

YURDUMUZ SIĞIR LEPTOSPIROSİSİNE KARŞI ETKİN BİR AŞI HAZIRLANMASI ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

Ali Altan BULU (*) Olcay ERGÜN (**)

GİRİŞ

Spirochetler içinde çok kısa bir geçmişi olan leptospiral enfeksiyonlar, yurdumuzda sanıldığından da yaygın ve tırmanış içinde olduğu görülmektedir. Leptospiraların epidemiyolojisinin oldukça karmaşık ve genel bakteriyolojik metodlarla çalışma olanakları olmadığından araştırmalar kendine özel yöntemlerle, steril ortamlarda titiz çalışmalar gerektirmektedir.

Leptospirosis insan dahil birçok memeli türünü tehdit eden geniş spektrumlu zoonoz bir enfeksiyondur. Yurdumuzda leptospira enfeksiyonları üzerindeki ciddi çalışmalar 1950 yılından sonraya rastlamaktadır (15). Mikroskopik aglutinasyon test (M.A.T.) ve suş izolasyon çalışmaları sayesinde Türkiye'de leptospira enfeksiyonlarının yaygınlığı saptanmıştır. Bu çalışmalara esas olmak üzere 1975-1985 yılları arasında yurdun muhtelif bölgelerinden temin edilen (9259) adet sığır, koyun, at ve insan kan serumu mikroskopik aglutinasyon test ile incelenmiş, bunların 1919'u müsbet bulunmuştur. Müsbet bulunan serumların % 63 L.grippotyphosa ile % 36 ise L.hebdomadis ve % 1 L. pomona ile reaksiyon vermiştir. Ayrıca kültürel çalışmalarımızın neticesi hasta sığırlardan Ankara, Çankırı, Çorum illerinden onüç suş izole edilmiş olup, bu suşların tamamının L.grippotyphosa sero grubundan olduğu ve yurdumuzda yaygın olan tipinde L.grippotyphosa olduğu laboratuvarımızca saptanmıştır. Ayrıca bu suşlar Enstitü Pasteur ve Amsterdam'daki

(*) Hayvan Hastalıkları Araştırma Enstitüsü Leptospira Lab. Şefi
(**) » » » » » » Uzmanı

Kraliyet Tropikal Hastalıklar Enstitüsüne gönderilerek *L.grippotyphosa* sero grubundan olduğu belirlenmiştir. Böylece Türkiye'de leptospirosis yaygınlığı ile ekonomimize yaptığı olumsuz etkileri ortaya konmuştur (4). Çiftlik hayvanlarında meydana gelen leptospira enfeksiyonlarına karşı birçok ülkede çeşitli koruyucu aşılar yapılmıştır. İtalya'da *L.pomona* ve *L.hyo* suşları ile 400×10^{-6} germ/ml. ile yapılan bivalan aşıda % 0,1 formol ve adjuvant olarak % 30 $Al(OH)_3$ ve Bayol F. ve Arlacelında 1/4 oranında kullanıldığı bu son adjuvantların sığırlarda kötü reaksiyonlar husule getirdiği bildirilmektedir (5).

Yeni Zelanda'da *L.hardjo*, *L.pomona* ve *L.copenhageni* suşları ile hazırlanan trivalan aşıda % 0,015 formol, % 10 $Al(OH)_3$ ve 8×10^{-8} germ/ml. kullanmışlar, potency testleri 1/8 sığır dozu ile hamsterlerde ve sığırlarda yapıldığı, sonuçta aşı sığırların leptospira çıkarmadığı bildirilmektedir (8).

Amerika'da *L.icterohaemorrhagiae* ve *L.canicola* suşları ile Stuart's ve sentetik vasatlarda hazırlanan bivalan aşının hamsterlerdeki potency testlerinin ayrı ayrı yapıldığı ve Stuart's vasatında üretilen aşının % 80, sentetik ortamda üretilenin ise % 100 hamsterleri koruduğu gösterilmektedir (13).

