mtsai (51) egerben fluoreszcenciás technikával kimutatták, hogy konvencionális állatok bélnyálkahártyája IgA immunglobulint szintetizáló plazmasejtekben gazdag; csíramentes állatokból készült készítményekben ezeknek a sejteknek a száma tízszer kevesebb volt. Később rámutattak arra is, hogy csíramentes egerek antigén (lólépből előállított ferritin) szájon át történő adása következményeként IgA tartalmú plazmasejteket termeltek; az antigén parenterális adására IgM és IgG tartalmú sejtek keletkeztek (52).

OLSON és WOSTMANN (215)  $H^3$ -timidin segítségével meghatározták a potenciális ellenanyagtermelő sejteket csíramentes és konvencionális eger a cervikális és mezenterális nyirokesomóiban. A csíramentes állatok nyirokesomóiban a potenciális ellenanyagtermelő sejtek száma a konvencionális állatokban található sejtszámnak csupán egy-tizenketted része volt. A jelzett anyag felvételére képes sejtek az anyagot mindkét állatcsoportban egyforma módon és mennyiségben vették fel. Ugyanezek a szerzők egy másik kísérlet-sorozatban (216) egereket intraperitoneálisan 7S emberi gammaglobulinnal vagy elölt *Salmonella typhi murium* tenyésztettel kezelték. Az ellenanyagtermelő sejtek száma a csíramentes állatokban mindkét antigénnel való kezelés után lényegesen nagyobb volt, mint a konvencionális kontrolokban. Ebből a szerzők arra következtettek, hogy bár a csíramentes állatoknak kevesebb immunkompetens sejtjük van, az antigéningerre bekövetkezett nagyobb mérvű kompetens sejtelszaporodás ezt az előzetes antigénstimulus hiánya következtében előállt lemaradást kiegyenlíti. BOSMA és mtsai (32) és NORDIN (211) csíramentes és konvencionális egerek parenterális birkavörösvérsejt befecskendezésére adott immunválaszát vizsgálták; azt tapasztalták, hogy a lépben az ellenanyag-képződés mindkét állatcsoportban egyformán zajlott le.

Úgy tűnik, hogy csíramentes állatokban a rendelkezésre álló immunkompetens sejt-„készlet” kisebb, mint a konvencionális kontrol állatokban; ez a különbség a legkifejezettebb azokban a szervekben, amelyek a bélflórával kapcsolatban állnak. A potenciálisan ellenanyagtermelő sejtek száma azonban csíramentes állatokban alig kevesebb, vagy megegyezik a konvencionális kontrolokban található sejtek számával; a sejtszám függ a hordozó szerv minőségétől és attól, hogy milyen módszerrel vizsgáljuk a sejtek választát. Az utóbb elmondottak alapján a kétfajta állatcsoport közt nem tudunk minőségi különbséget tenni.

WILSON és mtsai (343) a csíramentes egér thymusát kisebb súlyúnak találták. BEALMEAR és WILSON (24) az egerek thymusának limfocita populációját az állatok 5 hónapos koráig vizsgálták. Azt tapasztalták, hogy a konvencionális kontrolokhoz képest a csíramentes állatok thymusának kéregállománya kevesebb kis limfocitát tartalmazott, és az ilyen típusú sejtek közül a velőállományba kevesebb vándorolt át. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a mikrobiális flóra befolyásolja azt a folyamatot, amelynek során thymus limfociták az egyéb limfoid szervekbe jutnak.

A csíramentes csirkék thymusával nagyjából hasonló megfigyeléseket tettek (316, 318), bár a thymus súlya a konvencionális thymushoz képest nem volt kisebb (270). A bursa Fabricii (madarak kloakájában található szerv, amely bizonyos mértékig a thymushoz hasonlít) súlya csíramentes állatokban lényegesen kisebb volt (270). A bursa limfás folliculusainak szövettani képe csíramentes állatokban nem változott. Tágabb értelemben véve a csíramentes állatokban található limfoid szövetdeficit ezekre a szervekre is érvényes.

*Humorális ellenanyagok.* THORBECKE és mtsai (318) megfigyelték, hogy csíramentes csirkék konvencionális társaikhoz viszonyítva kevesebb plazmasajttal ellátott, fejletlen limfoid szövettel és vérsavójukban alacsonyabb gammaglobulin tartalommal (a konvencionális értékek 25—50%-ával) rendelkeznek. A beta- és gammaglobulinok szintje csíramentes patkányok savójában is alacsonyabb, egyéb szérumfehérje összetevők konvencionális szinten mozognak, az albumin mennyisége magasabb lehet (124, 357). GRABAR és mtsai (112) immunoelektroforézissel kimutatták, hogy a csíramentes patkányok széruma minőségileg ugyanazokat a fő antigénkomponenseket tartalmazza, mint amilyeneket a konvencionális patkányok szérumában találni. A nyúlba fecskendezett csíramentes patkányszérum alacsony titerben ugyanazt a teljes anti-gamma-ellenanyag spektrum kifejlődését eredményezte, mint amilyent a konvencionális patkányszérum nyúlba fecskendezése után kapni lehet. FAHEY és SELL (82) csíramentes és specifikus kórokozótól mentes egerekben azt találta, hogy a fajra jellemző 4 fő szérum immunglobulin komponens csökkent mennyiségben van jelen; a csökkenés különösen az IgA komponensre volt jellemző. ARNASON és mtsai (7) csíramentes egerekben csökkent mennyiségű alfa<sub>2</sub>- és gammaglobulint találtak. Az IgM komponens szintje azonban mind a csíramentes, mind a konvencionális csoportban közel egyforma volt.

A diéta összetétele a patkány védekező rendszerére csekély hatással van (364), bár egyéb állatfajokban ilyen természetű hatásokról beszámoltak. A legalaposabban a tengerimalacot és az egeret vizsgálták (214, 294, 365). ŠTERZL és mtsai (306, 307) szerint a kolosztrummentes, steril malacokban ellenanyagok nem találhatóak. KIM és mtsai (157) szerint a csíramentesen nyert, kolosztrummentes, csupán pirogenmentes desztillált vízen tartott malacok szérumában immunglobulinok nem találhatóak. Az anyai ellenanyagok hiánya ebben az esetben nyilvánvalóan a fajra jellemző: a nehezen átjárható placentára

vezethető vissza. Az említett malacok orálisan vagy parenterálisan bevitt antigének hatására immunológiailag teljesen kompetens választ adtak.

Ami az immunglobulinok szintézisét és anyagcseréjét illeti, NASH és mtsai (207) azt látták, hogy ferritin orális vagy parenterális adására csíramentes egerek keringő ellenanyagokat és gammaglobulinokat képeztek, amelyeknek nem volt affinitásuk az antigénhez (nem antigén természetű globulinok). SELL és FAHEY (295) csíramentes és konvencionális egerekben meghatározták az összgammaglobulinszintet, és a jelzett homológ és heterológ gammaglobulinok anyagcseréjét vizsgálták. Vizsgálataik szerint a csíramentes egerekhez képest konvencionális egerekben a gammaglobulin szintézis mértéke kb. ötvenszer nagyobb volt. A csíramentes egerekben talált, erősen csökkent gammaglobulinszint tehát a gammaglobulin képzés csökkent voltára utal. Csíramentes és konvencionális egerek a heterológ gammaglobulinokat nagyjában egyforma mértékben katabolizálták. FAHEY és SELL (82) immunoelektroforézis technikával egerek ötféle immunglobulinját vizsgálták. Háromféle 7S komponens katabolizálásának üteme összefüggésben volt a szérum immunglobulin szintjével, és lebomlásukat közös kontrol-mechanizmus irányította. Az említett három komponens lebomlása az alacsony gammaglobulin szintű állatokban lassúbb volt, míg a hemocianinnal hiperimmunizált konvencionális egerekben az anyagcsere (turnover) mértéke meggyorsult. Az IgA és IgM globulinok lebomlása a 7S komponensek lebomlásától független és gyorsabb volt, ami arra utal, hogy katabolizálásuk a szérumban található koncentrációjuktól független. Csíramentes és konvencionális tengerimalacokban SELL (293) a gammaglobulinok közel egyforma mértékű lebomlását észlelte, és szerinte a globulinok számottevő mértékben egyik fajta állatcsoportban sem kerültek a bélesatornába. A csíramentes állapotban levő tengerimalacok rendkívül kevés szérumgammaglobulinja arra utal, hogy ebben az állapotban a szérumösszetevők képzése alacsony szinten mozog.

WAGNER (328) előzetes vizsgálatai szerint a properdin, a komplement és a komplementösszetevők titere csíramentes patkányokban a konvencionális társakban észlelt legalsó küszöbérték körül mozgott. A szerző azonban megjegyezte, hogy a csíramentes patkány-savó agglutinálta a *Micrococcus epidermidis* (ezek a csírák a sterilizálás előtt a diétában rendszerint megtalálhatók) sejtjeit; ezért ezeket a vizsgált állatokat nem lehet antigénstimulus nélküli állatoknak tekinteni. A properdin vizsgálatok említett eredményeit később megerősítették (126). NEWTON és mtsai (210) csíramentes és konvencionális tengerimalacok komplement szintjének összehasonlításakor WAGNER leleteihez hasonló eredményeket kaptak, és mindkét állatcsoportban azt látták, hogy a kor előrehaladtával a komplement mennyisége nőtt.

*Az immunválaszok.* Jelenleg olyan részletes vizsgálatok nem állnak rendelkezésre, amelyek a normál csíramentes állatok autoimmunitásával foglalkoznak. Vizsgálták (7) az intraperitoneálisan befecskendezett széntetraklorid

hatását csíramentes és konvencionális egerekben. A befecskendezés hatására elhalással járó májelhárítási változások és ennek következtében mindkét állatcsoport savójában anti-máj ellenanyagok képződtek. A 3'-metil-4-dimetil-aminoazobenzennel (butter-yellow) végzett hasonló vizsgálatok kimutatták, hogy mindkét állatcsoportban, különösen a csíramentes csoportban májelhárítási változások fejlődtek ki, s mindkét csoportban a limfoid szövetek aktivitásával járó hiper-gammaglobulinémia fejlődött ki (23). Ezek a vizsgálatok arra engednek következtetni, hogy a csíramentes gazdaszervezet képes az autoimmunreakcióra, de mivel ezekben a kísérletekben kémiai meghatározott diétákat nem használtak, fennáll annak a lehetősége, hogy a jelenségben idegen antigének is részt vettek.

Tumorantigének ellen ható ellenanyagok jelenlétét is a gazdaszervezet autoimmun válaszáként értékelhetjük. POLLARD (245) azt tapasztalta, hogy steril metilkolantrén befecskendezésére kifejlődő fibroszarkoma csíramentes egerekben az érintett terület regionális nyirokcsomójában a limfoid szövetek aktivitásnövekedését okozza. Másrészt csíramentes patkányokban, amelyekben az imént említett ágens etetésével emlődagánatot idézett elő, a regionális nyirokcsomók nem reagáltak. Felmerül annak a lehetősége, hogy a csíramentes egerekben a limfoid szövet említett immunválaszát egy aktivizált vírus okozta, mivel az egerek, szemben a patkányokkal, rejtett vírus hordozók lehetnek. OLSON és BURNSTEIN (217) Freund adjuvánszhoz kötött, autoklávozott nyúlgerincvelő emulziót fecskendeztek csíramentes és konvencionális patkányokba, és az így előidézett kísérletes allergiás encephalomyelitist tanulmányozták; különböző immunológiai próbák segítségével azt tapasztalták, hogy mindkét állatcsoportban az ellenanyagválasz azonos volt. A bénulások azonban a csíramentes állatokban ritkábban fordultak elő.

A csíramentes állatokban végzett kevés számú megfigyelés alapján úgy látszik, hogy a gazdaszervezet képes autoellenanyagok termelésére. Az igazság az, hogy ezzel a nagyon alkalmas eszközzel, a csíramentes állattal, még több nagyfontosságú kérdést nem tanulmányoztak (pl. azt, hogy a szervezetben „önnönmaga ellen” milyen hatásokra fejlődik ki tolerancia); ezen az alkalmas modellen az autoimmun betegség kifejlődésének mechanizmusát sem vizsgálták még. Mindazonáltal fertőzéstől mentes, antigénstimulustól megkímélt csíramentes állatok a legkülönbözőbb antigének bevitelére kimutatható ellenanyagtermeléssel válaszolnak: csirkékben nyúlörösvérsejtek befecskendezésére hemagglutininek termelődnek (326, 328), egerekben *E. coli*, *Salmonella typhosa* (151, 193) és staphylococcus A antigén ellen ható ellenanyagok képződnek (45). A csíramentes állatokban a konvencionális társakhoz képest a keletkezett ellenanyagok szintje általában lényegesen alacsonyabb.

A kérdés összetett voltára utalnak STOLLERMAN és mtsai (308) kísérletei. A szerzők csíramentes egereket és kolosztrummentes malacokat streptococcus ellenanyagok jelenlétére vizsgáltak. M fehérje és toknélküli A streptococcus-



kat (standard tenyészet) intraperitoneálisan csíramentes és konvencionális egerek hasüregébe fecskendeztek. Az  $LD_{50}$  értéke mindkét állatcsoportban lényegében egyforma volt. Abban az esetben azonban, amikor M fehérjét tartalmazó, tokos baktériumokat (előbbivel azonos baktériumtörzs) vittek be, a csíramentes állatok konvencionális társaiknál fogékonyabbaknak bizonyultak. Érdekes módon, a csíramentes állatok ellenállóképességét fokozni lehetett a fertőzést megelőzően adott „teljes” globulin készítménnyel, amelyet konvencionális egerekből nyertek. Az ugyanebből a forrásból származó gammaglobulin készítmény önmagában hatástalan volt. *In vitro* vizsgálatok kiderítették, hogy a csíramentes egerek leukocitái az avirulens A streptococcus baktériumokat éppúgy elpusztították, mint a konvencionális kontrolokból származó leukociták. Avirulens streptococcusok ellen ható opszoninok kolosztrummentes malacok vérében előfordultak (ezeknek az állatoknak a savója elhanyagolható mennyiségű gammaglobulint tartalmazott).

Az antigéninger nélkülözhetetlen azoknak a savóösszetevőknek keletkezésében, amelyek feltételezhetően a természetes ellenanyagokkal azonosak; erre utalnak KIM és WATSON (159) újabb vizsgálatai. A szerzők plakk-technikával tanulmányozták, hogy az ún. „Jerne background” sejtek (természetes ellenanyagok?) képviselői antigénstimulusra vagy spontán termelődtek-e? Kolosztrummentes, steril Mullsoy diétán tartott malacokban birkavérsejtekre ható, plakk-formáló sejtek két hónapig nem termelődtek. Ugyanennek az antigénnek parenterális bevitelére a malacok teljes mértékben immunkompetenseknek bizonyultak. Ennek az elsődleges, valódi immunválasznak mértéke csökkent, ha a malacokat előzetesen más antigénekkkel kezelték. A szerzők ebből arra következtetnek, hogy ezekben az immunológiai szűz állatokban egy „nem elkötelezett” multipotens immunrendszer van jelen.

A lizozimszint alakulását csíramentes és konvencionális patkányok szérumában, nyálában és könnyében MAKULU és WAGNER (183) vizsgálták. A lizozim mennyisége a szérumban és könnyben megegyezett, a csíramentes állatok nyálából azonban a lizozim hiányzott. A nyál lizozimhiányával csíramentes állatokban együtt járt a nyálleukociták hiánya is, amelyek ezen az alapon a lizozim termeléséért felelősek. E kérdést szélesebb körben (természetes rezisztencia vs. természetes immunitás) kísérleti adatok szegényes volta miatt nem tudjuk tárgyalni.

Bovin és humán szérumalbumin intravénás befecskendezésére csíramentes és konvencionális csirkék ellenanyagtermeléssel feleltek (328, 363). Bovin szérumalbuminnal oltott csíramentes patkányok (WOSTMANN 351) csak akkor reagáltak, ha az albumint inkomplet Freund adjuvánsal egészítették ki. Albumin vagy Freund adjuváns önmagában hatástalan volt. A két anyag egyidejű adására a gamma- és különösen a betaglobulinok aránya nőtt. Ezzel egyidőben csekély, de jól észlelhető anti-bovin szérumalbumint precipitáló ellenanyag is termelődött, amelynek megjelenése egybeesett a szérum

gammaglobulinszint emelkedésével. Csíramentes és konvencionális egerekben egyfajta glikoprotein vagy bovin szérumalbumin egyformán jó antigénnek bizonyult inkomplet Freund adjuváns hozzáadása nélkül is (237). A néhány napos csíramentes nyulakban észlelt speciális tejallergia is jól példázza a csíramentes gazdaszervezet idegen fehérjék iránti reakciókészségét (44).

KOVÁCS (162) újabban jól összefoglalta az endotoxin hatásokat, és ebben a vonatkozásban említést tesz a csíramentes kísérletek végzésének jelentőségéről is. Ebben a témakörben gnotobiotikus állatokkal zömmel a gazdaszervezet endotoxin iránti fogékonyságát és rezisztenciáját vizsgálták.

THORBECKE és BENACERRAF (317) vizsgálatai szerint csíramentes egerek a hővel elölt *E. coli* baktériumokat vérükből lényegesen lassabban távolítják el, mint konvencionális társaik. E kísérletek eredményét kissé általánosítva azt lehetne mondani, hogy mikrobiális ágens hatásának kitett gazdaszervezet endotoxinra megváltozott módon reagálhat. SCHAEGLER és DUBOS (286, 288) különféle egértörzseket vizsgáltak. Egyik törzsüknek (NCS) bélbaktériumflóráját túlnyomórészt lactobacillusok alkották, és az állatok *E. coli*-tól mentesek voltak. A többi vizsgált egértörzs egyebek közt *E. coli*-t is hordozott. A colitól mentes egerek intraperitoneálisan adott nagy adag endotoxintól (*E. coli*-ból vagy *K. pneumoniae*-ből készült 400—500 mikrogram lipopoliszaharidtól) nem pusztultak el, bár több patológiás elváltozást (például polimorf leukociták hasüregbe történő vándorlásának gátlását) észleltek bennük. Valamennyi egyéb colihordozó egértörzsben hasonló kezelésre a mortalitás nagy volt. Abban az esetben, ha az NCS (colimenter) egereket az endotoxintermelésre használt törzsből készült vakcinával előkezelték, az endotoxin kezelés által kiváltott patológiás elváltozások keletkezését megakadályozták. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a colitörzseknek kitett gazdaszervezet nem érzékeny az endotoxin halálos hatásával szemben. Ugyanakkor azonban az endotoxin gyengíti ezen állatok természetes ellenállóképességét. JENSEN és mtsai (153) ezeket az észleléseket megerősítették, és megfigyelték, hogy élő *E. coli* baktériumokkal monoasszociált ex-csíramentes egerek éppúgy endotoxin-rezisztensek, mint a csíramentes vagy colimenter (SPF) társaik. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az *E. coli* jelenlétén kívül egyéb baktériumok is szükségesek a colieffektus letalis potenciálásához (ezek a járulékos baktériumok nyilván jelen voltak a konvencionális egerekben, viszont hiányoztak a colival monoasszociált ex-csíramentes egerekből). LANDY és mtsai (167) megfigyelték, hogy csíramentes és *E. coli*-t hordozó konvencionális egerek a *Shigella flexneri* endotoxintól egyforma mértékben pusztultak el, és a *Salmonella enteritidis* endotoxin hatására kifejlődő patológiás elváltozásokban sem volt különbség a kétféle állatesoport között. Az utóbb és a korábban említett szerzők adatai közti ellentmondásokat talán feloldják SACQUET és CHARLIER (279) eredményei. Szerintük a csíramentes, „colimenter” (SPF

típusú) és a konvencionális egerek endotoxin érzékenysége a vizsgálatra használt állattörzsektől nagy mértékben függ.

Lehetséges, hogy a parenterálisan adott endotoxin letalis hatása függ a gazdaszervezet bélmikroorganizmusainak (esetleg egyéb mikroorganizmusoknak) előzetes szenzitizáló hatásától, ezek a baktériumok ugyanis endotoxin forrásként szolgálhatnak. Nem tudjuk, hogy az említett endotoxin érzékenysége összefügg-e a konvencionális (vagy mikrobákkal asszociált ex-csíramentes) állatok fertőzés elleni rezisztenciájával. A jelenségről legjobban antigénmentes állatok segítségével lehet tájékozódni. KIM és WATSON (158) szerint kolosztrum-, csíra- és immunglobulinmentes újszülött malacokban endotoxin emelkedő adagjára az LD<sub>50</sub> értéke — összevetve a kolosztrummal etetett kontrollokkal — lényegesen alacsonyabb volt. A kontrolokban az etetés utáni órákban már többféle immunglobulint lehetett kimutatni. A szerzők ebből arra következtettek, hogy az endotoxin (vizsgálataikban *S. abortus equi* endotoxint használtak) valódi, elsődleges vagy „intrinsic” toxicitással rendelkezik, amely a klasszikus antigén-ellenanyag reakcióktól független. A kolosztrum által nyújtott védelemet anti-endotoxin eredetűnek gondolják, amely az O-ellenanyagtól független, és a 19S protektív ellenanyaggal hasonlítható össze.

Az *E. coli* a bélflóra egyik gyakori összetevője, ezért hatását ismételt tanulmányozták. Emberi bélből származó *E. coli* törzssel monoasszociált, fiatal, csíramentes tengerimalacok belében a baktériumok jól megtelepedtek, és az állatok java része életben maradt (87). Vizsgálták hővel előlt, P<sup>32</sup>-vel jelölt *E. coli* csírák vér clearancét és a baktériumok szervekben történő eloszlását csíramentes és konvencionális egerekben úgy, hogy egy részüket előzetesen a használt törzs hővel előlt tenyészetével immunizálták, más részüket pedig oltatlanul hagyták (317). Az eredmények azt mutatták, hogy a nem immunizált csoportban az *E. coli* csíráknak a vérből történő eltűnése a csíramentes állatokban jóval lassabban zajlott le. A csíramentes és a konvencionális, nem immunizált egerek szerveiből a jelzett anyagot közel hasonló %-ban nyerték vissza; mindkét immunizált csoport (csíramentes és konvencionális) májában a jelzett anyag mennyisége lényegesen mértékben nőtt, a radioaktivitás mértéke a lépben, tüdőben, vesében és vérben csökkent. Hasonló kísérleti elrendezésben a szerzők *Staphylococcus aureus*-t is használtak. A nem immunizált csíramentes és a konvencionális egerek vérből, ellentétben az *E. coli*-val kapott eredményekkel, a radioaktivitás egyforma módon, igen gyorsan eltűnt. HOROWITZ és mtsai (145) csíramentes és izolátor konvencionális egerekben formalinnal előlt *E. coli* csírák talpba történő fecskendezésére keletkezett különféle immunválaszokat vizsgáltak. A regionális nyirokcsomó szinusz makrofágjaiban a befecskendezés után már 2 órával egy antigénrészecske jelent meg mind a csíramentes, mind az izolátor konvencionális állatokban; úgy tűnt, hogy a konvencionális állatokban ez az antigén hamarabb esett szét. Keringő coli-ellenanyagok 4 nap eltelté után mind a két állatcsoportban ter-

melődtek, a titerértékek a konvencionális állatokban magasabbak voltak. BAUER és mtsai (22) arra gondoltak, hogy az imént említett kísérletben használt egerekben esetleg más szerotípusú *E. coli* baktériumok ellen ható ellenanyagok már eleve jelen voltak, ezért a kísérletet *Serratia marcescens* segítségével (amelytől az általuk használt egerek mentesek voltak) megisméltették. Kapott eredményeik az *E. coli*-val kapott eredményekkel megegyeztek. Kimutatták, hogy a csíramentes egerekben észlelt elkésztett immunválasz hosszabb ideig tartott és kifejezettebb volt, mint a konvencionális állatokban; ennek oka valószínűleg az immunogén antigénfrakció lassúbb „felszabadulása” volt. Kevésbé kifejezett, de minőségileg hasonló válaszokat kaptak a nem-mikrobás eredetű ferritin alkalmazására. A szerzők azt a következtetést vonták le, hogy antigéningerre a csíramentes állatok a konvencionális állatokhoz „minőségileg” hasonlóan viselkednek. Az állat konvencionális volta ebben a vonatkozásban kevés előnnyel jár.

Csíramentes csirkék *Clostridium perfringes*-szel vagy *Streptococcus faecalis*-szal szájon át történő monokontaminálása után néhány hét leforgása alatt a szérumfehérjék és a bélfal retikuloendotheliás elemeinek mennyisége emelkedett, homolog szérumagglutininek képződtek, amelyeknek titere a konvencionális kontrolok agglutininszintjét elérte vagy megközelítette (332, 333). Patkányokban végrehajtott hasonló mikroorganizmusokkal vagy lactobacillusokkal történő kontaminálás hatására az agglutinintermelődés bekövetkezett, de a szérumelektroforézis képében kevésbé jól elbírálható változás történt.

Nem ismeretes, hogy azok a baktériumok, amelyek a diétában sterilizálás előtt jelen vannak, és amelyeket a csíramentes állatok előtt formában bekebeleznek, képesek-e szájon át adott vakcinaként ellenanyagtermelést kiváltani. WAGNER szerint (328) ez az eset csirkében a *Micrococcus epidermidis*-szel bekövetkezik. Csíramentes csirkék, szemben konvencionális társaikkal, ennek a mikroorganizmusnak a bevitelére megkésztett, csökkent mértékű ellenanyagtermeléssel felelnek.

Ismeretes, hogy a gazdaszervezetben a baktériumok hatására kapott immunválasz mennyire összetett; azt is láttuk, hogy ismereteink ezen a téren még hiányosak, ezért az elmondottakhoz nincs sok megjegyzésünk. Az élő vagy elölt, patogén vagy ártalmatlan baktériumoknak kitett konvencionális állat védekezőerőit előnyösebb helyzetből mozgósítja. Ez a jelenség valószínűleg arra vezethető vissza, hogy a konvencionális állatok baktériumflórájuk révén állandóan mikrobiális ingerek hatása alatt állnak (BAUER és mtsai, 22). Azonban a mikrobiális kihívásra végső fokon a kétfajta állatcsoport nagyjából hasonlóan — a csíramentes csoport kis késéssel — reagál. Láttuk, hogy a baktériumok patogenitása megváltozik (pozitív vagy negatív irányban) attól függően, hogy egyéb mikrobatársak jelen vannak-e vagy sem. Az ezen a területen végzett gnotobiotikus kísérleteknek egyik sokat ígérő útja lehetne

annak vizsgálata, hogy baktériumok patogenitásának észlelt megváltozása és az egyéb mikrobatársak jelenléte vagy hiánya közt milyen összefüggés van.

*Szövetregenerálódás.* A csíramentes állatokkal végzett szövetregenerálódás vizsgálatok fő célja annak tisztázása volt, hogy a mikrobiális flóra milyen szerepet játszik a sebgyógyulásban; vizsgálták a szövetkárosodás után kifejlődő gyulladási folyamatokat is. Az első generációs fiatal, csíramentes tengerimalacok bőrsebgyógyulása a konvencionális állatok sebgyógyulásától eltért (199). A csíramentes állatokban kevesebb vaszkuláris szövet termelődött, és az epidermisz képződése a dermisz (hámalatti kötőszövet) képződését megelőzte. Az előbbi csíramentes állatokban egy laza mezenchimális alapon, konvencionális állatokban granulációs szöveten nőtt. Ezeket a kísérleti eredményeket jórészt megerősítették (319), a csíramentes és konvencionális állatok újonnan képződött szöveteinek vaszkularizációjában azonban különbséget nem találtak. A fiatal és öreg, csíramentes és konvencionális egerek sebgyógyulásában (sebészi beavatkozással ejtett sebek vagy fogeltávolítás) különbséget nem fedeztek fel (274, 275, 277). A sejtreakció, a vaszkularizáció módja, a kötőszövetképződés és az epidermisz újraképződése mindkét fajta állatcsoportban hasonló volt. Kollagén termelésben sem volt különbség a csíramentes és a konvencionális egerek között. A kollagéntermelés mértékét a bőrsebekbe implantált polivinil szivacsok hidroxiprolin tartalma segítségével határozták meg (35).

Nem tudjuk, hogy a tengerimalacban és egerben tapasztalt eltérő sebgyógyulási módban a bélfóra milyen szerepet játszik. Az eltérő fajra, az állatok anyagcserejének állapotára, a szövetkárosodás különböző helyére és természetére, a kontrollok baktériumflórájának eltérő voltára lehet ebben a vonatkozásban gondolni. Az egerkísérletek eredményei mindenesetre arra utalnak, hogy a flóra jelenléte a sebgyógyulásra nincs különösebb befolyással, feltéve, ha egyszerű sebgyógyulásról van szó.

### *Öregedés jelenségek*

Az öregedés vizsgálatára a csíramentes állatok igen alkalmasak. Ezt a tényt már régen felismerték, de a kísérletek végrehajtása technikai nehézségekbe ütközött. Halandósági táblázatok (life table) szerkesztésével, természetes halál utáni kóros elváltozások meghatározásával 2 dolgozat kétféle módon foglalkozik. Az egyik közleményben (105) közölt adatok szoros genetikai rokonságban levő Swiss-Webster egerekre (300 csíramentes, 300 kontroll) vonatkoznak. A konvencionális egereket 12 hónapos koruktól vették kísérletbe, hogy a korai elhullások módosító hatását kiküszöböljék. A természetes halállal elpusztult állatok kora (életnapok átlaga és standard eltérése) a következő volt: csíramentes hímek  $723 \pm 19$ , nőtények  $681 \pm 12$ ; konvencionális hímek  $480 \pm 10$ , nőtények  $516 \pm 10$ . Az elhullások megoszlása a kísérlet

folyamán nagyjából hasonló volt. Egy másik dolgozatban (335) közölt vizsgálatokhoz 50 csíramentes és 50 konvencionális ICR egeret használtak, és az egereket elválasztás utáni koruktól figyelték. Az elhullott állatok kora ezekben a kísérletekben a következőképpen alakult: csíramentes hímek  $556 \pm 43$ , nőstények  $535 \pm 46$ ; konvencionális hímek  $536 \pm 41$ , nőstények  $547 \pm 45$ . Utóbbi vizsgálatokban az állatok életének első harmadában a túlélési arány a csíramentes és a kontrolcsoportban nagyjából hasonló volt. A második harmadban a csíramentes állatok túlélési aránya magasabb volt (a csíramentes hímek és nőstények kumulálódó mortalitása a 40%-ot az 580. nap körül érte el, míg a konvencionális kontrolok ezt az értéket a 410. nap táján érték el). A kísérletben részt vevő valamennyi állat elhullását figyelve azt látták, hogy az előrehaladott korban levő csíramentes állatok közt tapasztalt nagyobb elhalálási arányszám a mortalitás értékét a konvencionális csoport mortalitásához hasonlóvá tette. Az említett tanulmányokban felhasznált csíramentes egerekben a természetes halál bekövetkezése után végzett boncoláskor a legszembetűnőbb elváltozásnak a megnagyobbodott vakbél bizonyult. A bél-simaizom tónusa olyannyira csökkent, hogy a bél ürítő mozgása többé-kevésbé leállt. Számos vakbélvolvulust észleltek. Az epehólyag esetenként folyadékkal feszülésig telve volt. Az említett elváltozások a konvencionális társakban nem fordultak elő, ezekben az állatokban a gyulladásoos elváltozások uralkodtak. A parenchimas szervek elfajulása mindkét csoportban látható volt. Neoplazmák mind a csíramentes, mind a konvencionális csoportban egyenletes eloszlásban jelentkeztek. Klinikailag egészségesnek látszó, jól takarmányozott, öreg, csíramentes patkányok levágásakor a csekély számban jelentkező jóindulatú daganatoktól eltekintve kóros elváltozások nem mutatkoztak (249). A csíramentes és a konvencionális egerekkel végzett halandósági vizsgálatok arra utalnak, hogy a csíramentes állatok tovább élnek; a csíramentes állatok közti veszteségek az életkor végének közeledtével hirtelen emelkedtek (335); e jelenség okát nem ismerjük. Lehetséges, hogy az idézett tanulmányok (105, 335) eredményei közti eltérést eltérő fajtajú állatok és takarmány használata vagy a második dolgozatban szereplő alacsony állatlétszám okozta. A két közlemény megegyezik abban, hogy a jelenleg rendelkezésre álló autoklavozott diéták öregedésvizsgálatok céljára szuboptimálisnak minősíthetők. Abból a kísérleti eredményből, hogy a csíramentes csoportban a hímek és a nőstények egyforma hosszú ideig, a konvencionális csoport nőstényei viszont hosszabb ideig élnek, arra lehet következtetni, hogy a jelenség létrejöttében a nőstények közismerten nagyobb fertőzésekkel szembeni ellenállóképessége szerepet játszik (338). Az öregedéstanulmányok egyike sem tud választ adni arra a kérdésre, hogy a csíramentes vagy a konvencionális állatok élnek-e tovább? Az eddig ismert kísérleti adatok birtokában nem is lehet a kérdésre válaszolni. Elképzelhető, hogy pl. azok az állattörzsek, amelyek hajlamosak vastagbél-elváltozásokra, de a fertőzésekkel szemben ellenálló, jobban meg-

maradnak konvencionális állapotban. E munkákból nyert legfontosabb tapasztalat szerintünk az, hogy a halálhoz vezető kóros elváltozások a csíramentes és a mikrobiális flóra hatásának kitett konvencionális állatokban alapvetően eltérőek.

### Csíramentes állatok a betegségek vizsgálatában

Az egyszerű, viszonylag olcsó gnotobiotikus módszereket nemrégén dolgozták ki, ez az oka annak, hogy a módszereket a betegségek tanulmányozására aránylag csekély mértékben vették igénybe. A most következő fejezetekben összefoglaljuk a viszonylag kisszámú, de érdeklődésre számottartó munkák tanulságait.

*Sokk, bélelzáródás és hőártalom.* Azt feltételezik, hogy a különféle traumák következtében kifejlődő sokk a szervezet antibakteriális mechanizmusa „letörésének” és a csatlakozó vaszkulotoxikus hatásoknak együttes következményeként lép fel; e jelenségeket a flóraelemek (vagy flóratermékek) keringésbe jutása okozza (JACOB és mtsai 152; 292). E vonatkozásban fontosak voltak ZWEIFACH és mtsai (368) kísérletei, amelyek során csíramentes állatokban irreverzibilis hemorrhagiás sokkot idéztek elő. Ők és a később közlő szerzők (104, 136, 206) azt látták, hogy a mesterséges véreztetést követő alacsony vérnyomás periódusa folyamán az életbenmaradás ideje és a traumára adott egyéb reakciók csíramentes és konvencionális patkányokban nagyjából hasonlóak voltak. Érdemes megjegyezni, hogy ZWEIFACH és mtsai (368) *Streptococcus faecalis*-szal, *Micrococcus pyogenes*-szel, *Micrococcus epidermidis*-szel és *alcaligenesszel* véletlenül fertőzött, ex-csíramentes patkányai annak ellenére, hogy ezek a csírák a sokkepződés után a vérből és egyéb szervekből kimutathatók voltak, a sokkhatásra ugyanúgy reagáltak, mint a csíramentes állatok. Meglepetésre HENEGHAN (136) *Staphylococcus albus*-szal és gombákkal fertőzött patkányai sokkhatással szemben lényegesen ellenállóbbak voltak, mint csíramentes vagy konvencionális társaik.

Az ischiemiás sokkra kifejtett mikrobiális hatásokat végtagleszorítással és felső mezenteriális artéria lekötéssel vizsgálták. EINHEBER és WREN (75) azt tapasztalták, hogy csíramentes és konvencionális egerekben egyaránt az érelzárással járó 3 órás végtagleszorítás gyorsan halálhoz vezetett. E vizsgálatokat MARKLEY és mtsai (185) megismételték, és más eredményre jutottak: csíramentes egerekben a sokkmortalitás lényegesen alacsonyabb volt. Az antibiotikumokkal (szulfadiazin és Streptomycin) kezelt konvencionális egerekben is ugyanezt tapasztalták. A mezenteriális artéria lekötésekor CARTER és EINHEBER (39) csíramentes és konvencionális egerekben hasonló túlélési időt és egyformán nagy elhullási arányszámot kaptak. Ellenben, amikor az artéria lekötését néhány óra múlva megszüntették, a csíramentes csoport túlélési ideje lényegesen mértékben megrövidült.

Az említett adatok többsége, mint láttuk, arra utal, hogy rágesálókat véve figyelembe a sokk körfejlődésében baktériumok vagy azok termékei primer faktorként nem szerepelnek. Megerősíti ezt a feltevést az a megfigyelés, is, hogy a sokkepizód alatt bizonyos típusú mikroorganizmusok különféle szervekbe behatolhatnak, és feltételezhetően következmény nélkül jelen lehetnek. Az érelzárás feloldása után csíramentes egerekben talált, gyorsabban bekövetkező halál azonban a kérdés bonyolultabb voltára utal. Lehetséges, hogy csíramentes állatokban az ischemiás sokkepizód alatt bioaktív anyagok (amelyek a bélben nagy mennyiségben vannak) a bélből a szövetekbe, majd az érelzárás feloldása után a keringésbe jutnak. Ez arra enged következtetni, hogy a kétfajta állatcsoportban (csíramentes és konvencionális) a sokk mechanizmusa eltérő, legalábbis részben, mindazonáltal a túlélési idővel és mortalitással kapott eredmények hasonlóak lehetnek.

Az ileumon végzett bélelktetés következtében (5 cm-es ileumszakasz teljes lekötése két helyen, érintetlen vérkeringés fenntartása mellett) mind a csíramentes, mind a konvencionális patkányok elpusztultak, a csíramentes állatok azonban hosszabb ideig éltek (6). Hasonló eredményeket kaptak csíramentes és konvencionális patkányokban (47) és kutyákban (313), ha egy kötés segítségével az ileum artériáit és vénáit is lekötötték. Érdekes, hogy azokban a konvencionális patkányokban, amelyek minimális dózis helyett teljes adag altatót (barbiturát-készítmény) kaptak, a túlélési idő meghosszabbodott. YALE és ALTEMEIER (367) csíramentes és konvencionális patkányokban egyszeri bélelktetéssel kombinált artériás, vénás vagy mindkét érlektetés hatását tanulmányozták. Azt tapasztalták, hogy a bélelktetés következtében valamennyi patkány elhullott, a csíramentes állatok azonban átlagosan kétszer annyi ideig éltek. Abban az esetben, ha a bélelktetést a bélszakaszt ellátó artériák, vénák vagy mindkettő lektetésével kombinálták, az állatok túlélési ideje lényegében nem változott, kivételt képezett a nagy letalitást okozó vénás lektetés. A bélszakaszok ereinek lektetését (béllumen lektetés nélkül) a csíramentes patkányok rendszerint túléltek, a vénás lektetés után is csak hosszabb idő múlva pusztultak el. Konvencionális kontrolokban a vénás lektetés gyors halált okozott, egyéb érlektetések után az állatok viszonylag hosszú ideig életben maradtak.

Általánosságban ezek az eredmények arra utalnak, hogy a bélbaktériumok a bélelktetés okozta traumát súlyosbítják, különösen ha a bélelktetést a véna lektetésével társítjuk. Figyelmet érdemel az is, hogy mélyebb altatás konvencionális állatokban a trauma következményeit enyhíteni képes. A bélbaktériumok hiánya csak bizonyos mértékig segít a trauma okozta bajon, az izolált artéria lektetés után viszont a csíramentes állatok rendszerint életben maradnak. A hőtrauma és sokkmortalitás közti összefüggést MARKLEY és mtsai (186) tanulmányozták. Forróvíz okozta enyhe vagy súlyos égési sebek következtében csíramentes egerekben a konvencionális kontrolokhoz képest



lényegesen alacsonyabb sokkmortalitást és kisebb mértékű késői elhullást tapasztaltak.

*A wasting szindróma.* A wasting (vagy runting) szindróma konvencionális állatok neonatális thymusirtásának következménye, limfocita eltűnéssel, csökkent ellenanyagtermelő képességgel és a „graft versus host” reakció elmaradásával járhat. A csíramentes állatokat a jelenségben részt vevő esetleges mikrobiális faktor felderítésére használják. MILLER (195) eredetileg azt állította, hogy az újszülött korban timektomizált egerek mortalitása egy patogén baktériumoktól csaknem mentes állatcsoportban lényegesen alacsonyabb volt; WILSON és mtsai (345) és MCINTIRE és mtsai (205) kimutatták, hogy születésük után 24 órával thymusirtott csíramentes egerekben — szemben a konvencionális kontrolokkal — a wasting szindróma nem fejlődött ki. Továbbá, a csíramentes egerek nyirokcsomóinak limfocita populációjára a thymusirtás nem volt hatással; szervezetük az átültetett lépsejteket kivetette, jelezvén azt, hogy az állatban az átültetett heterolog szövetek kivetésére rendeltetett immunreakció működik. BEALMEAR és WILSON (26) a thymusirtott csíramentes és konvencionális egerekben a fehérvérsejtek eltűnését nem észlelte.