Yeni Zelanda *L.pomona* ile hazırlanan aşıda % 10 $Al(OH)_3$ ile % 0,01 w/v konsantrasyonunda merthiolate kullanmışlar. Sığırlar 2 ml. aşı dozu ile aşılamadan 47 hafta sonra yapılan epruvasyona dayandıklarını gözlemişlerdir (17).

Amerika'da araştırmacılar hazırladıkları pentavalan liyofilize aşıda 1.48×10^{-10} germ/ml.'lik bir üreme elde ettiklerini ve % 0,7 $Al(OH)_3$ ile merthiolate kullandıklarını bildirmektedirler (18, 19). Yine Amerika'da araştırmacılar chorio allantoik mayide ürettikleri suşla hazırladıkları aşiyi formol, polivinylpyrrolidone ve dondurup gözerek inaktive ettiklerini, bu son şeklin enfektiviteyi ortadan kaldırdığını fakat immunojeniteyi pek etkilemediğini, kimyasal inaktivasyona tercih edilebileceğini bildirmektedirler (21). Biz aşımızda pathogen suş kullandığımızdan güvenilir inaktivasyon için kimyasal yolu seçtik ve % 0,1 formol kullandık (3; 5, 7, 8, 17).

Bu çalışmadan amacımız yokluğu hissedilen ve yurdumuzda önemli ekonomik kayıplara sebep olan sığır leptospirosisine karşı güvenilir bir aşı hazırlamaktır.

MATERYAL VE METOT

Araştırmamız boyunca semi solid EMJH vasatı ile sıvı vasatlardan modifiye sentetik Johnson vasatını hazırladık. Semi solid EMJH vasatına 150 µg/ml. 5-fluorouracil ilâve ederek bu vasatı suş izolasyonu ve pürifikasyonlarında kontaminasyon inhibitörü olarak kullandık (11, 8).

Aşı kültürü üretmek ve yine suş izolasyonları ile pasajlar için modifiye sentetik Johnson vasatını laboratuvarımıza adapte ettik (12).

Vasat beş litre olarak hazırlandı. Vasatın yapımında bi distile deiyonize su kullanılarak, ilk önce sırasıyla stok solüsyonlar Basal vasat ve Albumin-Fatty-asit supplement aşağıdaki şekilde yapıldı.

Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

	Her 100 ml. su için
Ammonium Chloride	25.0
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	0.4
CaCl ₂ 2 H ₂ O ve MgCl ₂ 6 H ₂ O	1.0 (herbirinden)
FeSO ₄ 7 H ₂ O	0.5
CuSO ₄ 5 H ₂ O	0.3
Glycerol	10.0
Tween 80	10.0
Thiamin B ₁	0.5
Vitamin B ₁₂	0.02
Bazal Vasat : (1 litre için)	Her 100 ml. su için
Na ₂ HPO ₄ veya	1.0 gr.
Na ₂ HPO ₄ 2 H ₂ O	1.2535 gr.
KH ₂ PO ₄	0.3 gr.
NaCl	1.0 gr.
Amonyum Clorid solusyon (stok)	1.0 ml.
Thiamine solusyon (stok)	1.0 ml.
Glyserol (stok)	1.0 ml.
Distile su	947.0 ml.

Yukarıdaki maddeler distile suya ilave edilir ve pH 7,4 ayarlanır. 121°C'de 20 dakika otoklav edilir.

Albumin-Fatty Acid Supplementin Hazırlanışı :

	2 litre için		10 litre için
Bovine Album Fraction V	20 gr.		100 gr.
Calcium ve Magnesium		Stok sol,	
Chloride solution (stok)	3,0 ml.	gr/100 ml.	15 ml.
Çinko sülfat solusyon (stok)	2,0 ml.	0,4 gr/100 ml.	10 ml.
Bakır sülfat solusyon (stok)	0,2 ml.	0,3 gr/100 ml.	1 ml.
Demir Sülfat solusyon (stok)	20,0 ml.	0,5 gr/100 ml.	100 ml.
Vitamin B ₁₂ solusyon (stok)	2,0 ml.	0,02 gr/100 ml.	10 ml.
Tween 80 solusyon (stok)	25,0 ml.	Tween 80 (stok)	125 ml.
Dist. su	1896 ml.		8870 ml.