A csíramentes állatok wasting szindróma ellenállóképességét a következő kísérletekben mutatták ki. BEALMEAR és WILSON (25) megfigyelték, hogy a szervezetből egyébként kiküszöbölésre kerülő homolog, metilkolantrénnal előállított tumorsejtek timektomizált csíramentes egerekben megtelepíthetők voltak, ha a gazdaszervezetet előzőleg immundepresszív hatásfokú röntgensugárral kezelték. Ellenben, ha a thymusirtott, besugárzott, csíramentes egereket a sugárzás okozta bántalomból felépülni engedték, és az átültetést csak azután (2 hónappal a besugárzás után) végezték, az átültetett sejteket az állatok szervezete kivetette. Timektomizált konvencionális egerek az átültetett homolog tumorsejteket rendszerint elfogadták röntgen besugárzás nélkül is. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az újszülött csíramentes gazdaszervezet annak ellenére, hogy limfoid szövete a thymusirtás következményeként csökkent, és védekezőmechanizmusát a röntgenbesugárzás átmenetileg károsította, olyan immunreakcióval rendelkezik, amelynek segítségével az implantált sejteket kivetni képes. A limfoid szöveteiben megfogyatkozott (thymusirtott) konvencionális állatban a mikrobiális flóra a szervezet immunapparátusát túlságosan igénybe veszi, és egy bizonytalan (gyengült) állapotot teremt, amelyben a szervezet a szövetátültetésre kellőképp válaszolni nem tud. Ezekkel a megfigyelésekkel általában megegyezik REED és UOTILA (260) lelete is, akik csíramentes egerekben kortizonacetáttal wasting betegséget idéztek elő. EKSTEDT és NISHIMURA (76) autoklávozott staphylococcus és streptococcus tenyészetek parenterális befecskendezésével wasting szindrómát állítottak elő; azt tapasztalták, hogy a csíramentes egerek ellenállóbbak voltak, mind a konvencionális kontrolok. A betegséget azonban ki lehetett váltani, ha az antigénhez homolog antiszérumot keverték. A szerzők arra

gondoltak, hogy az antigén-ellenanyag-komplex valószínűleg kiváltja a károsító ellenhatást az arra érzékeny limfoid szövetben. A wasting szindróma elleni rezisztenciát befolyásolhatja az is, hogy az állatok milyen törzsből származnak (60). Az említett megfigyelések alátámasztják azt a feltevést, hogy a mikrobák hozzájárulnak a szervezet thymusirtás után bekövetkező ellenállóképességcsökkenéséhez.

### Szájbetegségek

A csíramentes állatok a szájbetegségek tanulmányozásában a legrégebben használt, legjobban dokumentált és leggyümölcsözőbb vizsgálóeszközöknek bizonyultak. FITZGERALD (83) erről a kutatási területről összefoglalót írt. Legtöbbször patkányokat használtak; hörcsögöt és egyéb fogszuvasodáskutatásra alkalmas állatfajokat csíramentes formában még nem nyertek.

*Fogszuvasodás.* ORLAND és mtsai (220) korai megfigyelése, hogy csíramentes patkányokban — függetlenül a patkánytörzs fogékonyaságától, a diéta minőségétől és az állatok korától — fogszuvasodás nem fejlődik ki, ma is megállja a helyét. Több szerző kimutatta, hogy a bélesatorna baktériumflórájának állandó tagjai közül egyes baktérium specierek a kariesz kifejlődését okozhatják magas cukor és alacsony fluortartalmú diétán tartott patkányokban. ORLAND és mtsai (221) azt tapasztalták, hogy egy enterococcust és egy másfajta baktériumfajt hordozó gnotobiotikus patkányokban fogszuvasodás fejlődött ki. FITZGERALD és mtsai (86) szerint konvencionális patkányok bél-sarából izolált egyes streptococcus fajok kariogének voltak. Ex-csíramentes patkányokban karieszt monokontaminánsként még a következő baktériumfajok okoztak: különböző fajtájú *Lactobacillus acidophilus* törzsek (85), *Streptococcus faecalis* (330) és egy *Lactobacillus casei* törzs (273). Az ember szájából származó mikroorganizmusok fogszuvasodás okozó képességét gnotobiotikus patkányokban első ízben ORLAND (219) vizsgálta. Egyfajta lactobacillus törzs kariogénnek bizonyult, de csak a 3. monoasszociált patkánygenerációban. GIBBONS és mtsai (90, 93) szuvas emberi fogból 3 anaerob streptococcus törzset izoláltak; ezek a törzsek monoasszociánsként szájon át történő fertőzés után csíramentes egerekben és patkányokban nagyfokban kariogének voltak. Biokémiai és szerológiai próbák igazolták, hogy ezek a streptococcus törzsek a konvencionális patkány szájüregében talált törzsekkel azonosak voltak. A törzsek szacharozé agartáptalajon kifejezett buroktermelő képességgel és tapadóképesseggel rendelkeztek. A szerzők arra gondoltak, hogy ezekkel a baktériumokkal in vivo fertőzött patkányok fogán lezajló hasonló folyamat (masszív bakteriális rétegeképződés) a szuvasodás kifejlődéséért felelőssé tehető. Általában valamennyi patkánykarieszt előidéző baktériumtörzs erős savtermelő volt, bár ez a tulajdonság önmagában nem tesz kariogénné egy baktériumtörzset. E tanulmányokból az is kitűnik, hogy a kariogén baktériumok-

nak nem kell szükségszerűen proteolitikus sajátságokkal rendelkezniük. SHKLAIR és ROSEN (296) csíramentes patkányokban szemmel jól látható karieszt állított elő szaharóztartalmú diéta és szájon át bevitt, nem tapadó, dextrán-termelő tulajdonsággal rendelkező, szuvas emberi fogból származó streptococcus segítségével. Újabban ROVIN és mtsai (278) több, hosszú időtartamú kísérlet sorozatban megfigyelték, hogy ha konvencionális patkányok (Fischer törzs, kariesz iránt nem túlságosan érzékeny) moláris fogait a fognyaknál alkalmazott kötéssel selyemfonállal lekötik és az állatokat kevés cukor- és viszonylag nagy fluortartalmú diétán (35 ppm) tartják, akkor a lekötött fogakon kiterjedt szuvasodás jön létre, amely a szomszédos, nem lekötött fogakra is átterjedhet. A csíramentes patkányok a kariesznek ellenálltak abban az esetben is, ha moláris fogukat lekötötték. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a fogszuvasodás kifejlődését elősegítheti egy mechanikus stresszor ágens, amely a baktériumokat és egyéb éltelmaradékokat a fogakhoz rögzíti.

Az a tény, hogy meghatározott baktériumtörzsek fogékony gazdáiban karieszt előidézni képesek és az a megfigyelés, hogy baktériumok ellen ható ellenanyagok a nyállal is kiválasztódnak, a kutatókat arra ösztönözte, hogy a gazdaszerveget fogszuvasodás ellen immunizálják. WAGNER (329, 331) egy korábbi, *Streptococcus faecalis*-szal végzett munkája folytatásaként megkísérelt fogszuvasodás ellen immunológiai védelemet előállítani. Kariogén diétán tartott, *Streptococcus faecalis*-szal monoasszociált patkányokat adjuvált *Streptococcus faecalis* vakcinával parenterálisan sorozatban oltott: a patkányokban kariesz nem fejlődött ki. Élő streptococcus csírákkal történő ráfertőzés után 16 immunizált patkány közül 14 teljesen karieszmentes maradt, két patkányban pedig bizonytalan elváltozások alakultak ki. Hasonló beavatkozás után a nem immunizált 14 kontrol állat mindegyikében szuvasodás keletkezett. Ezekből a vizsgálatokból kitűnik, hogy a fogszuvasodás elsődleges etiológiai faktora a szájjüreg mikrobiális fertőzöttsége. A gazdaszerveget fogékonyága és a diéta összetétele (nagy cukor-, kis fluortartalom) a fogszuvasodás keletkezésében fontos járulékos szerepet játszanak.

**Ínybetegségek.** Az ínybetegséget (a gingivális szövet idült megbetegedését) gyulladáshoz és degeneratív jelenségek kísérik. A gnotobiotikus kísérletektől elvárják, hogy e két jelenséget jobban elkülönítse egymástól, és remélik, hogy ezek a kísérletek az orális flóra szerepét is tisztázzák.

Felnőtt, fiatal, csíramentes Sprague-Dawley patkányokban általában ínybetegség nem fejlődik ki. Kivételt azok az állatok képeznek, amelyekben az ínybe ágyazódott szőr idegentestreakciót vált ki. A gnotobiotikus kontrol állatokban azonban, amelyeket különböző fajú, orális eredetű mikroorganizmusokkal asszociáltak, gennyesedő plakkok képződtek, az alveoláris csont megfogyatkozott, és a gingivális szövet tönkrement (*Lactobacillus acidophilus* 85; egy anaerob aktinomyseta, 154; egy kariogen streptococcus, 90; nyolc,

emberi gingivában talált mikroorganizmus keveréke, 92). Idősebb csíramentes Sprague-Dawley patkányokban (18 hónapos kor körül) találtak periodontális elváltozásokat, amelyek a gingivális hám visszahúzódásából és csonttrikulából álltak (13, 92). A fiatal és idősebb Fischer patkányokban ínyelváltozásokat nem láttak, kivételt ez alól a beágyazódott szőr által okozott elváltozás képezett. Ezekben a csíramentes állatokban a molárisok fonállal történő lekötése után a feltett fonalak az íny-fog határ mentén csupán mélyebb barázdát vontak. Alveoláris csonttrikulást egyetlen állatban sem észleltek (27). Csíramentes egerekben periodontális csonttrikulásról számoltak be (14, 15).

Újabban az ínybetegségek patogenezisében specifikus enzimekről és egyéb bioaktív anyagokról beszélnek, ezeket az anyagokat csíramentes állatokban is vizsgálták. *Clostridium histolyticum* tenyészetekből kollagenázét izoláltak, amely hosszabb ideig tartó intragingivális alkalmazás után krónikus gingivitiszhez hasonló elváltozásokat okozott csíramentes egerekben (315). Egy a száj nyálkahártyájában oldó hatást kiváltó, orális bacteroides törzsből kollagenázét izoláltak, amely in vitro a kollagént bontotta (91). *E. coli* endotoxin ínybe történő fecskendezése után csíramentes egerek szérumában, lépében és gingivájában specifikus ellenanyagok termelődtek (314).

A gnotobiotikus kísérletek segítségével az ínybetegségek degeneratív és gyulladásos faktorait sikerült elkülöníteni. A degeneratív jellegű elváltozások kifejlődése (amelyeket tiszta formában inkább csak a csíramentes állatokban látunk) függhet az állattörzstől, kortól és feltételezhetően a diétától is. A gyulladásos elváltozások létrejöttében specifikus mikróbatársak játszanak szerepet.

### Bélfertőzések

A bélfertőzések vizsgálatának eredményei a gnotobiotikus munkák egyik legrégebbi fejezetét alkotják, mivel véletlen és szándékos mikroba asszociációk vagy kontaminálódások az ilyen természetű munkával együtt járnak. Nem állta meg a helyét az a régebbi feltevés, hogy a csíramentes állatok a normál flóra elemeire nagymértékben fogékonyak (104, 125).

Történetileg COHENDY és WOLLMAN (46) voltak az elsők (1922-ben), akik ilyen vonatkozásban patogén csírákat használtak: a szájon keresztül *Vibrio cholerae*-val monoasszociált valamennyi fiatal csíramentes tengerimalacuk elpusztult. Nem sikerült az a próbálkozásuk, amelynek során a fertőzés lefolyását egyéb baktériumok egyidejű bevitelével módosítani kívánták. Újabban ugyanezt a gazdaállatot FORMAL és mtsai (87) szájon át *Shigella flexneri*-vel fertőzték: valamennyi állat elhullott. A kísérlet eredményét hővel elölt shigella vakcinációval nem tudták befolyásolni, noha a szájon át történő fertőzés előtt mérhető ellenanyagtitert mutattak ki. Ezzel szemben csíramentes tengerimalacokat meg lehetett védeni a halálos shigella fertőzéssel szemben, ha az állatokat előzőleg élő *E. coli* csírákkal asszociálták. Az

állatok levágásakor a bélben negatív shigella lelet mellett csupán *E. coli*-t sikerült kimutatni. A *Shigella flexneri*-vel fertőzött csíramentes tengerimalacok kórboncolása során heveny fekélyképződéssel járó bélgyulladást láttak, a hasonló módon fertőzött konvencionális állatokban ezek az elváltozások hiányoztak. Csíramentes tengerimalacok *E. coli*-val történő monoasszociálása a vastagbelet a konvencionális kontrolokéhoz hasonlóvá tette (302).

*Salmonella typhi murium*-ot fertőzésekhez gyakran használnak, mivel egyes typhi murium törzsek (pl. ND 750A) monoasszociánsként alkalmazva egerekben kifejezetten patogének, nagyszámú elhullást és a tágult vakbél átmeneti kisebbedését okozzák. Szövetteni elváltozások az ileumban található; többek közt a Lieberkühn kriptákban a hám proliferálódik és a kehelysejtek száma feltűnő mértékben csökken; ezeknek az elváltozásoknak egyike-másika a természetes shigella fertőződés után kialakuló képhez hasonlít (163). A nagyfokú mortalitás immunizálással kivédhető, ha az élő csírákkal szájon át történő fertőzés előtt formalinozott *Salmonella typhi murium* vakcinát alkalmazunk. Annak ellenére, hogy a fertőzéssel szembeni rezisztenciában különbség volt az előzetesen immunizált és nem immunizált egerek közt, a vakbél átmeneti megkisebbedése mind a két csoportban ugyanolyan fokú volt. WOSTMANN (353) újabban azt tapasztalta, hogy csíramentes patkányok *Salmonella typhi murium* 750A törzsszel szájon át történő fertőzése utáni első héten a nem-immun gammaglobulinfrakció mennyisége nőtt, és a szérum szénrészecske clearance-e meggyorsult (ezek a reakciók a gazdaszervezet nem specifikus válaszait jellemzik). A második héten az immun gammaglobulinszint emelkedett, és a szérumban homolog agglutináló ellenanyagok jelentek meg, míg a nem-immunglobulinok mennyisége és a szénrészecske clearance a fertőzés előtti szintre csökkent. Ez arra utal, hogy csíramentes patkányok egy „valódi” patogén baktériummal történő fertőzéshez teljes mértékben alkalmazkodni tudnak, védetségüket kezdetben természetes immunitásuknak, később a termelődő specifikus ellenanyagoknak köszönhetik. A *Salmonella typhi murium*-ot azonban mégsem szabad csíramentes rágsálók részére obligát patogénnek minősíteni, ugyanis MARGARD és PETERS (184) kimutatták, hogy egy typhi murium törzs monokontaminánsként ex-csíramentes egerekben hónapokon keresztül ártalmatlan volt.

SASAKI és mtsai (283) munkája kitűnő példa arra, hogy a gnotobiotikus állatokat a gazdaszervezet—mikroba kölcsönhatásának és a flóraelemek egymásra kifejtett hatásának vizsgálatára használni lehet. E szerzők gnotobiotikus egerek belében a *Vibrio cholerae* és shigella perzisztáló képességét és antigénitását tanulmányozták oly módon, hogy *E. coli*-val, *Streptococcus faecalis*-szal és *Clostridium welchii*-vel ráfertőzést végeztek. A „ráfertőző” mikroorganizmusok, amelyek egyébként az egér normál bélflórájának alkotóelemei, egymással együttéltek, de a patogén mikrobákra antagonizáló hatással voltak. *E. coli* és *Streptococcus faecalis* együttes adására a shigellák a bélből eltűntek,

a vibriók eltávolításához a *Clostridium welchii* jelenléte is szükséges volt. Az egerek vibriókkal történő monoasszociációja következtében a szérumban IgM és IgG immunglobulinok, a bélfalban IgA globulin jelentek meg. A gammaglobulinok időbeli megjelenésének sorrendjéből arra lehet következtetni, hogy az IgA globulinok a koproellenanyagokkal összefüggésben vannak.

Újszülött malacok *E. coli* okozta bélbántalmaival számos közlemény foglalkozik (160, 161, 337). Ezek többek közt leírják, hogy csíramentes malacokban enteropatogén *E. coli*-val szájon át történő fertőzés után nagy mortalitással járó hasmenés jön létre. KENWORTHY és ALLEN (156) az 0140:K és 08:H szerotípusú *E. coli* törzseknek, valamint a konvencionális flórának (amely kialakulhat úgy is, hogy az állatokat konvencionális környezetbe rakják) a bélbolyhok szerkezetére kifejtett morfológiai hatását vizsgálták. Ezek a bolyhok monoasszociált állatokban egyformán karesú alakúak. Az említett kétféle szerotípussal végrehajtott diasszociáció után a bolyhok esetenként elágazó alakot vettek fel, laposabbak lettek, konvencionális flóra hatására a bolyhok bunkósbót alakúvá, satnyává, fúzióra hajlamossá váltak. A patogén 0141:K szerotípusú *E. coli*-val végzett monoasszociálás után KENWORTHY (155) a malacbél nyálkahártyájában súlyos gyulladással elváltozásokat talált. STALEY és mtsai (304) fény- és elektronmikroszkópos technika és egy szövetinvázióra hajlamos *E. coli* (055:B) törzs segítségével születés után fertőzött malacokban a bél lumenéből a szövetekbe irányuló baktériumpasszázs kétféle módját figyelték meg. A fertőzés után 2—6 órával a bélhámsejtek fimbriákkal nem rendelkező baktériumokat kebelezték be (egyed újszülött malacokban található bélhámsejtek úgy látszik rendelkeznek ilyen tulajdonsággal); e baktériumok ezután rövid idő alatt a regionális nyirokcsomókba kerültek, speciális sejtkárosodást ekkoriban nem idéztek elő. A regionális nyirokcsomók pedig, mivel ilyen korban még kevésbé hatékony szűrőképességgel rendelkeznek, a baktériumokat a keringésbe engedték. A fertőzés után 20 órával fimbriákat viselő baktériumok tapadtak a bélhámsejtekhez (ezt a folyamatot a nyálka jelenléte valószínűleg elősegíti). A betegség e stádiumában a baktériumok a hámsejtbe történő behatolásuk során a mikrovillusok degenerációját okozták. A születés utáni időszakban a baktériumok penetrációja minden bélszakaszban egyformán könnyen végbement. DREES és WAXLER (66) egy más szerotípusú, fimbriákat nem képező *E. coli* törzssel (0138:K) szájon át csíramentes malacokat fertőztek. Az állatok életkora a fertőzés idején 1—2 óra, illetve 40—120 óra volt, levágásuk a fertőzés után 3—72 óra múlva történt. Fluoreszcenciás és egyéb módszereket használva azt találták, hogy a fertőzés utáni korai időszakban kiterjedt nyálkahártyakárosodás, béltonia, baktériumpenetráció lépett fel, és a baktériumok különféle szervekben szétszóródtak. A fertőzés utáni későbbi időszakban ezek az elváltozások már nem voltak ennyire kifejezettek. Egy következő közleményben ugyanezek a szerzők (67) a már említett típusú törzssel az előbb jelzett korai időszakban fer-

tőzést végeztek, és elektronmikroszkópos leleteikről számoltak be. Ezeknek az állatoknak a bélhámsejtjeiben degeneratív jelenségeket sikerült kimutatni, de ezek az elváltozások, noha kifejezettebbek voltak, minőségükben nem különböztek a csíramentes kontrolállatokban található, normális körülmények közt is látható degeneratív elváltozásoktól. TLASKALOVA és mtsai (320) újszülött csíramentes malacokat egy nem patogén *E. coli* törzssel (086) orálisan asszociáltak. Több módszer segítségével antimikrobiális ellenanyagokat mutattak ki a bélfal limfoid rendszeréből, a savóból és valamivel később a mezen-teriális nyirokcsomókból és lépéből is.

A gnotobiotikus malacokkal végzett kísérletekből úgy tűnik, hogy a bélfalon keresztül történő mikrobiális passzázs többféle mechanizmus segítségével jöhet létre. A jelenség keletkezésében a születés utáni periódusban (amikor a bél hámbevonatának átteresztőképessége fokozatosan csökken) a gazdaszervezet kora, faja és a fertőzésre használt patogén baktériumtörzs szerotípusa játsszák a döntő szerepet. A kísérletekben zavarba ejtően sok törzset használtak. Néhány gondosan kiválasztott törzssel végzett alaposabb kísérleti munkának nagyobb értéke lenne.

*A fekélyes vastagbélgyulladás* (ulcerative colitis). A fekélyes vastagbélgyulladás kórfejlődésében egy immunológiai komponens is gyanítanak, erre utal az a tény, hogy az ebben a betegségben szenvedők vérében esetenként steril humán magzati vastagbél antigén ható ellenanyagokat lehet kimutatni. A vastagbélből készített kivonatok azonban erre a célra nem nagyon alkalmasak, mivel antigénkoncentrációjuk alacsony. Nem magzati eredetű vastagbél kivonat erre a célra nem használható, mert mikrobiális antigént is tartalmaz. PERLMANN és mtsai (225) indirekt hemagglutinációs próba segítségével kimutatták, hogy a csíramentes patkányok bélfalából készült kivonatokban tekintélyes mennyiségű antigén található, amely a humán vastagbél antigénhez hasonlóan viselkedik. HAMMARSTRÖM és mtsai (133) később felismerték azt a megtévesztő jelenséget, hogy a kolonantigének kivül emberi vércsoport antigének bőségben található csíramentes patkányok bélsatornájában, és hangsúlyozták, hogy a betegek savójából a vizsgálatok elvégzése előtt az izohemagglutinineket el kell távolítani. Azt látták, hogy ilyen vércsoport-antigének főleg a kehelysejtekben és a csíramentes bél nyákahártyájában található. Egy harmadik közleményben LAGERCRANTZ és mtsai (165) beszámoltak arról, hogy — csíramentes patkánybélantigént használva — kiterjedt vizsgálatokat végeztek gyomor-bélbántalmakban szenvedő betegek közt. Azt tapasztalták, hogy a kísérletben részt vevő majdnem valamennyi beteg vérsavójában, beleértve az egészséges kontrolok is, anti-kolon ellenanyagok voltak kimutathatók. Mindazonáltal magasabb hemagglutinin titerek (1 : 16 felett) leggyakrabban a fekélyes vastagbélgyulladásban szenvedők közt fordultak elő, és az egyéb csoportok titeréhez viszonyított különbség statisztikailag biztosított volt.

Ezek a vizsgálatok igazolták, hogy a fekélyes vastagbélgyulladás etiológiájában autoimmunjelenségek is részt vesznek. Úgy tűnik, hogy a gnotobiotikus technikát a betegség diagnosztikájában használni lehet.

**Urémia.** EINHEBER és CARTER (74) gnotobiotikus patkányokban vizsgálták azokat a feltevéseket, amelyek szerint az urémiás szervezet a bélflórából eredő toxikus anyagokat visszatartja. Kétoldalt veseirtott, valamint „áloperált”, víztől és takarmánytól elvont állatokat használtak. Azt tapasztalták, hogy kísérleti urémiában a csíramentes patkányok átlagos túlélési ideje statisztikailag biztosítottan hosszabb volt ( $122 \pm 6$  óra), mint a konvencionális kontrolok túlélési ideje ( $76 \pm 4$  óra). A mono-, di- és tetraasszociált ex-csíramentes egerek túlélési ideje a két csoport (csíramentes és konvencionális) túlélési idői közé esett. Az ex-csíramentes állatokat *Staphylococcus albus*-szal és *Proteus mirabilis*-szal, valamint *Staphylococcus albus*, *Proteus mirabilis*, *E. coli* és *Streptococcus faecalis* tenyészetek keverékével asszociálták. Az urémia kialakulása során a gnotobiotikus patkányokban a vakbél nem kibehedett meg. Valamennyi áloperált, víztől és takarmánytól megfosztott kontrol állat a vártnál jóval hosszabb ideig élt, de meglepetésre, az áloperált csíramentes csoport túlélési ideje a konvencionális kontrolokhoz képest lényegesen rövidebb volt. Azt is kimutatták, hogy valamennyi áloperált csoportban a hímek a nőstényeknél lényegesen hosszabb ideig éltek. Ezeket a vizsgálatokat CARTER és munkatársai (40) tovább folytatták. Amikor a csíramentes állatokkal kapott eredményeket a konvencionális kontrolokkal kapott leletekkel összevetették, az látszott, hogy a csíramentes csoportban a vér ureum nitrogénje lényegesen alacsonyabb értéket mutatott, a vakbél tartalom ureum-szintje pedig magas értéket ért el. Gyulladástól a valódi fekélyképződésig terjedő elváltozásokat csupán az urémiás konvencionális patkányok belében találtak. Másrészt az urémiával járó kardiovaszkuláris elváltozások (szívizom és arteriák elhalása és meszesedése) a csíramentes csoportban előbb kezdődtek és gyakrabban fordultak elő. Újabbán VISY és mtsai (324) vizsgálatokat végeztek vesekárosított (egyoldali veseirtás ellenkező oldali veseartéria lekötéssel és a lekötés 120 perc eltelte utáni feloldásával) csíramentes, antibiotikumokkal (Bacitracin, Streptomycin és Nystatin) kezelt konvencionális és rendes konvencionális patkányokban. E vizsgálatok eredményei megerősítették azt a feltevést, hogy a vesekárosított csíramentes patkányok tovább élnek, mint konvencionális társaik; az antibiotikumokkal kezelt állatok a csíramentes csoport állataihoz hasonlóan viselkedtek. Az operáció utáni időszakban a véráramlássebesség és a vese koncentrálóképesége normális szinten maradt, míg a konvencionális kontrolokban ezek a funkciók lényegesen mértékben csökkentek. A jelzett tiourea vizeletbe és vakbél tartalomba történő ürülése lényegesen magasabb volt a csíramentes és az antibiotikumokkal kezelt patkányokban, mint konvencionális társaikban.

E vizsgálatok arra engednek következtetni, hogy az urémiás szervezet-



ben a normál mikrobiális flóra jelenléte a túlélést hátrányosan befolyásolja. Ez a károsító hatás valószínűleg úgy jön létre, hogy bélsérüléseken keresztül a mikrobák betörnek a szervezetbe, és ennek következtében a nitrogéntartalmú anyagok ürítése kárt szenved. A csíramentes állatok használatának előnye, hogy megnagyobbodott vakbelük hatékony dializáló hártvaként működik a nitrogént tartalmazó bomlástermékek kiküszöbölésére, emellett a bélen keresztül történő mikrobiális invázió lehetősége is kizárt. Másrésről azonban a csíramentes állatokat sújtják a kifejezett kardiovaszkuláris elváltozások, amelyek okát nem ismerjük. A koplaltatás és szomjaztatás következtében elhullott, áloperált, csíramentes állatok rövidebb túlélési ideje azzal lehet összefüggésben, hogy belükből bioaktív anyagok szívódnak fel (97).

**Mycoplazmosis.** A *Mycoplasma pulmonis*, *M. salivarius* és *M. pneumoniae* kórokozó képességét LUTSKY és ORGANICK (181) csíramentes és konvencionális egerekben orrüregbe történő fertőzéssel vizsgálták. A *M. pulmonis*-szal fertőzött csíramentes egereknek több mint 60%-ában tüdőgyulladás fejlődött ki, természetes körülmények közt megbetegedett egerekben is lényegében ezt az elváltozást találjuk. A másik két mycoplasma törzs nem volt fertőző, a légutakból egy ideig kimutathatók voltak, végül teljesen eltűntek. Konvencionális egerek esetében mindhárom törzs az állatok nagy részében tüdőgyulladást idézett elő, közülük a *M. pulmonis* volt a leginkább patogén. Egy következő tanulmányban ORGANICK és mtsai (218) a *M. pulmonis* által okozott elváltozások kifejlődésének szakaszait írták le. A mikrobák először a bronchiális felületről az alveolusokba jutnak; itt a mikroorganizmusokat a fagocitáló polimorf sejtek legnagyobbbrészt bekebelezik. A betegség későbbi szakaszaiban a pneumocitákban „gyűrűformákat” észleltek. Ezeket a képződményeket a mycoplasmák intracitoplazmás fejlődési alakjainak vélik.

Ezek a gnotobiotikus technikával végzett vizsgálatok a mycoplazmoszisos gazdaspecifitásának jobb megismerésére irányuló első lépéseknek tekinthetők. A konvencionális állatokban a különböző mycoplasmákkal történő fertőzés után kialakuló tüdőgyulladás arra utal, hogy a konvencionális szervezet a betegséggel szemben érzékenyebb. E jelenség okát nem ismerjük.

**Tuberkulózis.** MIYAKAWA és KISHIMOTO (203) voltak az első kutatók, akik gnotobiotikus kísérleteket végeztek a *Mycobacterium tuberculosis* baktériummal; csíramentes és konvencionális egereket szájon át a H37 Rv törzssel fertőztek. Fő megállapításuk az volt, hogy a tuberkulózis baktériumok a fertőzött, ex-csíramentes egerekből később tűntek el. Egyéb vizsgálatokból (149, 310) kiderült, hogy BCG baktériumokkal intravénásan kezelt csíramentes és konvencionális egerek lépéből és tüdejéből visszanyert baktériumok száma nagyjából hasonló volt akkor is, ha a vizsgálatokat a fertőzés után 35 napig folytatták.

HOBBY és mtsai (141) igen alaposan és részletesen vizsgálták, hogy csíramentes és konvencionális egerekben a *M. tuberculosis* H37 Rv törzse és

a *Mycobacterium bovis* Vallée törzse intravénás befecskendezés után milyen hatást fejtenek ki. Mindkét fajta egérsoport fogékony volt a humán és bovin típusú törzsszel történő fertőzésre, és nagyjából egyformán reagáltak: fertőzés után 2—4 héttel az 50%-os túlélési idő a csíramentes állatokban 18,9 nap, a konvencionális kontrolokban 19,1 nap volt. A kórbonctani kép és a baktériumok eloszlása a két csoportban egyforma volt. A fertőzött, ex-csíramentes egerekben az elhullási arányszám százalékanak és az elhullás idejének grafikus ábrázolása következetesen hasonló görbéket adott, míg a konvencionális kontrol csoportokban ebben a vonatkozásban nagyfokú variáció volt észlelhető. Az ex-csíramentes egerekben a bovin típusú törzsszel történő fertőzés előtt 4 héttel intravénásan adott, élő BCG baktériumokkal való kezelés az 50%-os túlélési időt majdnem megkettőzte, de a fertőzés halálos kimenetele ellen az állatokat nem védte meg. A konvencionális kontrolokban a BCG-vel történő előzetes kezelés a túlélési időt ilyen mértékben nem hosszabbította meg. HOBBY és mtsai (142) tovább vizsgálták a csíramentes egerek tuberkulózis vakcinára adott kifejezettebb immunválaszát; a BCG immunizálást azonos módon végezték, és az egereket ezután *M. bovis*-szal kezelték. Eredményeik szerint csíramentes egerek előzetes BCG oltása a ráfertőzés utáni túlélési időt a nem immunizált csíramentes kontrolokhoz képest számottevő mértékben meghosszabbította. Ilyen kísérleti elrendezésben a csíramentes egerekkel végzett kísérletek következetesen megisméltendő eredményeket adtak. Konvencionális kontrolokban ilyen törvényszerűséget nem tapasztaltak, és különböző termelési számú BCG vakcinák ismételt vizsgálatának eredménye változó volt. Azt is kimutatták, hogy a BCG vakcinában levő élőcsírák száma és a vakcina által kiváltott védőhatás közt nincs összefüggés. E megállapítás csíramentes és konvencionális állatokra egyaránt vonatkozott. Ezen a kutatási területen a gnotobiotikus állatok használatának előnye abban van, hogy az állatok a tuberkulózis baktériummal történő fertőzésre vagy immunogén ágensek alkalmazására egyöntetűen reagálnak. HOBBY és mtsai említett közleményeikben és egyéb munkáikban (140) arra utalnak, hogy vizsgálataik eredménye összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy a csíramentes állatoknak fejletlen, de teljes mértékben reakcióképes védekező mechanizmusuk van (tehát olyan gazdaszervezetek, amelyek „nem elfoglalt” anti-gén receptorokban gazdagabbak, mint konvencionális társaik).

**Gombás fertőzések.** A gnotobiotikus állatok használatát indokolták azok a megfigyelések, melyek szerint különféle gazdaszervezetekben antibiotikumos kezelés hatására a bélflóra összetevőinek száma csökkent, és ennek következtében a gombák a bélsatornában elszaporodtak. BALISH és PHILLIPS (17) kísérleti állatnak a csirkét választották, mivel ezeket az állatokat természetes gombahordozóknak tartják. Rendes diétán tartott, egy hetes, csíramentes és konvencionális csirkéket szájon át *Candida albicans*-szal fertőztek. A fertőzés a csirkék egészségi állapotát szemmel látható módon nem befolyásolta.

Az állatokat kb. 1 hónap múlva levágták, boncolásukkor azt találták, hogy a csírák a teljes gyomorbélesatorna hosszában megtelepedtek. Gombatelepeket legnagyobb számban a begyből és a vakbélből izoláltak, kb. százszor többet, mint a konvencionális kontrolokból. Az ex-csíramentes csirkékben a fonalas (hypha) formák uralkodtak, a konvencionális kontrolokban csupán élesztő (yeast) formákat találtak. A monoasszociált csirkék begye a fertőzés jeleit mutatta, a hámban erőteljes hypha és blastospora szaporodás volt észlelhető; a konvencionális kontrolok normálisak maradtak. Úgy tűnik, hogy a diéta a betegség keletkezésében fontos szerepet játszhat, mivel egy másik kísérletben nem teljesen megfelelő diétán (valószínűleg alacsonyabb vitamintartalommal) tartott konvencionális csirkékben *Candida albicans* fertőzésre a csírák élesztő formában a szervekbe törtek, ami gyakran az állatok elhullásával együtt járt. Az ex-csíramentes csirkék viszont lényegében véve egészségesek maradtak, csupán az előbb említett begyelváltozások fejlődtek ki bennük. A normál bélflóra elemei védik a megfelelő diétán tartott csirkéket a *Candida albicans* fertőzés és invázió ellen (18). *E. coli*-val történő monoasszociáció fiatal, ex-csíramentes csirkéket candidafertőzés ellen védetté tett. A *Streptococcus faecalis*-szal történő monokontaminálásnak ilyen hatása nem volt.

Csíramentes és konvencionális egerekben *Candida albicans* megtelepítésre kísérleteket végeztek (229). Egy fogékony, ex-csíramentes egértörzsből tekintélyes mértékű súlyvesztést, hypha formák bélbeni megtelepedését és a csirkék begyében talált elváltozásokhoz hasonló gyomorelváltozásokat találtak. A konvencionális egerek egészségesek maradtak, belükben jobbra az élesztőformák telepedtek meg. E megfigyelések arra utalnak, hogy a fogékony, megfelelő diétán tartott gazdaszervezet bélflórája révén a *C. albicans* hypha formák kialakulását megakadályozni képes, és ennek következtében csupán enyhe fertőzés alakul ki. E védőhatás kifejtésében csupán egyes flóraelemek, pl. az *E. coli* csírák látszanak részt venni. A nem kellő módon táplált konvencionális állatokban más képet találunk, a gazdaszervezet a gombasejtek (és valószínűleg egyéb patogén mikroorganizmusok) szervekbe történő betörését képtelen megakadályozni.

Hisztoplazmózisban a kórkép rendkívül hasonló. DEL FAVERO és FARRELL (59) kutyákra általában patogénnek tartott *Histoplasma capsulatum* intratracheális befecskendezésére kapott válaszokat korlátolt számú fiatal, 8 hetes, csíramentes és konvencionális kutyákban vizsgálták. Az állatokat a fertőzés után meghatározott időközökben (a legidősebb 32 napig élt) levágták és boncolták; valamennyi állat tüdejében, májában, lépében, mandulájában és a légutakhoz és a bélesatornához tartozó nyirokcsomókban granulomás gyulladás fejlődött ki, egyes állatokban ez már a fertőzés utáni 7. napon bekövetkezett. A hisztoplazmákat a szervekből legtöbbször ki lehetett mutatni. Csíramentes állatokban a lappangási idő, a tünetek és az elváltozások

minősége a konvencionális állatokban található természetes betegséghez hasonlóak voltak. A két csoport közt csupán abban volt különbség, hogy az exsírmentes csoportban a betegség enyhébb formában zajlott le.

### *Protozoák által okozott fertőzések*

*Amőbiázis.* Az 50-es években és a 60-es évek elején PHILLIPS és mtsai (231, 234, 236) úttörő munkát végeztek ezen a területen. Kimutatták, hogy csírmentes tengerimalacokban *Entamoeba histolytica* vakbélbe vitele után bélgyulladás nem fejlődött ki. Szokatlanul nagy inokulummal történő fertőzés után a monoasszociált állatokban viszonylag enyhe elváltozások keletkeztek. Ha a csírmentes tengerimalacokat *E. histolytica* mellett még *E. coli*-val vagy *Aerobacter aerogenes*-szel is asszociálták, bélgyulladásnál látott elváltozások jöttek létre kisszámú amőbával történő fertőzés hatására is. Újabban PHILLIPS és GORSTEIN (232) hasonló módon fiatal, csírmentes tengerimalacokat fertőztek. Röviddel a monoasszociáció után a kontaminált állatok különböző csoportjainak szájon át *E. coli*, *Cl. perfringens*, *S. faecalis*, *S. aureus*, *L. acidophilus* *B. subtilis* baktériumokat adtak, és egy közelebbről nem meghatározott micrococcus törzset is használtak. Az állatokat az asszociálás után 2 hónapon keresztül figyelték. Valamennyi amőbákkal monoasszociált állat egészséges maradt, az összes amőba-baktérium kombinációval fertőzött állat vastagbélben elváltozások fejlődtek ki, a legpatogénebbnek az amőba-*B. subtilis* diaszociálás bizonyult. Az állatok vastagbélben talált elváltozások (elhalásos fekélyképződés a vakbélben) az amőbákkal fertőzött konvencionális állatokban kifejlődő bélgyulladásra emlékeztettek. *E. coli*, valamint micrococcus társkontaminálás után elhullások alig jelentkeztek, és különösen az *E. coli* esetében a vakbélben található kisszámú elváltozások a nyálkahártya felületére korlátozódtak. Az egyéb mikroorganizmusok ilyen tekintetben a két határeset (*B. subtilis* és *E. coli*) közé estek. Az amőba társfertőzést mellőzve, az egyes baktériumfajok monoasszociánsokként ártalmatlanok voltak, kivételt csak a *B. subtilis*-szel monokontaminált csoport képezett; ezekben az állatokban a vakbél falában gyulladást lehetett megfigyelni. Ezek a megfigyelések gyarapították ismereteinket az egyes bélflóraelemek „potenciáló” hatásáról, amelynek segítségével a gazdaszervezetben elváltozásokat idézhetnek elő. Az egyes flóraelemek közül tengerimalacokra különösen a *B. subtilis* bizonyult veszélyesnek, noha a baktériumot elismerten ártalmatlannak tartják.

*Hisztomoniazis.* A bélflóra protozoa patogenitást módosító hatásának kérdését *Histomonas meleagridis*-szel (a pulykák blackheadjének állítólagos okozójával) is vizsgálták. DOLL és FRAKNER (64) hisztomonaszokkal csírmentes és konvencionális pulykákat szájon át fertőzött. Valamennyi hisztomonasszal monoasszociált pulyka életben és egészségben maradt. Majdnem valamennyi (12 állatból 11) fertőzött konvencionális pulyka vakbélben és májában jellemző

elváltozások fejlődtek ki, és az állatok 21 nap alatt elpusztultak. BRADLEY és REID (34) a kísérleteket megismételték annak kiderítésére, hogy mely mikrobatársak támogatják a hisztomonaszok patogenitását konvencionális pulykákban. Fiatal, csíramentes és konvencionális pulykákat szájon és végbélen keresztül hisztomonaszokkal fertőztek. A társasszociálást legtöbbször *E. coli*-val szájon át végezték, de felhasználtak *Cl. perfringens*, *B. subtilis* vagy *Proteus mirabilis* törzseket is. A *Cl. perfringens*, *B. subtilis* és hisztomonasz társfertőzések következtében a jellegzetes betegség kialakult; a proteusszal történt társasszociáció esetén ez nem következett be. Tekintettel arra, hogy a *Cl. perfringens* és a *B. subtilis* pulykákban nem tartoznak a normál bélflóra tagjai közé, a betegségben játszott szerepüket tovább nem vizsgálták. *E. coli*-val kapcsolatban a szerzők klasszikus kritériumokat próbáltak használni arra, hogy a betegséget és az okozó ágenszt egymással vonatkozásba hozzák. A következő megfigyeléseket tették: (1) mind az orális, mind a rektális *E. coli*—*Histomonas meleagridis* bevitel ex-csíramentes pulykákban jellemző enterohepatitist váltott ki; (2) beteg pulykákban az *E. coli*-t szintenyészetben találták, a megbetegedett szervekből a *Histomonas meleagridis*-t az *E. coli* kizárólagos társaságában nyerték vissza; (3) a visszanyert *Histomonas* és *E. coli* szintenyészetével végrehajtott mesterséges fertőzés a természetes körülmények közt jelentkező betegséghez hasonló volt; (4) a mesterségesen (visszanyert kultúrákkal) fertőzött állatok elváltozásaiból a két mikroorganizmust szintenyészetben kitenyésztették. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a pulykák fertőző enterohepatitisz betegségében az etiológiai ágenszt a *Histomonas-meleagridis*—*E. coli* kombinációja képviseli.