Not : Bovin albumin % 1 olarak katılır.

Beş litre Johnson vasatı için stok solusyonlar hazırlandı. 300 ml. steril bidistile suya 50 gr. sığır albumini katıldı. Stok solusyonlar albumin solusyonuna ilâve edildi. 2N sodyum hidroksit ile pH 7,4'e ayarlandı. 1 kısım suplement ve 9 kısım bazal vasat birbiri ile steril şekilde karıştırılıp 0,22 + 0,45 u milipore filtre sisteminde 0,2 atmosfer basınçla süzülerek tüplere ve erlenlere taksim edildi. Sterilite ekimi ve vasat yapıldıktan en az 15 gün oda derecesinde bekletildikten sonra kullanılmaya başlandı.

1 — Aşı Suşu :

Araştırmamızın başladığı 30 Mayıs 1983 tarihinden 25 Aralık 1984 tarihleri arasında sığırlardan, Çubuk, Kurşunlu, Ekşi elma, Gümüş pınar diye dört suş daha izole ederek laboratuvarımızda daha evvel izole ve idantifiye edilmiş olan suş sayısı 17'ye yükselmiştir. Suşların tamamı laboratuvarımızca tip spesifik hyperimmün serumlarıyla yapılan mikroskopik aglutinasyon test (M.A.T.) ile *L. grippotyphosa* serogrubundan olduğu tesbit edilmiştir.

Aşımızda kullandığımız suş 1984 yılı yazında Çankırı'nın Kurşunlu ilçesinin Çaylıca köyünde hasta bir sığırdan izole ve idantifiye edilerek *L. grippotyphosa* sero grubundan olduğu laboratuvarımızca tesbit edilmiştir (Tablo: 1).

Tablo : 1 İzole edilen 6 yerli suşun *L. grippotyphosa* Hyperimmun Serumu ile M.A.T. ile değerlendirilmesi

Suşlar	Keskin	Haymana	Şehitali	Kurşunlu	Pecenek	Fevziye	Kontrol
1/100	+	+	+	+	+	+	√
1/200	+	+	+	+	+	+	√
1/400	+	+	+	+	+	+	√
1/800	-	+	+	+	+	+	√
1/1600	-	+	-	+	+	+	√
1/3200	-	+	-	+	+	-	√
1/6400	-	+	-	+	-	-	√
1/12800	-	-	-	-	-	-	√

Not : Altı suş *L. grippotyphosa* hyper immun serumu ile M.A.T. sonuçları tabloda da görüldüğü gibi Haymana ve Kurşunlu suşları 1/6400 titrede çalışmıştır.

Suşların İmmunojenik Özelliğinin Tayini :

Bunun için 30°C'de suşlar saf olarak üretildi ve altışar kobaya 1'er ml. deri altı inokule edildi. 4 hafta boyunca hayvanlar dikkatle gözlemlendi, dereceleri alındı. Hiçbir anormal bir reaksiyon ve önemli bir derece yükselmesi görülmedi. İnokulasyondan bir ay sonra bütün bu altı grup kobaydan kan alınarak serumlar ayrıldı. Her grup serum kendi suşu ile M.A.T.'te tabii tutuldu. Test sonuçları aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir (Tablo 2).

Tablo : 2 İzole edilen 6 yerli suşun immonojik özelliğinin M.A.T. ile saptanması, Aşı inaculation Tarihi : 11.11.1984-Kan Alma Tarihi : 15.12.1984.

Kobay	Kulak No.	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	Kontrol
ŞEHİTALİ	77	++++	+++	++	+	-	-	✓
	76	++	-	-	-	-	-	
	75	+++	++	-	-	-	-	
	74	+++	++	-	-	-	-	
	73	-	-	-	-	-	-	
	671	+++	-	+	-	-	-	

Kontrol

PEÇENEK	668	+++	++	-	-	-	-	✓
	670	+++	++	-	-	-	-	
	672	+++	+	-	-	-	-	
	674	++++	+++	+++	++	-	-	
	675	++++	+++	+++	++	-	-	
	669	-	-	-	-	-	-	Oldu.

Kontrol

KURŞUNLU	676	++++	+++	+++	++	-	-	✓
	677	++++	+++	+++	++	++	+	
	678	++++	+++	+++	++	+++	+	
	679	++++	+++	+++	++	+++	+	
	680	++++	+++	+++	++	+	+	
	681	++++	+++	-	-	-	-	

Kontrol

FEVZİYE	683	+++	+++	++	++	+	-	✓
	684	+++	+++	+++	++	+	+	
	685	+++	+	+	-	-	-	
	686	+	+	+	-	-	-	
	687	+++	+++	++	+	-	-	
	688	+++	+++	++	+	-	-	

Kontrol

KESKİN	689	+++	++	-	-	-	-	✓
	690	-	-	-	-	-	-	
	691	-	-	-	-	-	-	
	692	-	-	-	-	-	-	
	693	+++	++	-	-	-	-	
	694	+++	+++	+	+	-	-	

Kontrol

HAYMANA	695	+++	++	++	-	-	-	✓
	696	-	-	-	-	-	-	
	697	-	-	-	-	-	-	
	698	+++	++	-	-	-	-	
	699	+++	+	+	-	-	-	
	700	+++	++	+	-	-	-	

Yapılan çalışmalar sonucu Kurşunlu suşunun immunojenik özelliğinin yüksek oluşu (Tablo 2) ve hamsterlerde patojenitesinin stabil olması sebebiyle aşı suşu olarak seçtik. Kurşunlu suşu aylık pasajlarla hamsterlerde -196° likit nitrojen tankında muhafaza edilmektedir.

2 — Aşı Üretimi :

Aşı suşunun seçimini takiben Kurşunlu suşu ilk önce bir seri tüplerdeki Johnson vasatına adaptasyon ve çoğalma ekimleri yapıldı. 30°C 'de 7-10 gün shaking inkübatörde inkübe edildi. Karanlık sahada üreme ve kontaminasyon durumunu tetkik ederek, yoğun ve saf üreme gösteren tüplerden 50 ml.'lik erlenlere geçirildi. Erlenlerdeki üremeyi takiben, 500 ml.'lik Johnson vasatı ihtiva eden buatlara son ekimler yapıldı, 7-10 gün üremeden sonra makroskopik muayene yapıldı. Kültür karanlık saha mikroskopunda gelişme, kontaminasyon ve organizma yoğunluğu açısından incelendi.

3 — Sterilite Testi :

Buatlardan Thioglycollate ve Tryptone Soye Broth vasatlarına 0,1-0,2 ml. kültürden ikişer tüp ekimler yapıldı. Birer tüp $30-31^{\circ}\text{C}$ de 14 gün inkübe edildi, diğer iki tüp, oda derecesinde 14 gün fungi mevcudiyeti için bekletildi. Thioglycollate vasatı anaerob kontaminasyonu, Tryptone Soye Broth ise aerob ve fungi mevcudiyetini araştırmak için kullanıldı. Bunun yanında kanlı agara da ekimler yapıldı (7).

4 — Aşının İnaktivasyonu :

Sterilite testinde kontaminasyon görülen buatlar dışında, temiz üreme gösterenler steril büyükçe bir damacanada toplandı ve % 0,1 w/v % 37volumluk formol ile % 0,01 w/v mertthiolate ilâve edildi. Damacanalara iyice çalkalandı ve iki gün oda derecesinde bekletildi (5, 17).