### Következtetések

Az elmúlt évtizedben a gnotobiotikus állatok a kutatás számára egyre jobban rendelkezésre álltak, a gnotobiotikus technika leegyszerűsödött addig a pontig, hogy kezd szélesebb körben használhatóvá válni. A csíramentes állatok jellemzői és a gazdaszervezet—mikróba kölcsönhatás vizsgálata közben jelentős tanulmányok születtek. Ezek főleg táplálkozásélettannal, anyagcserével és a szervezet védekező mechanizmusainak tanulmányozásával foglalkoztak. Sikereket értek el a bélflóra szerepének tisztázásában is. Ezek során eredményesen próbálták a bélflórahatásokat a nem mikrobás eredetű hatásoktól elkülöníteni és a betegségek etiológiai ágensei és a bélflóra közti összefüggésre fényt deríteni. E munkák során is figyelemreméltó anyag gyűlt össze. Mindazonáltal a nagyfontosságú kutatási területeken az előbb említett eredmények lassan materializálódtak annak ellenére, hogy manapság csíramentes állatok már generációkon keresztül sikerrel tenyészthetők. Noha a gnotobiotákkal végzett vizsgálatok a rákkutatás, a szív- és vérkeringési betegségek tanulmányozásához jelentős alapokat szolgáltattak, e problémák „gyökeréig” azon-

ban mégsem hatoltak le; emiatt az említett betegségek megelőzésével és gyógyításával kapcsolatos munkákhoz e vizsgálatok nem járultak hozzá. Így a gnotobiotikus állatokkal végzett kísérletekben a „nagy” sikerek részbeni elmaradása a kezdeti lelkesedést bizonyos mértékig lehűtötte.

Ennek több oka lehet. Gondolni lehet arra, hogy mikróbatársaink a konvencionális gazdaszervezet életében végül is nem játszanak túl fontos szerepet. A tenyésztési módszerek és a diéta javításával a csíramentes és a konvencionális állatok közt egyre több hasonlóságot találunk. Csíramentes és konvencionális állatok hasonlóak egymáshoz olyan értelemben, hogy mindkét állatesoport lényegében környezetéhez alkalmazkodott, normális állatokból áll. Ezenkívül a csíráknak a gazdaszervezetre kifejtett hatása főként azokban a szervekben jelentkezik, amelyek a flórával közvetlenül érintkeznek. Amennyiben ilyen hatások más szervekben is mutatkoznak, a csíramentes és a konvencionális állatok közti különbség inkább kvantitatív, mint kvalitatív jellegű.

A gnotobiotikus kísérletek eredményeinek értelmezését nehezítik a kísérleti alanyok nem eléggé ismert, bonyolult reakciói is. Kezdetben azt gondoltuk, hogy a csíramentes állat lényegében gazdaszervezet csírák nélkül. Később megtanultuk, hogy a csíramentes állat olyan gazdaszervezet, amelyből a csírák kiváltotta reakciók hiányoznak. Újabban világossá vált, hogy a csírák hiánya következtében egy sor közvetett vagy közvetlen, helyi vagy általános jelenség lép fel. Erre példa a csíramentes állatokban talált csökkent anyagcsere és szívperctérfogat, amelyeket a megnagyobbodott vakbél időben történő sebészi kiirtásával javítani lehet. Ezek alapján a megnagyobbodott vakbél, amely a csírák hiányának közvetlen következménye, egy másodlagos, nem baktériumos eredetű mechanizmus alapján a gazdaszervezetet közvetett módon károsítja, hátrányos helyzetbe hozza. Ennek következményeként más funkciók is kárt szenvedhetnek stb. Sok egyéb, eddig ismeretlen, fontos jelenség is végbemehet a csíranélküli életben. Ilyen körülmények közt nehéz a kísérletek tervezése és értékelése; a csíramentes állatokat használó kutatók ettől a bizonyos mértékig „sötétben” folyó munkától elbátortalanodhatnak. Elméletileg még mindig megállja a helyét az a meghatározás, hogy a csíramentes állatokkal végzett kísérletek a mikrobiológiai értelemben vett szintenyészet elvének szélesebb biológiai körben történő alkalmazását testesítik meg, bár ennek az általánosításnak értékét erősen csökkenti az a tény, hogy a soksejtű szervezetekben a jelenségek, funkciók rendkívül összetettek.

E kutatási terület még bőségben levő „hézagait” eltüntetni csak hatékonyabb munkával és nagyobb érdeklődéssel lehet. Lehetséges, hogy egyes speciális területeken felismerik majd a gnotobiotikus kísérletek értékét, és ez elősegíti ennek a kutatási eszköznek további elterjedését. Ilyen katalizátor lehet többek közt az úrkutató úrhajóban történő „izolálásának” vizsgálata (29), a csíramentes izolátorok alkalmazása emberi beteganyagon különböző

klinikai indikációk alapján (62, 150), a környezetszennyeződés kérdéseinek tanulmányozása, a széles körben használt antibiotikumok káros mellékhatásainak kutatása stb. Ebben a vonatkozásban összehasonlítást tehetünk a szövettan-technika sorsának alakulásával; ezt a technikát addig, amíg értékét a sejtenetikában, a vírusok szaporításában fel nem ismerték, hosszú éveken keresztül csupán néhány laboratóriumban használták.

Kétségtelen tény — amelyből a gnotobiotákkal kísérletezők biztatást nyerhetnek —, hogy a gazdaszervezet—mikróba kölcsönhatás kérdésében a végső szót a gnotobiotikus kísérletek fogják kimondani. A kérdéseinkre kapott válaszok azonban reményeinkkel ellentétben nem lesznek olyan egyszerűek, mint ahogyan azt eredetileg reméltük. Ötven évvel ezelőtt a kutatók a kísérleti állatok genetikájával, standard diétájával nem sokat törődtek. Manapság ezeket az eredményeket nem mindig vesszük komolyan. Mit fognak 50 év múlva utódaink a mi munkánkról gondolni, mi lesz a véleményük arról, hogy manapság kísérleti állatainkat legtöbbször mikrobiológiai standardizálás nélkül használjuk?

*Köszönetnyilvánítás.* Köszönettel tartozunk William Antopol dr.-nak (USA), hogy munkánk katalizátora volt. Kéziratunk elkészítésében nyújtott segítségéért és a kézirat kritikai átolvasásáért a következő kollégáknak mondunk köszönetet: M. E. Coates, Anglia; G. L. Hobby, E. Bruckner-Kardoss, T. F. Kellogg, J. R. Pleasants, B. S. Reddy, M. Wagner, B. A. Teah, B. S. Wostmann, T. Z. Csáky, S. Rovin és R. F. Wiseman, USA. Medgyesi Margitnak és Ertl Ferencnének köszönjük a technikai segítséget.

A munka elvégzését lehetővé tette a Public Health Service AM 14621 jelzésű és a National Institute of Dental Research DE 02351 jelzésű alapítványa. A kapott segítségért ez úton is köszönetet mondunk.

#### IRODALOM

1. ABRAMS, G. D.: Effects of the normal flora on host defenses against microbial invasion, p. 197—206. *In* Mirand, E. A. and Back, N. (ed.), *Germfree Biology*. Plenum Press, New York (1969).
2. ABRAMS, G. D., BAUER, H. and SPRINZ, H.: Influence of the normal flora on mucosal morphology and cellular renewal in the ileum. A comparison of germfree and conventional mice. *Lab. Invest.* **12**, 355—364 (1963).
3. ABRAMS, G. D. and BISHOP, J. E.: Germfree techniques in experimental pathology; a survey of morphologic changes in, and the research potential of, the germfree guinea pig. *Univ. Mich. Med. Bull.* **27**, 136—147 (1961).
4. ABRAMS, G. D. and BISHOP, J. E.: Effect of the normal microbial flora on the resistance of the small intestine to infection. *J. Bacteriol.* **92**, 1604—1608 (1966).
5. ABRAMS, G. D. and BISHOP, J. E.: Effect of the normal flora on gastrointestinal motility. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **126**, 301—304 (1967).
6. AMUNDSEN, E. and GUSTAFSSON, B. E.: Results of experimental intestinal strangulation obstruction in germfree rats. *J. Exp. Med.* **117**, 823—832 (1963).
7. ARNASON, B. G., SALOMON, J. C. and GRABAR, P.: Anticorps antifoie et immunoglobulines sériques chez les souris classiques et axéniques; étude comparative après nécrose hépatique aiguë provoquée par le tétrachlorure de carbone. *C. R. Acad. Sci. Paris* **259**, 4882—4885 (1964).

8. ASANO, T.: Inorganic ions in cecal content of gnotobiotic rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **124**, 424—430 (1967).
9. ASANO, T.: Anion concentration in cecal content of germfree and conventional mice. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **131**, 1201—1205 (1969).
10. ASANO, T.: Modification of cecal size in germfree rats by long-term feeding of anion exchange resins. Amer. J. Physiol. **217**, 911—918 (1969).
11. ASHE, W. K., SCHERP, H. W. and FITZGERALD, R. J.: Previously unrecognized virus from submaxillary glands of gnotobiotic and conventional rats. J. Bacteriol. **90**, 1719—1729 (1965).
12. BACK, N., STEGER, R. and MIRAND, E. A.: Kinin-forming activity in cecal contents of germfree and conventional mice, p. 173—177. In Mirand, E. A., and Back, N. (ed.), Germfree Biology. Plenum Press, New York (1969).
13. BAER, P. N. and FITZGERALD, R. J.: Periodontal disease in the 18-month-old germfree rat. J. Dent. Res. **45**, 406 (1966).
14. BAER, P. N. and NEWTON, W. L.: The occurrence of periodontal disease in germfree mice. J. Dent. Res. **38**, 1238 (1959).
15. BAER, P. N., NEWTON, W. L., WHITE, C. L.: Studies on periodontal disease in the mouse VI. The older germfree mouse and its conventional control. J. Periodont. **35**, 388—396 (1964).
16. BAEZ, S. and GORDON, H. A.: Tone and reactivity of vascular smooth muscle in germfree rat mesentery. J. Exp. Med. **134**, 846—856 (1971).
17. BALISH, E. and PHILLIPS, A. W.: Growth, morphogenesis, and virulence of *Candida albicans* after oral inoculation in the germfree and conventional chick. J. Bacteriol. **91**, 1736—1743 (1966).
18. BALISH, E. and PHILLIPS, A. W.: Growth and virulence of *Candida albicans* after oral inoculation in the chick with a monoflora of either *Escherichia coli* or *Streptococcus faecalis*. J. Bacteriol. **91**, 1744—1749 (1966).
19. BAUER, H., HOROWITZ, R. E., LEVENSON, S. M. and POPPER, H.: The response of the lymphatic tissue to the microbial flora. Studies on germfree mice. Amer. J. Pathol. **42**, 471—483 (1963).
20. BAUER, H., HOROWITZ, R. E., PARONETTO, F., EINHEBER, A., ABRAMS, G. D. and POPPER, H.: Influence of the microbial flora upon response of serum gammaglobulin and lymphatic tissue to irradiation. Studies in germfree mice. Lab. Invest. **13**, 381—388 (1963).
21. BAUER, H., HOROWITZ, R. E., WATKINS, K. C. and POPPER, H.: Immunologic competence and phagocytosis in germfree animals with and without stress. J. Amer. Med. Ass. **187**, 715—718 (1964).
22. BAUER, H., PARONETTO, F., BURNS, W. A. and EINHEBER, A.: The enhancing effect of the microbial flora on macrophage function and the immune response. A study in germfree mice. J. Exp. Med. **123**, 1013—1024 (1966).
23. BAUER, H., PARONETTO, F., PORRO, R. F., EINHEBER, A. and POPPER, H.: The influence of the microbial flora on liver injury and associated serum gamma-globulin elevation. A study in germfree rats treated with 3'-methyl-4-dimethyl-amino-azobenzene. Lab. Invest. **16**, 847—857 (1967).
24. BEALMEAR, P. M. and WILSON, R.: Histological comparison of the thymus of germfree (axenic) and conventional CFW mice. Anat. Rec. **154**, 261—273 (1966).
25. BEALMEAR, P. M. and WILSON, R.: Homograft rejection by neonatally thymectomized germfree mice. Cancer Res. **27**, 358—361 (1967).
26. BEALMEAR, P. M. and WILSON, R.: Leukocyte counts of germfree neonatally thymectomized CFW mice. Blood. **30**, 112—119 (1967).
27. BEAVER, M. H. and WESTMANN, B. S.: Histamine and 5-hydroxytryptamine in the intestinal tract of germfree animals, animals harbouring one microbial species and conventional animals. Brit. J. Pharmacol. **19**, 385—393 (1962).
28. VAN BEKKUM, D. W.: Radiation biology, p. 237—266. In Coates, M. E. (ed.), The germfree animal in research. Academic Press Inc., New York (1968).
29. BENSON, M. H., KAPLAN, H. I., THOMAE, F. W., Jr. and PRINCE, A. E.: A study of the significance of the microfloral changes occurring during longterm space flight, p. 354—359. In Miyakawa, M., and Luckey, T. D. (ed.), Advances in germfree research and gnotobiology. CRC Press, Cleveland (1968).
30. BERNARD, C.: Leçons sur les propriétés physiologiques et les altérations pathologiques des liquides de l'organisme. Baillière Paris (1959).
31. BORGSTRÖM, B., DAHLQVIST, A., GUSTAFSSON, B. E., LUND, G. and MALMQUIST, J.: Trypsin, invertase and amylase content of feces of germfree rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **102**, 154—155 (1959).



32. BOSMA, M. J., MAKINODAN, T. and WALBURG, H. E., Jr.: Development of immunologic competence in germfree and conventional mice. *J. Immunol.* **99**, 420—430 (1967).
33. BOUSSINGAULT, J. B.: Recherches chimiques sur la végétation entreprises dans le but d'examiner si les plantes prennent de l'azote à l'atmosphère. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **6**, 102—112 (1838).
34. BRADLEY, R. E. and REID, W. M.: *Histomonas meleagridis* and several bacteria as agents of infectious enterohepatitis in gnotobiotic turkeys. *Exp. Parasitol.* **19**, 91—101 (1966).
35. BRODY, G. L., BISHOP, J. E. and ABRAMS, G. D.: Normal flora and collagen production. *Arch. Pathol.* **81**, 268—270 (1966).
36. BROWNLEE, A. and MOSS, W.: The influence of diet on lactobacilli in the stomach of the rat. *J. Pathol. Bacteriol.* **82**, 513—516 (1961).
37. BRUCKNER-KARDOSS, E. and WOSTMANN, B. S.: Cecectomy of germfree rats. *Lab. Anim. Care* **17**, 542—546 (1967).
38. CANADA, J. C. and STRONG, D. H.: Incidence of *Clostridium perfringens* in the livers of conventional and gnotobiotic mice. *J. Bacteriol.* **89**, 1623—1624 (1965).
39. CARTER, D. and EINHEBER, A.: Intestinal ischemic shock in germfree animals. *Surg. Gynecol. Obstet.* **122**, 66—76 (1966).
40. CARTER, D., EINHEBER, A., BAUER, H., ROSEN, H. and BURNS, W. F.: The role of the microbial flora in uremia. II. Uremic colitis, cardiovascular lesions, and biochemical observations. *J. Exp. Med.* **123**, 251—266 (1966).
41. CHAKHAVA, O. V., LEBEDEV, K. A. and TSATSENKINA, T. I.: Morphologic and functional features of lymphoid organs and adrenals in germfree guinea pigs. *Ark. Anat. Histol. Embriol.* (in Russian) **58**, 28—34 (1970).
42. COATES, M. E.: Animal production and rearing. III. Chickens and quail p. 79—86. *In* Coates, M. E. (ed.), *The germfree animal in research*. Academic Press Inc., New York (1968).
43. COATES, M. E.: Nutrition and metabolism, p. 161—179. *In* Coates, M. E. (ed.), *The germfree animal in research*. Academic Press Inc., New York (1968).
44. COATES, M. E. and O'DONOGHUE, P. N.: Milk allergy in infant germfree rabbits. *Nature* (London) **213**, 307—308 (1967).
45. COHEN, J. O., NEWTON, W. L., CHERRY, W. B. and UPDYKE, E. L.: Normally occurring staphylococcal antibodies in germfree mice. *J. Immunol.* **90**, 358—367 (1963).
46. COHENDY, M. and WOLLMAN, E.: Quelques résultats acquis par la méthode des élevages aseptiques. I. Scorbut expérimental. II. Infection cholérique du cobaye aseptique. *C. R. Acad. Sci.* **174**, 1082—1095 (1922).
47. COHN, I., Jr., FLOYD, C. E., DRESDEN, C. F. and BORNSIDE, G. H.: Strangulation obstruction in germfree animals. *Ann. Surg.* **156**, 692—702 (1962).
48. COMBE, E., PENOT, E., CHARLIER, H. and SAQUET, E.: Métabolisme du rat „germfree”. Teneurs des contenus digestifs en certains composés azotés, en sodium et en potassium. Teneurs de quelques tissus en acides nucléiques. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* **5**, 189—206 (1965).
49. COMBE, E. and SACQUET, E.: Influence de l'état axénique sur divers composés azotés contenus dans le caecum de rats albinos recevant des quantités variables de protéines. *C. R. Acad. Sci. Paris* **262**, 685—688 (1966).
50. CONRAD, M. E., WEINTRAUB, L. R. and CROSBY, W. H.: The role of the intestine in iron kinetics. *J. Clin. Invest.* **43**, 963—974 (1964).
51. CRABBÉ, P. A., BAZIN, H., EYSSSEN, H. and HEREMANS, J. F.: The normal microbial flora as a major stimulus for proliferation of plasma cells synthesizing IgA in the gut. The germfree intestinal tract. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **34**, 362—375 (1968).
52. CRABBÉ, P. A., NASH, D. R., BAZIN, H., EYSSSEN, H. and HEREMANS, J. F.: Antibodies of the IgA type in intestinal plasma cells of germfree mice after oral or parenteral immunization with ferritin. *J. Exp. Med.* **130**, 723—744 (1969).
53. CROSBY, W. H.: The control of iron balance by the intestinal mucosa. *Blood.* **22**, 441—449 (1963).
54. CSÁKY, T. Z.: Intestinal water permeability regulation involving the microbial flora, p. 151—159. *In* Coates M. E. (ed.), *The germfree animal in research*. Academic Press Inc. New York (1968).
55. CURRAN, P. F. and SOLOMON, A. K.: Ion and water fluxes in the ileum of rats. *J. Gen. Physiol.* **41**, 143—168 (1957).
56. DAFT, F. S., MCDANIEL, E. G., HERMAN, L. G., ROMINC, M. K. and HEGNER, J. R.: Role of coprophagy in utilization of B vitamins synthesized by intestinal bacteria. *Fed. Proc.* **22**, 129—133 (1963).

57. DAHLQUIST, A., BULL, B. and GUSTAFSSON, B. E.: Rat intestinal 6-bromo-2-naphthyl glycosidase and disaccharidases activities. I. Enzymic properties and distribution in the digestive tract of conventional and germfree animals. *Arch. Biochem. Biophys.* **109**, 150—158 (1965).
58. DANIELSSON, H. and GUSTAFSSON, B. E.: On serum-cholesterol levels and neutral fecal sterols in germfree rats. Bile acids and steroids 59. *Arch. Biochem. Biophys.* **83**, 482—485 (1959).
59. DEL FAVERO, J., E. and FARRELL, R. L.: Experimental histoplasmosis in gnotobiotic dogs. *Amer. J. Vet. Res.* **27**, 60—66 (1966).
60. DENYS, P., Jr., LEYTEN, R. and DE SOMER, P.: The effect of splenectomy on neonatally thymectomized mice. *Life Sci.* **5**, 1679—1689 (1966).
61. DESPLACES, A., ZAGURY, D. and SACQUET, E.: Étude de la fonction thyroïdienne du rat privé de bactéries (germfree). *C. R. Acad. Sci. Paris*, **257**, 756—758 (1963).
62. DIETRICH, M., FLIEDNER, T. M., HEIMPEL, H. and ZELLER, E.: Isolierbett-System zur Infektionsprophylaxe bei verminderter Resistenz. *Deut. Med. Wochenschr.* **94**, 1003—1012 (1969).
63. DOLL, J. P.: Rate of carbon clearance in three strains of germfree mice. *Amer. J. Physiol.* **203**, 291—295 (1962).
64. DOLL, J. P. and FRÄKNER, C. K.: Experimental histomoniasis in gnotobiotic turkeys. I. Infection and histopathology of the bacteria-free host. *J. Parasitol.* **49**, 411—414 (1963).
65. DONALDSON, R. M., Jr.: Normal bacterial populations of the intestine and their relation to intestinal function. *N. Engl. J. Med.* **270**, 938—945, 944—1001, 1050—1056 (1964).
66. DREES, D. T. and WAXLER, G. L.: Enteric colibacillosis in gnotobiotic swine: a fluorescence study. *Amer. J. Vet. Res.* **31**, 1147—1157 (1970).
67. DREES, D. T. and WAXLER, G. L.: Enteric colibacillosis in gnotobiotic swine: an electron microscopic study. *Amer. J. Vet. Res.* **31**, 1159—1171 (1970).
68. DUBOS, R. J. and SCHÄEDLER, R. W.: The effect of diet on the fecal bacterial flora of mice and on their resistance to infection. *J. Exp. Med.* **115**, 1161—1172 (1962).
69. DUBOS, R. J., SCHÄEDLER, R. W. and COSTELLO, R.: Composition, alteration, and effects of the intestinal flora. *Fed. Proc.* **22**, 1322—1329 (1963).
70. DUBOS, R. J., SCHÄEDLER, R. W., COSTELLO, R. and HOET, P.: Indigenous, normal and autochthonous flora of the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* **122**, 67—76 (1965).
71. DUCLAUX, E.: Sur la germination dans un sol riche en matières organiques, mais exempt de microbes. *C. R. Acad. Sci. Paris* **100**, 66—68 (1885).
72. DUCLUZEAU, R., RAIBAUD, P., DICKINSON, A. B., SACQUET, E. and MOCQUOT, G.: Hydrolyse de l'urée *in vitro* et *in vivo*, dans le caecum de rats gnotobiotiques, par différentes souches bactériennes isolées du tube digestif de rats conventionnels. *C. R. Acad. Sci. Paris* **262**, 944—947 (1966).
73. DUPONT, J. R., JERVIS, H. R. and SPRINZ, H.: Auerbach's plexus of the rat cecum in relation to the germfree state. *J. Comp. Neurol.* **125**, 11—18 (1965).
74. EINHEBER, A. and CARTER, D.: The role of the microbial flora in uremia. I. Survival times of germfree, limited-flora, and conventionalized rats after bilateral nephrectomy and fasting. *J. Exp. Med.* **123**, 239—250 (1966).
75. EINHEBER, A. and WREN, R. E.: Saline-irreversible tourniquet shock in germfree, ex-germfree and conventional mice. *J. Trauma* **7**, 25—39 (1967).
76. EKSTEDT, R. D. and NISHIMURA, E. T.: Runt disease induced in neonatal mice by sterile bacterial vaccines. *J. Exp. Med.* **120**, 795—804 (1964).
77. ERIKSSON, H. and GUSTAFSSON, J. A.: Steroids in germfree and conventional rats. *Eur. J. Biochem.* **15**, 132—139 (1970).
78. EVRARD, E., HOET, P. P., EYSSSEN, H., CHARLIER, H. and SACQUET, E.: Faecal lipids in germfree and conventional rats. *Brit. J. Exp. Pathol.* **45**, 409—414 (1964).
79. EVRARD, E., SACQUET, E., RAIBAUD, P., DICKINSON, A., CHARLIER, H., EYSSSEN, H. and HOET, P.: Studies on conventional and gnotobiotic rats: effect of intestinal bacteria on fecal lipids and fecal sterols. *Ernährungsforschung* **10**, 257—263 (1965).
80. EYSSSEN, H.: Metabolism of lipids and sterols in germfree and conventional rats and chicks, p. 329—340. *In* Symposia: IX International Congress for Microbiology, Ivanovski Institute of Virology, Moscow, U.S.S.R. (1966).
81. EYSSSEN, H. and DE SOMER, P.: Effects of *Streptococcus faecalis* and a filterable agent on growth and nutrient absorption in gnotobiotic chicks. *Poultry Sci.* **46**, 323—332 (1967).
82. FAHEY, J. L. and SELL, S.: The immunoglobulins of mice. V. The metabolic (catabolic) properties of five immunoglobulin classes. *J. Exp. Med.* **122**, 41—58 (1965).
83. FITZGERALD, R. J.: Gnotobiotic contribution to oral microbiology. *J. Dent. Res.* **42**, 549—552 (1963).

84. FITZGERALD, R. J., GUSTAFSSON, B. E. and MCDANIEL, E. G.: Effects of coprophagy prevention on intestinal microflora in rats. *J. Nutr.* **84**, 155—160 (1964).
85. FITZGERALD, R. J., JORDAN, H. V. and ORCHARD, H. O.: Dental caries in gnotobiotic rats infected with a variety of *Lactobacillus acidophilus*. *Arch. Oral Biol.* **11**, 473—476 (1966).
86. FITZGERALD, R. J., JORDAN, H. V. and STANLEY, H. R.: Experimental caries and gingival pathologic changes in the gnotobiotic rat. *J. Dent. Res.* **39**, 923—935 (1960).
87. FORMAL, S. B., DAMMIN, G., SPRINZ, H., KUNDEL, D., SCHNEIDER, H., HOROWITZ, R. E. and FORBES, M.: Experimental *Shigella* infections. V. Studies in germfree guinea pigs. *J. Bacteriol.* **82**, 284—287 (1961).
88. FUJIWARA, A., OHIRA, K., CHIBA, K. and KONNO, I.: Facilities for sterile culture of higher plants, p. 387—391. In Miyakawa M. and Luckey, T. D. (ed.), *Advances in germfree research and gnotobiology*. CRC Press, Cleveland. (1968).
89. FULLER, R.: The routine microbiological control of germfree isolators, p. 37—45. In Coates, M. E. (ed.), *The germfree animal in research*. Academic Press Inc., New York (1968).
90. GIBBONS, R. J., BERMAN, K. S., KNOETTNER, P. and KAPSIMALIS, B.: Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with capsule forming streptococci of human origin. *Arch. Oral Biol.* **11**, 549—560 (1966).
91. GIBBONS, R. J. and McDONALD, J. B.: Degradation of collagenous substrates by *Bacteroides melaninogenicus*. *J. Bacteriol.* **81**, 614—621 (1961).
92. GIBBONS, R. J. and SOCRANSKY, S. S.: Enhancement of alveolar bone loss in gnotobiotic mice harbouring human gingival bacteria. *Arch. Oral Biol.* **11**, 847—848 (1966).
93. GIBBONS, R. J., SOCRANSKY, S. S. and KAPSIMALIS, B.: Establishment of human indigenous bacteria in germfree mice. *J. Bacteriol.* **88**, 1316—1323 (1964).
94. GLIMSTEDT, G.: Bakterienfreie Meerschweinchen. Aufzucht, Lebensfähigkeit und Wachstum, nebst Untersuchungen über das lymphatische Gewebe. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl.* **30**, 1—295 (1936).
95. Gnotobiotics. Standards and Guidelines for the Breeding, Care and Management of Laboratory Animals. Subcommittee on Standards for Gnotobiotics, ILAR. International Standard Book No. 0—309—01858—7. National Academy of Sci. Publishing Office, Washington, D. C. (1970).
96. GORDON, H. A.: The germfree animal: its use in the study of „physiologic” effects of the normal microbial flora on the animal host. *Amer. J. Dig. Dis.* **5**, 841—867 (1960).
97. GORDON, H. A.: Demonstration of a bioactive substance in caecal contents of germfree animals. *Nature (London)* **205**, 571—572 (1965).
98. GORDON, H. A.: Germfree animals in research: an extension of the pure culture concept. *Triangle* **7**, 108—121 (1965).
99. GORDON, H. A.: Germfree animals in research on aging, p. 50—51. In *Abstracts: VII International Congress of Gerontology*, Vienna, Austria (1966).
100. GORDON, H. A.: A substance acting on smooth muscle in intestinal contents of germfree animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **147**, 83—106 (1967).
101. GORDON, H. A.: Is the germfree animal normal? p. 127—150. In Coates, M. E. (ed.), *The germfree animal in research*. Academic Press Inc., New York (1968).
102. GORDON, H. A. and BRUCKNER-KARDOSS, E.: Effect of normal microbial flora on intestinal surface area. *Amer. J. Physiol.* **201**, 175—178 (1961).
103. GORDON, H. A. and BRUCKNER-KARDOSS, E.: Effect of normal flora on various tissue elements of the small intestine. *Acta. Anat.* **44**, 210—225 (1961).
104. GORDON, H. A., BRUCKNER-KARDOSS, E., STALEY, T. E., WAGNER, M. and WESTMANN, B. S.: Characteristics of the germfree rat. *Acta Anat.* **64**, 367—389 (1966).
105. GORDON, H. A., BRUCKNER-KARDOSS, E. and WESTMANN, B. S.: Aging in germfree mice: life tables and lesions observed at natural death. *J. Gerontol.* **21**, 380—387 (1966).
106. GORDON, H. A. and KOKAS, E.: A bioactive pigment („alpha pigment”) in cecal contents of germfree animals. *Biochem. Pharmacol.* **17**, 2333—2347 (1968).
107. GORDON, H. A., NAKAMURA, S.: Elevated levels of colloid osmotic pressure in cecal contents of germfree rats. 8th Annu. Meet. Gnotobiot. Oak Ridge, Tenn., Abstr. No. 3, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tenn. (1969).
108. GORDON, H. A., WAGNER, M. and WESTMANN, B. S.: Studies on conventional and germfree chickens treated orally with antibiotics, p. 248—255. In H. Welch (ed.), *Antibiotics annual 1957—1958*. Medical Encyclopedia, Inc., New York (1958).
109. GORDON, H. A. and WESTMANN, B. S.: Responses of the animal host to changes in the bacterial environment: transition of the albino rat from germfree to the conventional state, p. 336—339. In G. Tunevall (ed.), *Recent progress in microbiology*. Almquist and Wiksell, Stockholm (1959).

110. GORDON, H. A. and WESTMANN, B. S.: Morphological studies on the germfree albino rat. *Anat. Rec.* **137**, 65–70 (1960).
111. GORDON, H. A., WESTMANN, B. S. and BRUCKNER-KARDOSS, E.: Effects of microbial flora on cardiac output and other elements of blood circulation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **114**, 301–304 (1963).
112. GRABAR, P., COURCON, J. and WESTMANN, B. S.: Immuno-electrophoretic analysis of the serum of germfree rats. *J. Immunol.* **88**, 679–682 (1962).
113. GRABER, C. D., MOORE, R. W., SUZUKI, M., REDMOND, W. E., O'NEAL, R. M. and LOCKHART, B. M.: Autochthonous intestinal bacterial flora and cholesterol levels in specific pathogen-free swine fed high-lipid and high-sucrose diets. *J. Bacteriol.* **92**, 1290–1297 (1966).
114. GRABER, C. D., O'NEAL, R. M. and RABIN, E. R.: Effect of high fat diets on intestinal microflora and serum cholesterol in rats. *J. Bacteriol.* **89**, 47–51 (1965).
115. GREENSTEIN, J. P., BIRNBAUM, S. M., WINITZ, M. and OTEY, M. C.: Quantitative nutritional studies with water-soluble, chemically defined diets. I. Growth, reproduction and lactation in rats. *Arch. Biochem. Biophys.* **72**, 396–416 (1957).
116. GREISEMER, R. A.: Methods for rearing large germfree mammals, p. 287–289. *In* Symposium: IX International Congress for Microbiology. Ivanovski Institute of Virology, Moscow, U.S.S.R. (1966).
117. GUENET, J. L., SAGUET, E., GUENEAU, G. and MESLIN, J. C.: Action de la microflore total du rat sur l'activité mitotique des cryptes de Lieberkühn. *C. R. Acad. Sci. Paris* **270**, 3087–3090 (1970).
118. GUSTAFSSON, B. E.: Germfree rearing of rats. General technique. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl.* **73**, 1–130 (1948).
119. GUSTAFSSON, B. E.: Lightweight stainless steel systems for rearing germfree animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **78**, 17–28 (1959).
120. GUSTAFSSON, B. E.: Vitamin K deficiency in germfree rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **78**, 166–174 (1959).
121. GUSTAFSSON, B. E., BERGSTRÖM, S., LINDSTEDT, S. and NORMAN, A.: Turnover and nature of fecal bile acids in germfree and infected rats fed cholic acid-24-14C. Bile acids and steroids 41. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **94**, 467–471 (1957).
122. GUSTAFSSON, B. E., DAFT, F. S., MCDANIEL, E. G., SMITH, J. C. and FITZGERALD, R. J.: Effects of vitamin K-active compounds and intestinal microorganisms in vitamin K-deficient germfree rats. *J. Nutr.* **78**, 461–468 (1962).
123. GUSTAFSSON, B. E., KAHLSON, G. and ROSENGREN, E.: Biogenesis of histamine studied by its distribution and urinary excretion in germfree reared and not germfree rats fed a histamine-free diet. *Acta Physiol. Scand.* **41**, 217–228 (1957).
124. GUSTAFSSON, B. E. and LAURELL, C. B.: Gamma globulins in germfree rats. *J. Exp. Med.* **108**, 251–258 (1958).
125. GUSTAFSSON, B. E. and LAURELL, C. B.: Gamma globulin production in germfree rats after bacterial contamination. *J. Exp. Med.* **110**, 673–684 (1959).
126. GUSTAFSSON, B. E. and LAURELL, C. B.: Properdin titers in sera from germfree rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **105**, 598–600 (1960).
127. GUSTAFSSON, B. E., NORMAN, A. and SJÖVALL, J.: Influence of *E. coli* infection on turnover and metabolism of cholic acid in germfree rats. *Arch. Biochem. Biophys.* **91**, 93–100 (1960).
128. GUSTAFSSON, B. E. and SWENANDER LANKE, L.: Bilirubin and urobilins in germfree, ex-germfree and conventional rats. *J. Exp. Med.* **112**, 975–981 (1960).
129. GYLLENBERG, H. and ROINE, P.: The value of colony counts in evaluating the abundance of „*Lactobacillus*” bifidus in infant faeces. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **41**, 144–150 (1957).
130. HAENEL, H.: Aspekte der mikroökologischen Beziehungen des Makroorganismus. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. II. Ref.* **176**, 1–121 (1960).
131. HAENEL, H., MÜLLER-BEUTHOW, W. and SCHEUNERT, A.: Der Einfluss extremer Kostformen auf die faekale Flora des Menschen. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. I. Orig.* **168**, 37–60 (1957).
132. HAENEL, H., MÜLLER-BEUTHOW, W. and SCHEUNERT, A.: Der Einfluss extremer Kostformen auf die faekale Flora des Menschen. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. I. Orig.* **169**, 45–65 (1957).
133. HAMMARSTRÖM, S., LAGERCRANTZ, R., PERLMANN, P. and GUSTAFSSON, B. E.: Immunological studies in ulcerative colitis. II. „Colon” antigen and human blood group A- and H-like antigens in germfree rats. *J. Exp. Med.* **122**, 1075–1086 (1965).

134. HEISE, E. R. and MYRVIK, Q. N.: Levels of lysosomal hydrolases in alveolar and peritoneal macrophages from conventional and germfree rats. *Fed. Proc.* **25**, 439 (1966).
135. HENEGHAN, J. B.: Influence of microbial flora on xylose absorption in rats and mice. *Amer. J. Physiol.* **205**, 417–420 (1963).
136. HENEGHAN, J. B.: Hemorrhagic shock in unanesthetized gnotobiotic rats, p. 166–171. In Miyakawa, M., and Luckey, T. D. (ed.), *Advances in germfree research and gnotobiology*. CRC Press, Cleveland (1968).
137. HENEGHAN, J. B.: *Personal communication*.
138. HENEGHAN, J. B., FLOYD, C. E. and COHN, I., Jr.: Gnotobiotic dogs for surgical research. *J. Surg. Res.* **6**, 24–31 (1966).
139. HENEGHAN, J. B., LONGORIA, S. G. and COHN, I., Jr.: Reproduction in germfree beagles, p. 367–371. In Mirand, E. A., and Back, N. (ed.), *Germfree biology*. Plenum Press, New York (1969).
140. HOBBY, G. L.: BCG in germfree mice. Letter to the Editor. *Amer. Rev. Resp. Dis.* **94**, 801–802 (1966).
141. HOBBY, G. L., LENERT, T. F., MAIER-ENGALLENA, J., WAKELY, C., KEBLISH, M., MANTY, A. and AUERBACH, O.: Experimental tuberculosis and the immunogenic effect of BCG in germfree mice. *Amer. Rev. Resp. Dis.* **93**, 396–410 (1966).
142. HOBBY, G. L., LENERT, T. F., MAIER-ENGALLENA, J., WAKELY-OLIVER, C., MANTY, A., CICIENIA, E., KONNER, S. and CIPKOWSKI, D.: Further observations on the immunogenic effect of BCG in germfree mice. *II. Amer. Rev. Resp. Dis.* **97**, 1095–1103 (1968).
143. HOET, P. P., JOOSSENS, J. V., EVRARD, E., EYSSEN, H. and DE SOMER, P.: Intestinal bacteria and faecal fat, p. 73–83. In Frazer, A. C. (ed.), *Biochemical problems of lipids*. Elsevier Publishing Co., Amsterdam (1963).
144. HOROWITZ, R. E. and BAUER, H.: Gamma-Globulin in the lymphatic tissue of the germfree mouse. *Lab. Invest.* **11**, 693–694 (1962).
145. HOROWITZ, R. E., BAUER, H., PARONETTO, F., ABRAMS, G. D., WATKINS, K. C. and POPPER, H.: The response of the lymphatic tissue to bacterial antigen. *Amer. J. Pathol.* **44**, 747–761 (1964).
146. HORTON, R. E. and HISKEY, J. L.: Irradiated diets for rearing germfree guinea pigs. *Proc. Anim. Care Panel* **11**, 93–106 (1961).
147. HOSKINS, L. C.: Bacterial degradation of gastrointestinal mucins. II. Bacterial origin of fecal ABH(O) blood group antigen-destroying enzymes. *Gastroenterology.* **54**, 218–224 (1968).
148. HUDSON, J. A. and LUCKEY, T. D.: Bacteria induced morphologic changes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **116**, 628–631 (1964).
149. HUEMPFNER, H. R. and DEUSCHLE, K. W.: Experimental tuberculosis in germfree and conventional mice. *Amer. Rev. Resp. Dis.* **93**, 465–467 (1966).
150. HUMMEL, R. P., MAC MILLAN, B. G., MALEY, N. and ALTEMEIER, W. A.: Reverse isolation in treatment of burns. *J. Trauma* **10**, 450–457 (1970).
151. IKARI, N. S.: Bactericidal antibody to *Escherichia coli* in germfree mice. *Nature (London)* **202**, 879–881 (1964).
152. JACOB, S., WEIZEL, H., GORDON, T., KORMAN, H., SCHWEINBURG, F. B., FRANK, H. A. and FINE, J.: Bacterial action in development of irreversibility to transfusion in hemorrhagic shock in dog. *Amer. J. Physiol.* **179**, 523–531 (1954).
153. JENSEN, S. B., MERGENHAGEN, S. E., FITZGERALD, R. J., JORDAN, H. V.: Susceptibility of conventional and germfree mice to lethal effects of endotoxin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **113**, 710–714 (1963).
154. JORDAN, H. V., FITZGERALD, R. J. and STANLEY, H. R.: Plaque formation and periodontal pathology in gnotobiotic rats infected with an oral actinomycete. *Amer. J. Pathol.* **47**, 1157–1167 (1965).
155. KENWORTHY, R.: Effects of *Escherichia coli* on germfree and gnotobiotic pigs. *J. Comp. Pathol.* **80**, 53–63 (1970).
156. KENWORTHY, R. and ALLEN, W. D.: Influence of diet and bacteria on small intestinal morphology, with special reference to early weaning and *Escherichia coli*. *J. Comp. Pathol.* **76**, 291–296 (1966).
157. KIM, Y. B., BRADLEY, S. G. and WATSON, D. W.: Ontogeny of the immune response. I. Development of immunoglobulins in germfree and conventional colostrum-deprived piglets. *J. Immunol.* **97**, 52–63 (1966).
158. KIM, Y. B. and WATSON, D. W.: Role of antibodies in reactions to gram negative bacterial endotoxins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **133**, 727–745 (1966).
159. KIM, Y. B. and WATSON, D. W.: The true primary response in germfree colostrum-deprived