5 — Leptospiral Canlılık Testi :

Formol ile inaktive edilen kültürün inaktive olup olmadığını tesbit için yapıldı. Üç seri dört tüplük Johnson vasatına inaktive

kültürden 0,5 ml. tüpten tüpe aktarma ile dilüsyon yaparak, son tüpe kadar ekim yapıldı. En az 14 gün 30°C'de tüpler inkübe edildi. Sonuçta vasatlarda herhangi bir üreme ve canlı leptospira gerimine rastlanmadı (7).

6 — Germ Sayısı :

Formol ile inaktive edilen kültürden Hawksley Thoma lamı ile karanlık saha mikroskopunda aşağıdaki formüle göre Leptospira germelerinin sayımı yapıldı ve $7,2 \times 10^{-8}$ germ/ml. bulundu.

$$\text{germ/ml.} = \frac{N \times 2 \times 10^7}{16} \times \text{Dilüsyon faktör}$$

N = 5 büyük kare ortalaması

Adjuvant olarak inaktive edilen ve germ sayımı yapılan kültüre, % 10 hesabıyla Alüminyum hidroksit geli steril şartlarda katıldı ve damacana arasına çalkalayarak adsorbsiyon sağlandı (7, 8, 17).

7 — Toksikite Testi :

a) Herbiri 18-22 gram ağırlığında sağlıklı bir elevajdan alınan iki fareye 0,5 ml. aşı, deri altı inokule edildi. 5-7 gün gözaltında tutuldu. Her iki fareden de anormal bir reaksiyon gözlenmedi.

b) Her biri 250-400 gram ağırlığında sağlıklı iki kobay 2 ml. aşı ile aşılandı. 10 gün gözlendi, sonuçta herhangi bir anormal reaksiyon tesbit edilmedi (7).

8 — Zararsızlık Testi :

Sağlıklı bir sürüden M.A.T. ile kanlarında antikor taşımayan 14-20 aylık iki sığıra aşı dozunun iki misli $2 \times 5 \text{ ml.} = 10 \text{ ml.}$ aşı omuz gerisinden deri altı enjekte edildi. Hayvanlar 7 gün boyunca dereceleri yükselmediği, yeme ve içmeleri ile canlılıklarından bir şey kaybetmedikleri gibi, kötü bir reaksiyon görülmedi. Yalnız enjeksiyon yerinde ceviz büyüklüğünde ağrısız, ateşsiz olağan depo aşısı nodülü oluştu. Meydana gelen nodül 20 gün içinde tedrici şekilde kayıp oldu (7).

Aşının Hamsterlerde Potency Testi :

Sağlıklı elevajdan 3 aylıktan fazla olmayan 10'ar hamsterlik üç grup hamster alındı.

I. grup hamsterler bir sığır dozunun 1/100'ü ile aşılandı.

II. grup hamsterler sığır dozunun 1/400'ü ile aşılandı. 21 gün sonra I. ve II. grup hamsterler aynı dozlarla tekrar aşılandı. İkinci defa aşılamadan 15 gün sonra her iki grupta birlikte aynı elevajlardan alınan sağlıklı aşısız 10 kontrol hamster birlikte eprüve edildi. Eprüvasyonda pathogen Kurşunlu suşu inoküle edilen ve bir hafta içinde ölen hamster böbrek emülsiyonunun 1/10 dilusyonundan 0,2 ml. intra peritoneal olarak inoküle edildi. (1000 LD₅₀/0,2 ml.) Eprüvasyondan bir hafta sonra aşısız kontrol hamsterlerin tamamı öldü. 10/10 aşı hamsterlerden 1/100 sığır dozu verilenlerden bir hamster diğerleri tarafından parçalanarak öldürüldü. Böbreğinden yapılan karanlık saha muayenesinde leptospira organizmi görülmedi. 0/10, 1/400 sığır dozu ile aşı olan II. grup hamsterlerden üç tanesi öldü. 3/10 eprüvasyondan bir hafta sonra ölen gerek 10 kontrol hamsterin tamamı ile 1/400 sığır dozu verilen II. gruptan ölen üç hamsterin böbrek emülsiyonları karanlık saha mikroskopunda yapılan muayenede hareketli leptospira organizmleri bol miktarda görüldü. Ölen kontrol hamsterlerin böbreklerinde 150 µg/ml. 5 fluorouracil ihtiva eden semi solid EMJH izolman vasatlarına ekimler yapıldı. 4 hafta sonra Lep. organizmleri tekrar izole edildi. Eprüvasyondan iki ay sonra hayatta kalan aşı her iki grup hamsterlerin böbrek ekimlerinden etken izolasyonu yapılamadı. Eprüvasyondan sonra iki ay tüm hayvanlar gözlemlendi, başka ölüm olmadı (Tablo 3).