- piglets, p. 259—267. In Mirand, E. A., and Back, N. (ed.), Germfree biology. Plenum Press, New York (1969).
160. KOHLER, E. M.: Studies of *Escherichia coli* in gnotobiotic pigs. IV. Comparison of enteropathogenic and nonenteropathogenic strains. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. **31**, 277—282 (1967).
  161. KOHLER, E. M. and BOHL, E. H.: Studies of *Escherichia coli* in gnotobiotic pigs. I. Experimental reproduction of colibacillosis. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. **30**, 199—203 (1966).
  162. KOVÁTS, T. G.: Endotoxin and susceptibility and endotoxin hypersensitivity. Studia medica Szegedinensia, vol. 4 Medical University Szeged, Hungary. (1967).
  163. KNIGHT, P. L., Jr. and WOSTMANN, B. S.: Influence of *Salmonella typhimurium* on ileum and spleen morphology of germfree rats. Proc. Indiana Acad. Sci. **72**, 78—82 (1964).
  164. KÜSTER, E.: Die Gewinnung, Haltung und Aufzucht keimfreier Tiere und ihre Bedeutung für die Erforschung natürlicher Lebensvorgänge. Arb. Kaiserlich. Gesundh.-amte **48**, 1—79 (1915).
  165. LAGERCRANTZ, R., HAMMARSTRÖM, S., PERLMANN, P. and GUSTAFSSON, B. E.: Immunological studies in ulcerative colitis. III. Incidence or antibodies to colon-antigen in ulcerative colitis and other gastro-intestinal diseases. Clin. Exp. Immunol. **1**, 263—276 (1966).
  166. LANDY, J. J., GROWDON, J. H. and SANDBERG, R. L.: Use of large, germfree animals in medical research. J. Amer. Med. Ass. **178**, 1084—1087 (1961).
  167. LANDY, M., WHITBY, J. L., MICHAEL, J. G., WOODS, M. W. and NEWTON, W. L.: Effect of bacterial endotoxin in germfree mice. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **109**, 352—356 (1962).
  168. LARNER, J. and GILLESPIE, R. E.: Gastrointestinal digestion of starch. J. Biol. Chem. **225**, 279—285 (1957).
  169. LEPKOVSKY, S., FURUTA, F., OZONE, K., KOIKE, T. and WAGNER, M.: The proteases, amylase and lipase of the pancreas and intestinal contents of germfree and conventional rats. Brit. J. Nutr. **20**, 257—261 (1966).
  170. LESHER, S., WALBURG, H. E. and SACHER, G. A.: Generation cycle in the duodenal crypt cells of germfree and conventional mice. Nature (London) **202**, 884—886 (1964).
  171. LEVIN, M.: Les microbes dans les régions arctiques. Ann. Inst. Pasteur **13**, 558—567 (1899).
  172. LEVENSON, S. M., CROWLEY, L. V., HOROWITZ, R. E. and MALM, O. J.: The metabolism of carbon-labeled urea in the germfree rat. J. Biol. Chem. **234**, 2061—2062 (1959).
  173. LEVENSON, S. M. and TENNANT, B.: Contributions of intestinal microflora to the nutrition of the host animal. Some metabolic and nutritional studies with germfree animals Fed. Proc. **22**, 109—119 (1963).
  174. LINDSTEDT, G., LINDSTEDT, S. and GUSTAFSSON, B. E.: Mucus in intestinal contents of germfree rats. J. Exp. Med. **121**, 201—213 (1965).
  175. LOESCHE, W. J.: Accumulation of endogenous protein in the cecum of the germfree rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **129**, 380—384 (1968).
  176. LOESCHE, W. J.: Protein and carbohydrate composition of cecal contents of gnotobiotic rats and mice. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **128**, 195—199 (1968).
  177. LOESCHKE, K. and GORDON, H. A.: Water movement across the cecal wall of the germfree rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **133**, 1217—1222 (1970).
  178. LUCKEY, T. D.: Germfree life and gnotobiology. Academic Press Inc., New York (1963).
  179. LUCKEY, T. D.: Effects of microbes on germfree animals. Advan. Appl. Microbiol. **7**, 169—223 (1965).
  180. LUCKEY, T. D., WAGNER, M., GORDON, H. A. and REYNIERS, J. A.: Rearing germfree turkeys, p. 176—182. In Lobund reports, No. 3. Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, Ind. (1960).
  181. LUTSKY, I. I. and ORGANICK, A. B.: Pneumonia due to mycoplasma in gnotobiotic mice. I. Pathogenicity of *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma salivarium* and *Mycoplasma pulmonis* for the lungs of conventional and gnotobiotic mice. J. Bacteriol. **92**, 1154—1163 (1966).
  182. MAGYARY-KOSSA, J. and GORDON, H. A.: Absorption spectra of „alpha pigment” isolated from cecal contents of germfree animals. Biochem. Pharmacol. **17**, 2361—2364 (1968).
  183. MAKULU, D. R. and WAGNER, M.: Lysozyme activity in the serum, saliva and tears of germfree and conventional rats and mice. Proc. Indiana Acad. Sci. **76**, 183—190 (1967).
  184. MARGARD, W. L. and PETERS, A. C.: A study of gnotobiotic mice monocontaminated with *Salmonella typhimurium*. Lab. Anim. Care **14**, 200—206 (1964).

185. MARKLEY, K., SMALLMAN, E. and EVANS, G.: Mortality due to endotoxin in germfree and conventional mice after tourniquet trauma. *Amer. J. Physiol.* **212**, 541–548 (1967).
186. MARKLEY, K., SMALLMAN, E., EVANS, G. and MCDANIEL, E.: Mortality of germfree and conventional mice after thermal trauma. *Amer. J. Physiol.* **209**, 365–370 (1965).
187. MATSCHINER, J. T. and DOISY, E. A.: Role of vitamin A in induction of vitamin K deficiency in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **109**, 139–142 (1962).
188. MATSUZAWA, T. and WILSON, R.: Oxygen changes in tissues of germfree and conventional mice after inoculation of bacterial endotoxin. *Tohoku J. Exp. Med.* **85**, 361–364 (1965).
189. MAZUR, A. and SHORR, E.: Hepatorenal factors in circulatory homeostasis. IX. The identification of the hepatic vasodepressor substance, VDM, with ferritin. *J. Biol. Chem.* **176**, 771–787 (1948).
190. METCHNIKOFF, E.: Sur la flore du corps humain. *Manchester Lit. Phil. Soc.* **45**, 1–38 (1901).
191. METCHNIKOFF, E.: Les microbes intestinaux. *Bull. Inst. Pasteur* **1**, 265–282 (1903).
192. MEYNELL, G. G.: Antibacterial mechanisms of the mouse gut. II. The role of Eh and volatile fatty acids in the normal gut. *Brit. J. Exp. Pathol.* **44**, 209–219 (1963).
193. MICHAEL, J. G., WHITBY, J. L. and LANDY, M.: Studies on natural antibodies to gram-negative bacteria. *J. Exp. Med.* **115**, 131–146 (1962).
194. MILLER, C. P. and BOHNHOFF, M.: A study of experimental *Salmonella* infection in the mouse. *J. Infec. Dis.* **111**, 107–116 (1962).
195. MILLER, J. F. A. P.: Immunological function of the thymus. *Lancet* *ii*, 748–749 (1961).
196. MINIATS, O. P.: *Personal communication*.
197. MIYAKAWA, M.: The lymphatic system of germfree guinea pigs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **78**, 221–236 (1959).
198. MIYAKAWA, M.: The Miyakawa remote-control germfree rearing unit. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **78**, 37–46 (1959).
199. MIYAKAWA, M.: Report on germfree research at the Department of Pathology, University of Nagoya, Japan, and some observations on wound healing, transplantation and foreign body inflammation in the germfree guinea pig, p. 299–313. *In* Tunevall, G. (ed.), *Recent progress in microbiology*. Almquist and Wiksell, Stockholm (1959).
200. MIYAKAWA, M.: Germfree animal (in Japanese). I-Shi-Yaku-Shuppan Co., Tokyo (1963).
201. MIYAKAWA, M.: Studies of rearing germfree rats, p. 48–67. *In* Miyakawa, M. and Luckey, T. D. (ed.), *Advances in germfree research and gnotobiology*. CRC Press, Cleveland (1968).
202. MIYAKAWA, M., IJIMA, S., KOBAYASHI, R. and TAJIMA, M.: Observation on the lymphoid tissue of the germfree guinea pig. *Acta Pathol. Jap.* **7**, 183–210 (1957).
203. MIYAKAWA, M. and KISHIMOTO, H.: Infection of bacteria-free animals with tubercle bacilli. *Kekkaku* (in Japanese). **37**, 332–337 (1962).
204. MOORE, W. E. C., CATO, E. P. and HOLDEMAN, L. V.: Anaerobic bacteria of the gastrointestinal flora and their occurrence in clinical infections. *J. Infec. Dis.* **119**, 641–649 (1969).
205. MCINTIRE, K. R., SELL, S. and MILLER, J. F. A. P.: Pathogenesis of the postneonatal thymectomy wasting syndrome. *Nature* (London) **204**, 151–155 (1964).
206. McNULTY, W. P., Jr. and LINARES, R.: Hemorrhagic shock of germfree rats. *Amer. J. Physiol.* **198**, 141–144 (1960).
207. NASH, D. R., CRABBÉ, P. A., BAZIN, H., EYSSEN, H. and HEREMANS, J. F.: Specific and nonspecific immunoglobulin synthesis in germfree mice immunized with ferritin by different routes. *Experientia* **25**, 1094–1096 (1969).
208. NELSON, R. C.: Master's Thesis. University of Notre Dame, Notre Dame, Ind. (1941).
209. NENCKI, M.: Bemerkung zu einer Bemerkung Pasteur's. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **20**, 385–388 (1886).
210. NEWTON, W. L., PENNINGTON, R. M. and LIEBERMAN, J. E.: Comparative hemolytic complement activities of germfree and conventional guinea pig serum. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **104**, 486–488 (1960).
211. NORDIN, A. A.: The occurrence of plaque forming cells in normal and immunized conventional and germfree mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **129**, 57–62 (1968).
212. NUTTAL, G. H. F. and THIERFELDER, H.: Thierisches Leben ohne Bakterien im Verdauungskanal. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **21**, 109–121 (1895–1896).
213. NUTTAL, G. H. F. and THIERFELDER, H.: Thierisches Leben ohne Bakterien im Verdauungskanal. II. *Mitt. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **22**, 62–73 (1896–1897).
214. OLSON, G. B. and WOSTMANN, B. S.: Electrophoretic and immunoelectrophoretic studies

- of the serum of germfree and conventional guinea pigs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **116**, 914—918 (1964).
215. OLSON, G. B. and WESTMANN, B. S.: Lymphocytopoiesis, plasmacytopoiesis and cellular proliferation in nonantigenically stimulated germfree mice. J. Immunol. **97**, 267—274 (1966).
216. OLSON, G. B. and WESTMANN, B. S.: Cellular and humoral immune response of germfree mice stimulated with 7S HGG or *Salmonella typhimurium*. J. Immunol. **97**, 275—286 (1966).
217. OLSON, L. D. and BURNSTEIN, T.: Experimental allergic encephalomyelitis in the germfree rat. Fed. Proc. **24**, 370 (1965).
218. ORGANICK, A. B., SIEGESMUND, K. A. and LUTSKY, I. I.: Pneumonia due to mycoplasma in gnotobiotic mice. II. Localization of *Mycoplasma pulmonis* in the lungs of infected gnotobiotic mice by electron microscopy. J. Bacteriol. **92**, 1164—1176 (1966).
219. ORLAND, F. J.: Germfree animals in the specific etiology of dental caries, p. 29. In Symposium on recent advances in germfree animal experimentation. Amer. Inst. Biol. Sci. Annu. Meet., Amherst, Mass. (1963).
220. ORLAND, F. J., BLAYNEY, J. R., HARRISON, R. W., REYNIERS, J. A., TREXLER, P. C., WAGNER, M., GORDON, H. A. and LUCKEY, T. D.: Use of the germfree animal technic in the study of experimental dental caries. J. Dent. Res. **33**, 147—174 (1954).
221. ORLAND, F. J., BLAYNEY, J. R., HARRISON, R. W., REYNIERS, J. A., TREXLER, P. C., ERVIN, R. F., GORDON, H. A. and WAGNER, M.: Experimental caries in germfree rats inoculated with enterococci. J. Amer. Dent. Ass. **50**, 259—272 (1955).
222. PARKER, J. C., TENNANT, R. W., WARD, T. G. and ROWE, W. P.: Virus studies with germfree mice. I. Preparation of serologic diagnostic reagents and the survey of germfree and monocontaminated mice for indigenous murine virus. J. Nat. Cancer Inst. **34**, 371—380 (1965).
223. PASTEUR, L.: Observation relative à la Note précédente de M. Duclaux. C. R. Acad. Sci. Paris **100**, 68 (1885).
224. PERKINS, E. H., NETTESHEIM, P., MORITA, T. and WALBURG, H. E., Jr.: The engulfing potential of peritoneal phagocytes of conventional and germfree mice, p. 175—187. In Di Luzio, N. R., and Paoletti, R. (ed.), The reticuloendothelial system and atherosclerosis. Plenum Press, New York. (1967).
225. PERLMANN, P., HAMMARSTRÖM, S., LAGERCRANTZ, R. and GUSTAFSSON, B. E.: Antigen from colon of germfree rats and antibodies in human ulcerative colitis. Ann. N. Y. Acad. Sci. **124**, 377—394 (1965).
226. PESTI, L.: Qualitative and quantitative examination of the intestinal bacterium flora of healthy pigs. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt. I. Orig. **189**, 282—293 (1963).
227. PESTI, L. and GORDON, H. A.: Effect of isolator-type environment on the intestinal microflora of young and old, exgermfree and conventional mice. Gerontologist **7**, 21 (1967).
228. PESTI, L., KOKAS, E. and GORDON, H. A.: Effects of *Clostridium difficile*, *Lactobacillus casei*, *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus* sp. as mono- and dicontaminants on the cecum of germfree mice, p. 179—180. In Mirand, E. A. and Back N. (ed.), Germfree biology. Plenum Press, New York (1969).
229. PHILLIPS, A. W. and BALISH, E.: Growth and invasiveness of *Candida albicans* in the germfree and conventional mouse after oral challenge. Appl. Microbiol. **14**, 737—741 (1966).
230. PHILLIPS, A. W. and SMITH, J. E.: Germfree animal techniques and their applications. Advan. Appl. Microbiol. **1**, 141—174 (1959).
231. PHILLIPS, B. P.: Studies on the ameba-bacteria relationship in amebiasis. III. Induced amebic lesions in the germfree guinea pig. Amer. J. Trop. Med. Hyg. **13**, 391—395 (1964).
232. PHILLIPS, B. P. and GORSTEIN, F.: Effects of different species of bacteria on the pathology of enteric amebiasis in monocontaminated guinea pigs. Amer. J. Trop. Med. Hyg. **15**, 863—868 (1966).
233. PHILLIPS, B. P. and WOLFE, P. A.: The use of germfree guinea pigs in studies on the microbial interrelationships in amebiasis. Ann. N. Y. Acad. Sci. **78**, 308—314 (1959).
234. PHILLIPS, B. P., WOLFE, P. A. and BARTCIS, I. L.: Studies on the ameba bacteria relationship in amebiasis. II. Some concepts on the etiology of the disease. Amer. J. Trop. Med. Hyg. **7**, 392—399 (1958).
235. PHILLIPS, B. P., WOLFE, P. A. and GORDON, H. A.: Studies on rearing the guinea pig germfree. Ann. N. Y. Acad. Sci. **78**, 183—207 (1959).



236. PHILLIPS, B. P., WOLFE, P. A., REES, C. W., GORDON, H. A., WRIGHT, W. H. and REYNERS, J. A.: Studies on the ameba-bacteria relationship in amebiasis. Comparative results of the intracecal inoculation of germfree, monocontaminated and conventional guinea pigs with *Entamoeba histolytica*. Amer. J. Trop. Med. Hyg. **4**, 675—692 (1955).
237. PLATT, D., BICANOVSKY, J. E., DALBOW, M. H. and THONARD, J. C.: Antigenicity of a carboxymethylcellulose bovine serum albumin glycoprotein in conventional and germfree mice. Nature (London) **209**, 214—215 (1966).
238. PLEASANTS, J. R.: Ph. D. Thesis, University of Notre Dame, Notre Dame, Ind (1966).
239. PLEASANTS, J. R.: Characteristics of the germfree animal, p. 113—125. In Coates, M. E. (ed.), The germfree animal in research. Academic Press Inc., New York (1968).
240. PLEASANTS, J. R., REDDY, B. S. and WOSTMANN, B. S.: Rearing of germfree rats and mice on chemically defined liquid diets, p. 107—108. In Miyakawa, M. and Luckey T. D. (ed.), Advances in germfree research and gnotobiology. CRC Press, Cleveland (1968).
241. PLEASANTS, J. R., REDDY, B. S. and WOSTMANN, B. S.: Sudden death in germfree mice reared through successive generations on chemically defined liquid diet, p. 307—315. In Mirand, E. A. and Back, N. (ed.), Germfree biology. Plenum Press, New York (1969).
242. PLEASANTS, J. R., REDDY, B. S., ZIMMERMAN, D. R., BRUCKNER-KARDOSS, E. and WOSTMANN, B. S.: Growth, reproduction and morphology of naturally born, normally suckled germfree guinea pigs. Z. Vers. **9**, 195—204 (1967).
243. PODOPRIGORA, G. I.: General aspects of gnotobiology (in Russian). Nature (Moscow) **113**, 21—25 (1966).
244. POLLARD, M.: Germfree animals and biological research. Science **145**, 247—251 (1964).
245. POLLARD, M.: Response of the germfree (GF) reticuloendothelial system (RES) to chemical carcinogenesis. Fed. Proc. **23**, 393 (1964).
246. POLLARD, M.: The use of germfree animals in virus research. Progr. Med. Virol. **7**, 362—376 (1965).
247. POLLARD, M.: Viral status of „germfree” mice, p. 167—172. In Viruses of laboratory rodents. NCI Monogr. No. 20. National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1966).
248. POLLARD, M. and KAJIMA, M.: Leukemia in germfree rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **121**, 585—589 (1966).
249. POLLARD, M. and KAJIMA, M.: Lesions in aged germfree Wistar rats. Amer. J. Pathol. **61**, 25—31 (1970).
250. POLLARD, M. and MATSUZAWA, T.: Induction of leukemia in germfree mice by x-rays. Amer. J. Pathol. **44**, 17a (1964).
251. RAIBAUD, P., DICKINSON, A. B., SACQUET, E., CHARLIER, H. and MOCQUOT, G.: La microflore du tube digestif du rat. I. Techniques d'étude et milieux de culture proposés. Ann. Inst. Pasteur. **110**, 568—590 (1966).
252. RAIBAUD, P., DICKINSON, A. B., SACQUET, E., CHARLIER, H. and MOCQUOT, G.: La microflore du tube digestif du rat. II. Dénombrement de différents genres microbiens dans l'estomac et l'intestin de rats conventionnels. Variations quantitatives individuelles et en fonction de l'âge. Ann. Inst. Pasteur. **110**, 861—876 (1966).
253. REBACK, J. F.: Master's Thesis. University of Notre Dame, Notre Dame, Ind. (1942).
254. REDDY, B. S., PLEASANTS, J. R. and WOSTMANN, B. S.: Pancreatic enzymes in germfree and conventional rats fed chemically defined, water-soluble diet free from natural substrates. J. Nutr. **97**, 327—334 (1969).
255. REDDY, B. S., PLEASANTS, J. R., ZIMMERMAN, D. R. and WOSTMANN, B. S.: Iron and copper utilization in rabbits as affected by diet and germfree status. J. Nutr. **87**, 189—196 (1965).
256. REDDY, B. S. and WOSTMANN, B. S.: Intestinal disaccharidase activities in the growing germfree and conventional rats. Arch. Biochem. Biophys. **113**, 609—616 (1966).
257. REDDY, B. S. and WOSTMANN, B. S.: Intestinal disaccharidases in germfree rats and effect of whole-body irradiation and *Salmonella typhimurium* on these enzymes, p. 108—109. In Miyakawa, M. and Luckey, T. D. (ed.), Advances in germfree research and gnotobiology. CRC Press, Cleveland (1968).
258. REDDY, B. S., WOSTMANN, B. S. and PLEASANTS, J. R.: Iron, copper and manganese in germfree and conventional rats. J. Nutr. **86**, 159—168 (1965).
259. REDDY, B. S., WOSTMANN, B. S. and PLEASANTS, J. R.: Protein metabolism in germfree rats fed chemically defined, water-soluble diet and semisynthetic diet, p. 301—305. In Mirand, E. A. and Back, N. (ed.), Germfree biology. Plenum Press, New York (1969).