Tablo : 3 Aşılı ve kontrol hamsterlerinin pathogen leptospira ile eprüvasyon sonuçları (Aşının hamsterlerde bağışıklık testi)

	Aşılı Hamsterler			Aşısız kontrol hamsterler
	1/100 SIĞIR DOZU VERİLEN	1/400 SIĞIR DOZU VERİLEN		
Eprüvasyon suşu	I. grup hamster	II. grup hamster		
Path. L. grippotyp-hosa (Kurşunlu)	0/10	3/10		10/10

Tabloda da görüldüğü gibi I. grup 1/100 sığır dozu ile aşılan hamsterleri epruvasyon sonunda hiç ölüm olayı görülmediği ve aşının % 100 hamsterleri koruduğu saptandı. II. grup 1/400 sığır dozu verilenlerde ise ölüm oranı % 30'dur ve aşının hamsterleri % 70 oranında koruduğu saptandı (8, 14).

Aşının Sığırlardaki Bağışıklık ve Bağışıklık Süresinin Tayini :

Kan serumları mikroskopik aglutinasyon testle (M.A.T.) seronegatifliği saptanan 24 baş bir yaşında dana temin edildi ve bunların 12 tanesi 21 gün ara ile 5 ml. aşı ile iki defa aşılandı. İkinci aşılamadan bir ay sonra kan serumları (M.A.T.)'le işlenerek antikor seviyeleri tesbit edildi (2, 16).

Tablo : 4 21 gün ara ile 5 ml. aşı ile çift doş aşılan danalarda Mikroskopik Aglutinasyon test sonuçları (Aşının sığırlarda bağışıklık testi)

Dana Kulak No.	Aşılamadan önce M.A.T.	Aşılama Durumu	Aşılamadan 1 ay sonra L. grippotyp-hosa sero grubundan Kurşunlu suşu ile M.A.T.	Aşılamadan 3 ay sonra M.A.T.	Aşılamadan 6 ay sonra M.A.T.
6639	N	A	1/6400	1/3200	1/160
6648	N	A	3200	3200	160
6607	N	A	1600	1600	160
6643	N	A	6400	3200	160
6610	N	A	1600	1600	320
6601	N	A	3200	3200	160
6617	N	A	6400	3200	160
6614	N	A	3200	1600	320
6619	N	A	3200	3200	320
6622	N	A	1600	1600	160
6620	N	A	3200	3200	160
6608	A	A	3200	3200	320

N : Negatif

A : Aşılı

M.A.T. : (Mikroskopik Aglutinasyon Test)

Aşılı 12 dananın 6 ayı doldurması üzerine 6 aşılı dana ayrılarak eprüvasyona geçildi. Eprüve suşu olarak *L. grippotyphosa* sero grubundan pathogen Kurşunlu suşu hamsterden pasaj edilerek 3×10^{-8} germ/ml. kültürden 1000 LD₅₀/5 ml. deri altı, 1 ml. ağızdan 1 damla göze damlatarak 6 baş aşısız dana ile birlikte eprüve edildi.