260. REED, N. D. and UOTILA, J. W.: Wasting disease induced with cortisol acetate: studies in germfree mice. *Science* **150**, 356–357 (1965).
261. REYNIERS, J. A.: Introduction to the general problem of isolation and elimination of contamination, p. 95–113. *In* Reyniers, J. A. (ed.), *Micrurgical and germfree techniques*. Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Ill. (1943).
262. REYNIERS, J. A.: Germfree life methodology (gnotobiotics) and experimental nutrition, p. 458–466. *In* Proc. III Int. Congr. Biochem. Brussels. Academic Press Inc., New York (1956).
263. REYNIERS, J. A.: The pure-culture concept and gnotobiotics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **78**, 3–16 (1959).
264. REYNIERS, J. A.: Design and operation of apparatus for rearing germfree animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **78**, 47–79 (1959).
265. REYNIERS, J. A. and SASKSTEDER, M. R.: Raising Japanese quail under germfree and conventional conditions and their use in cancer research. *J. Nat. Cancer Inst.* **24**, 1405–1421 (1960).
266. REYNIERS, J. A. and TREXLER, P. C.: The germfree technique and its application to rearing animals free from contamination, p. 114–143. *In* Reyniers, J. A. (ed.), *Micrurgical and germfree techniques*. Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Ill. (1943).
267. REYNIERS, J. A., TREXLER, P. C. and ERVIN, R. F.: Rearing germfree albino rats, p. 2–84. *In* Reyniers, J. A. (ed.), *Lobund reports No. 1*. University of Notre Dame Press, Notre Dame, Ind. (1946).
268. REYNIERS, J. A., TREXLER, P. C., ERVIN, R. F., WAGNER, M., LUCKEY, T. D. and GORDON, H. A.: A complete life-cycle in the germfree Bantam chicken. *Nature (London)* **163**, 67–68 (1949).
269. REYNIERS, J. A., TREXLER, P. C., ERVIN, R. F., WAGNER, M., LUCKEY, T. D. and GORDON, H. A.: The need for a unified terminology in germfree life studies, p. 151–162. *In* Reyniers, J. A. (ed.), *Lobund reports No. 2*. University of Notre Dame Press, Notre Dame, Ind. (1949).
270. REYNIERS, J. A., WAGNER, M., LUCKEY, T. D. and GORDON, H. A.: Survey of germfree animals: the white Wyandotte Bantam and white Leghorn chicken, p. 7–159. *In* Reyniers, J. A. (ed.), *Lobund reports No. 3*. University of Notre Dame Press, Notre Dame, Indiana (1960).
271. ROHOVSKY, M. W., GRIESEMER, R. A. and WOLFE, L. G.: The germfree cat. *Lab. Anim. Care* **16**, 52–59 (1966).
272. ROSEBURY, T.: *Microorganisms indigenous to man*. McGraw-Hill, New York (1962).
273. ROSEN, S.: Gnotobiotic animals in dental caries research, p. 19. *In* Abstracts. Symposium on gnotobiotic research. The University of Wisconsin, Madison, Wis. (1967).
274. ROVIN, S., COSTICH, E. R., FLEMING, J. E. and GORDON, H. A.: Healing of tongue wounds in germfree and conventional mice. *Arch. Pathol.* **79**, 641–643 (1965).
275. ROVIN, S., COSTICH, E. R., FLEMING, J. E. and GORDON, H. A.: Healing in germfree and conventional mice after tooth extraction. *J. Oral Surg.* **24**, 239–246 (1966).
276. ROVIN, S., COSTICH, E. R. and GORDON, H. A.: The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. *J. Periodont. Res.* **1**, 193–204 (1966).
277. ROVIN, S. and GORDON, H. A.: The influence of aging on wound healing in germfree and conventional mice. *Gerontologia* **14**, 87–96 (1968).
278. ROVIN, S., SHTEYER, A., HOWELL, R. M. and GORDON, H. A.: Caries due to food retention in nonsusceptible rats fed a noncariogenic diet. *J. Dent. Res.* **50**, 105–108 (1971).
279. SACQUET, E. and CHARLIER, H.: Sensibilité de divers races de souris à l'action létale de l'endotoxine de *Salmonella typhosa*. Influence de la flora microbienne associée. *Ann. Institut Pasteur* **108**, 353–363 (1965).
280. SACQUET, E., CHARLIER, H., RAIBAUD, P., DICKINSON, A. B., EVRARD, E. and EYSSEN, H.: Étiologie bactérienne de la stéatorrhée observée chez le Rat porteur d'un cul-de-sac intestinal. *C. R. Acad. Sci. Paris* **262**, 786–789 (1966).
281. SALOMON, J. C.: Carcinogenesis in axenic animals, p. 227–234. *In* Coates, M. E. (ed.), *The germfree animal in research*. Academic Press Inc., New York (1968).
282. SASAKI, S., ONISHI, N., NISHIKAWA, T., SUZUKI, R., MAEDA, R., TAKAHASHI, T., USUDA, M., NOMURA, T. and SAITO, M.: Monoassociation with bacteria in the intestines of germfree mice. *Keio J. Med.* **19**, 87–101 (1970).
283. SASAKI, S., ONISHI, N., SUZUKI, R., ADACHI, K., MIYASHITA, M., SHIMAMURA, T., TAZUME, S., MAEDA, R. and TAKAHASHI, T.: The relation between the persistence of *El Tor* vibrio in the intestines of germfree mice and so-called coproantibody. *J. Infec. Dis. (Suppl)* **121**, 124–131 (1970).

284. SAVAGE, D. C. and DUBOS, R. J.: Localization of indigenous yeast in the murine stomach. *J. Bacteriol.* **94**, 1811–1816 (1967).
285. SAVAGE, D. C., DUBOS, R. J. and SCHAEGLER, R. W.: The gastrointestinal epithelium and its autochthonous bacterial flora. *J. Exp. Med.* **127**, 67–75 (1968).
286. SCHAEGLER, R. W. and DUBOS, R. J.: The susceptibility of mice to bacterial endotoxins. *J. Exp. Med.* **113**, 559–570 (1961).
287. SCHAEGLER, R. W. and DUBOS, R. J.: The fecal flora of various strains of mice. Its bearing on their susceptibility to endotoxins. *J. Exp. Med.* **115**, 1149–1160 (1962).
288. SCHAEGLER, R. W. and DUBOS, R. J.: Relationship of intestinal flora to resistance, p. 390–396. *In* Landy, M., and Braun, W. (ed.), *Bacterial endotoxins*. Institute of Microbiology, Rutgers State University, New Brunswick, N. J. (1964).
289. SCHAEGLER, R. W., DUBOS, R. J. and COSTELLO, R.: Association of germfree mice with bacteria isolated from normal mice. *J. Exp. Med.* **122**, 77–82 (1965).
290. SCHOTTELIUS, M.: Die Bedeutung der Darmbakterien für die Ernährung. II. *Arch. Hyg.* **42**, 48–70 (1902).
291. SCHWARTZ, B. F.: Pulmonary clearance and surface active agents in the germfree and conventional rat lung, p. 19–20. *Abstr. 9th Annu. Meet. Ass. Gnotobiot.* University of Notre Dame Press, Notre Dame, Ind (1970).
292. SCHWEINBURG, F. B., FRANK, H. A. and FINE, J.: Bacterial factor in experimental hemorrhagic shock; evidence for development of a bacterial factor which accounts for irreversibility to transfusion and for the loss of the normal capacity to destroy bacteria. *Amer. J. Physiol.* **179**, 532–540 (1954).
293. SELL, S.: Gamma-Globulin metabolism in germfree guinea pigs. *J. Immunol.* **92**, 559–564 (1964).
294. SELL, S.: Immunoglobulins of the germfree guinea pig. *J. Immunol.* **93**, 122–131 (1964).
295. SELL, S. and FAHEY, J. L.: Relationship between gamma-globulin metabolism and low serum gamma-globulin in germfree mice. *J. Immunol.* **93**, 81–87 (1964).
296. SHKLAIR, I. L. and ROSEN, S.: Cariogenic potential of *Streptococcus* no. 167 in germfree rats. *J. Dent Res.* **48**, 1313 (1969).
297. SIEBURTH, J. M.: Antibiotic properties of acrylic acid, a factor in the gastrointestinal antibiosis of polar marine animals. *J. Bacteriol.* **82**, 72–79 (1961).
298. SKELLY, B. J., TREXLER, P. C. and TANAMI, J.: Effect of a *Clostridium* species upon cecal size of gnotobiotic mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **110**, 455–458 (1962).
299. SMITH, C. K.: Ph. D. Thesis. University of Notre Dame. Notre Dame, Ind. (1966).
300. SMITH, H. W. and CRABB, W. E.: The faecal bacterial flora of animals and man: its development in the young. *J. Pathol. Bacteriol.* **82**, 53–66 (1961).
301. SMITH, R. W.: Observation on the flora of the alimentary tract of animals and factors affecting its composition. *J. Pathol. Bacteriol.* **89**, 95–102 (1965).
302. SPRINZ, H., KUNDEL, D. W., DAMMIN, G. J., HOROWITZ, R. E., SCHNEIDER, H. and FORMAL, S. B.: The response of the germfree guinea pig to oral bacterial challenge with *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*. *Amer. J. Pathol.* **39**, 681–695 (1961).
303. STALEY, T. E. Quoted by GORDON, H. A.: Is the germfree animal normal? p. 131–132. *In* Coates, M. E. (ed.), *The germfree animal in research*. Academic Press Inc., New York (1968).
304. STALEY, T. E., JONES, E. W. and CORLEY, L. D.: Intestinal monocontamination in the neonatal pig: microbiological and microscopic studies, p. 65–73. *In* Mirand, E. A. and Back, N. (ed.), *Germfree biology*. Plenum Press, New York (1969).
305. STANDEN, A.: What will scientists think of next? p. 41–44. *In* Ervin, R. F. (ed.), *Science and society: a symposium*. University of Notre Dame Press, Notre Dame, Ind. (1952).
306. ŠTERZL, J., KOSTKA, T. and LANC, A.: Development of bactericidal properties against gram-negative organisms in the serum of young animals. *Folia Microbiol.* **7**, 162–174 (1962).
307. ŠTERZL, J., MANDEL, L., MILER, J. and RIHA, I.: Development of immune reactions in the absence or presence of antigenic stimulus, p. 351–370. *In* Šterzl, J. (ed.), *Molecular and cellular basis of antibody formation*. Academic Press Inc., New York (1965).
308. STOLLERMAN, G. H., EKSTEDT, R. D. and COHEN, I. R.: Natural resistance of germfree mice and colostrum-deprived piglets to group A streptococci. *J. Immunol.* **95**, 131–140 (1965).
309. STRANDBERG, K., SEDVAL, G., MIDTVEDT, T. and GUSTAFSSON, B. E.: Effect of some biologically active amines on the cecum wall of germfree rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **121**, 699–702 (1966).
310. SUTER, E. and KIRSANOW, E. M.: Fate of attenuated tubercle bacilli (BCG) in germfree and conventional mice. *Nature (London)* **195**, 397–398 (1962).

311. TANAMI, J.: Studies on germfree animals. (in Japanese) J. Chiba Med. Soc. **35**, 1–24 (1959).
312. TEAH, B. A.: Bibliography of germfree research, 1885–1963. Supplements 1964, 1965, 1966, 1967, 1968, 1969. Univ. of Notre Dame Press, Notre Dame, Ind. (1964).
313. THOMAS, M. A., HENECHAN, J. B., MATHIEU, F. I., STIRLING, C. T., DIVICENTI, WEILBAECHER, D. A., BORNSIDE, G. H. and COHN, I., Jr.: Strangulation obstruction in germfree dogs. *Surgery* **58**, 37–46 (1965).
314. THONARD, J. C., DALBOW, M. H. and CROSBY, R. G.: Immune response in germfree mice after intragingival antigenic stimulation, p. 233–237. In Miyakawa, M. and Luckey, T. D. (ed.), *Advances in germfree research and gnotobiology*. CRC Press, Cleveland (1968).
315. THONARD, J. C., WELTY, A. S., DALBOW, M. H. and PLATT, D.: Observations on the maintenance of periodontal tissue integrity under persistent insult with exogenous collagenase enzymes, p. 141. In *Abstr. 46th Gen. Meet. Int. Ass. Dent. Res.*, San Francisco, Calif. (1968).
316. THORBECKE, G. J.: Some histological and functional aspects of lymphoid tissue in germfree animals. I. Morphological studies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **78**, 237–246 (1959).
317. THORBECKE, G. J. and BENACERRAF, B.: Some histological and functional aspects of lymphoid tissue in germfree animals. II. Studies on phagocytosis *in vivo* *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **78**, 247–253 (1959).
318. THORBECKE, G. J., GORDON, H. A., WOSTMANN, B. S., WAGNER, M. and REYNIERS, J. A.: Lymphoid tissue and serum gamma globulin in young germfree chickens. *J. Infect. Dis.* **101**, 237–251 (1957).
319. TIPTON, J. B. and DINGMAN, R. O.: Some aspects of wound healing in the germfree animal. *Plastic Reconstr. Surg.* **38**, 499–506 (1966).
320. TLASKALOVÁ, H., KAMARÝTOVÁ, V., MANDEL, L., PROKEŠOVÁ, L., KRUML, J., LANČ, A. and MILER, I.: The immune response of germfree piglets after peroral monocontamination with living *Escherichia coli* strain 086. *Folia Biol. (Praha)* **16**, 177–187 (1970).
321. TREXLER, P. C.: The use of plastics in the design of isolation systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **78**, 29–36 (1959).
322. TREXLER, P. C.: Germfree isolators. *Sci. Amer.* **211**, 78–88 (1964).
323. TREXLER, P. C.: Isolator technology for microbial contamination control. *Z. Vers.* **10**, 121–130 (1968).
324. VISY, M., WISEMAN, R. F. and GORDON, H. A.: Effects of the microbial flora on impaired and normal kidney function. *J. Lab. Clin. Med.* **76**, 1045–1047 (1970).
325. WAALJ, D. van der: The persistent absence of Enterobacteriaceae from the intestinal flora of mice following antibiotic treatment. *J. Infect. Dis.* **118**, 32–38 (1968).
326. WAGNER, M.: Germfree research: a basic study in host-contaminant relationship. II. Serologic observations in germfree animals. *Bull. N. Y. Acad. Med.* **31**, 231–242 (1955).
327. WAGNER, M.: Determination of germfree status. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **78**, 89–101 (1959).
328. WAGNER, M.: Serologic aspects of germfree life. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **78**, 261–271 (1959).
329. WAGNER, M.: A study of the effects of specific immunization on experimental dental caries in the gnotobiotic rat. *Diss. Abstr.* **27**, 525b (1966).
330. WAGNER, M.: Specific immunization against *Streptococcus faecalis*-induced dental caries in the gnotobiotic rat, p. 18. In *Symposium on gnotobiotic research*. The University of Wisconsin, Madison, Wis. (1967).
331. WAGNER, M.: Specific immunization against dental caries in the gnotobiotic rat, p. 264. In Miyakawa, M. and Luckey, T. D. (ed.), *Advances in germfree research and gnotobiology*. CRC Press, Cleveland (1968).
332. WAGNER, M. and WOSTMANN, B. S.: Studies on monocontaminated chickens (*Clostridium perfringens* or *Streptococcus faecalis*) fed penicillin, p. 1003–1011. In Welch, H. (ed.), *Antibiotics annual 1958–1959*. Medical Encyclopedia, Inc., New York (1959).
333. WAGNER, M. and WOSTMANN, B. S.: Serum protein fractions and antibody studies in gnotobiotic animals reared germfree or monocontaminated. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **94**, 210–217 (1961).
334. WAKABAYASHI, T., TAKAHASHI, T. and MIYAKAWA, M.: Histochemical and electron microscopic studies on the adrenal cortex of germfree rats, p. 114–128. In Miyakawa, M. and Luckey, T. D. (ed.), *Advances in germfree research and gnotobiology*. CRC Press, Cleveland (1968).
335. WALBURG, H. A. and COSGROVE, G. E.: Ageing in irradiated and unirradiated germfree ICR mice. *Exp. Gerontol.* **2**, 143–158 (1967).

336. WARREN, K. S. and NEWTON, W. L.: Portal and peripheral blood ammonia concentration in germfree and conventional guinea pigs. *Amer. J. Physiol.* **197**, 717–720 (1959).
337. WAXLER, G. L., SCHMIDT, D. A., WHITEHAIR, C. K.: Technique for rearing gnotobiotic pigs. *Amer. J. Vet. Res.* **27**, 300–318 (1966).
338. WHEATER, D. W. F. and HURST, E. W.: The effect of sex on bacterial infections in mice and on chemotherapy on one of them. *J. Pathol. Bacteriol.* **82**, 117–130 (1962).
339. WHITEHAIR, C. K.: Animal production and rearing: large animals, p. 64–78. *In* Coates, M. E. (ed.), *The germfree animal in research*. Academic Press Inc., New York (1968).
340. WILBUR, R. D., CATRON, D. V., QUINN, L. Y., SPEER, V. C. and HAYS, V. W.: Intestinal flora of the pig as influenced by diet and age. *J. Nutr.* **71**, 168–175 (1960).
341. WILKINS, T. D. and GORDON, H. A.: Differences in cecal enlargement of germfree rats maintained on various diets. *Fed. Proc.* **29**, 530 (1970).
342. WILKINS, T. D. and LONG, W. R.: Changes in the flora of the cecal mucosa of mice fed a chemically defined diet. *Bacteriol. Proc.*, p. 113 (1971).
343. WILSON, R., BEALMEAR, P. M. and SOBONYA, R.: Growth and regression of the germfree (axenic) thymus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **118**, 97–99 (1965).
344. WILSON, R. and PIACSEK, B.: Dose-response relationships in X-irradiated germfree and conventional mice. *Fed. Proc.* **21**, 423 (1962).
345. WILSON, R., SJODIN, K. and BEALMEAR, P. M.: The absence of wasting in thymectomizedgermfree (axenic) mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **117**, 237–239 (1964).
346. WISEMAN, R. F. and COLE, C. H.: Transient cecal reduction in gnotobiotic animals, p. 162–165. *In* Miyakawa, M. and Luckey, T. D. (ed.), *Advances in germfree research and gnotobiology*. CRC Press, Cleveland (1968).
347. WISEMAN, R. F. and GORDON, H. A.: Reduced levels of a bioactive substance in the caecal content of gnotobiotic rats monoassociated with *Salmonella typhimurium*. *Nature (London)* **205**, 572–573 (1965).
348. WOLFE, L., GRIESEMER, R. and ROHOVSKY, M.: Germfree cynomolgus monkeys. *Lab. Anim. Care* **16**, 364–368 (1966).
349. WOLOCZOW, H., HILDEBRAND, G. J. and LAMANNA, C.: Translocation of microorganisms across the intestinal wall of the rat: effect of microbial size and concentration. *J. Infect. Dis* **116**, 523–528 (1966).
350. WOSTMANN, B. S.: Nutrition of the germfree mammal. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **78**, 175–182 (1959).
351. WOSTMANN, B. S.: Recent studies on the serum proteins of germfree animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **94**, 272–283 (1961).
352. WOSTMANN, B. S.: Defence mechanisms in germfree animals. I. Humoral defence mechanisms, p. 197–209. *In* Coates, M. E. (ed.), *The germfree animal in research*. Academic Press Inc., New York (1968).
353. WOSTMANN, B. S.: Antimicrobial defense mechanisms in the *Salmonella typhimurium* associated ex-germfree rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **134**, 294–299 (1970).
354. WOSTMANN, B. S. and BRUCKNER-KARDOSS, E.: Development of cecal distention in germfree baby rats. *Amer. J. Physiol.* **197**, 1345–1346 (1959).
355. WOSTMANN, B. S. and BRUCKNER-KARDOSS, E.: Oxidation-reduction potentials in cecal contents of germfree and conventional rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **121**, 1111–1114 (1966).
356. WOSTMANN, B. S., BRUCKNER-KARDOSS, E. and KNIGHT, P. L., Jr.: Cecal enlargement, cardiac output and oxygen consumption in germfree rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **128**, 137–141 (1968).
357. WOSTMANN, B. S. and GORDON, H. A.: Electrophoretic studies on the serum protein pattern of the germfree rat and its changes upon exposure to a conventional bacterial flora. *J. Immunol.* **84**, 27–31 (1960).
358. WOSTMANN, B. S. and KELLOGG, T. F.: Purified starch-casein diet for nutritional research with germfree rats. *Lab. Anim. Care* **17**, 589–593 (1967).
359. WOSTMANN, B. S. and KELLOGG, T. F.: Cholesterol metabolism and intestinal microflora, p. 109–110. *In* Miyakawa, M. and Luckey, T. D. (ed.), *Advances in germfree research and gnotobiology*. CRC Press, Cleveland (1968).
360. WOSTMANN, B. S. and KNIGHT, P. L., Jr.: Antagonism between vitamins A and K in the germfree rat. *J. Nutr.* **87**, 155–160 (1965).
361. WOSTMANN, B. S., KNIGHT, P. L. and KAN, D. F.: Thiamine in germfree and conventional animals: effect of the intestinal microflora on thiamine metabolism of the rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **98**, 516–527 (1962).
362. WOSTMANN, B. S., KNIGHT, P. L., Jr., KEELEY, L. L. and KAN, D. F.: Metabolism and

- function of thiamine and naphthoquinones in germfree and conventional rats. *Fed. Proc.* **22**, 120–124 (1963).
363. WOSTMANN, B. S. and OLSON, G. B.: The effect of the successive administration of two antigens to germfree and conventional chickens. *Proc. Ind. Acad. Sci.* **74**, 120–124 (1965).
364. WOSTMANN, B. S., OLSON, G. B. and PLEASANTS, J. R.: Serum proteins of germfree rats fed water soluble diets. *Nature (London)* **206**, 1056–1057 (1965).
365. WOSTMANN, B. S., PLEASANTS, J. R. and BEALMEAR, P.: Diet and immune mechanisms, p. 287–292. *In* Mirand, E. A. and Back, N. (ed.), *Germfree biology*. Plenum Press, New York (1969).
366. WOSTMANN, B. S. and WIECH, N. L.: Total serum and liver cholesterol in germfree and conventional male rats. *Amer. J. Physiol.* **201**, 1027–1029 (1961).
367. YALE, C. E. and ALTEMEIER, W. A.: Intestinal obstruction in germfree rats. *Arch. Surg.* **91**, 241–246 (1965).
368. ZWEIFACH, B. W., GORDON, H. A., WAGNER, M. and REYNIERS, J. A.: Irreversible hemorrhagic shock in germfree rats. *J. Exp. Med.* **107**, 437–450 (1958).