Eprüvasyondan 15-30 gün sonra aşılı ve aşısız danaların idrarları alınarak, karanlık saha mikroskobunda leptospira organizmi arandığı gibi, aynı idrarlardan kültürleri yapıldı. Eprüvasyondan 40 gün sonra aşılı ve aşısız danalar kesilerek, böbrek ve karaciğerlerinde 5 fluorouracil 150 ug/ml. bulunan semi solid izolman EMJH vasatına ekimler yapıldı. Aynı dokuların taze emülsiyonları yapılarak karanlık saha mikroskobunda leptospira organizmleri arandı. 12 dananın böbrek ve karaciğerleri Enstitümüz patoloji laboratuvarında Levaditi tekniği ile histopatolojik yoklamaları yapıldı, ayrıca aynı dokulardan touche preparatlar hazırlanarak giemsa ile boyandı (8, 14, 20). Bütün bu faaliyetler Tablo 5)'de gösterilmiştir. Tablodaki değerlere göre aşılı 12 dananın 6 ay sonunda serumlarındaki antikor düzeyi 1/320 ile 1/160 arasında değişmekte ortalama titre ise 1/210'dur. Eprüvasyoda kullandığımız Kurşunlu suşu hamsterlerdeki potency testi esnasında kontrol hamsterleri öldürdüğü halde, aşısız kontrol danaları öldürmedi. Fakat husule getirdiği böbrek enfeksiyon usonucu idrarları ile leptospira organizmleri çıkarmaları, idrar ve böbreklerin bakteriyolojik, kültürel ve histopatolojik muayeneler sonucu pozitif bulunmasını enfeksiyon göstergesi kabul ederek eprüvasyonda kriter olarak kullandık (8, 10, 14).

Aşılı danalarda 6601 nolu dana hariç, idrarları ile leptospira çıkarmadığı bakteriyolojik, kültürel ve histopatolojik muayenelerin menfi olduğu görüldü. Bu duruma göre aşı 6. ay sonu danaları % 83 oranında koruduğu saptandı.

Tablo : 7 21 gün öra ile çift doz aşıllı danalarda 12 ay sonra mikroskopik aglutinasyon test (M,A,T.) sonuçları

Dana Kulak No.	Aşılamadan önce M,A,T.	Aşılama Durumu (12 aydır aşıllı)	Aşılamadan 12 ay sonra Kurşunlu suşu ile M,A,T.
6629	N	A	1/40
6648	N	A	1/20
6603	N	A	1/10
6619	N	A	1/80
6626	N	A	1/20
6628	N	A	1/40

N : Negatif

A : Aşıllı

M,A,T. : Mikroskopik Aglutinasyon Test

12 ay evvel aşılanan 6 baş dana 6 aşısız kontrol dana ile eprüvasyona geçildi. Eprüve suşu olarak *L. grippotyphosa* sero grubundan pathogen Kurşunlu suşu hamsterden pasaj edildi. 3×10^{-8} germ/ml. kültür ve hamster böbrek emülsiyonu karışımından 1000 LD₅₀/5 ml. subcutan 1 ml. ağızdan, 1 damla göze damlatılarak danalar eprüve edildi.

Eprüvasyondan 40 gün sonra aşıllı ve aşısız danalar kesilerek toplam 12 dananın böbrek, karaciğer ve idrardan touche preparat yapıldı, giemsa ile boyandı. 5-fluorouracil 150 µg/ml. bulunan semi solid izolman EMJH vasatına ekimler yapıldı. Böbrek ve karaciğer doku emülsiyonu ve idrar karanlık sahada mikroskopik inceleme ye alındı. Ayrıca böbrek ve karaciğerler Enstitümüz Patoloji Laboratuvarında Levaditi tekniği ile histopatolojik yoklamaları yapıldı. Bütün bu çalışmalar (Tablo 6)'da gösterilmiştir. Tablodaki değerlere göre aşıllı altı baş dananın 12. ay sonunda serumlarındaki antikor düzeyi 1/10 ile 1/80 arasında değişmekte, ortalama titre 1/35 dir. Eprüvasyonda kullandığımız pathogen Kurşunlu suşu hamster-

lerdeki potency testi esnasında aşısız kontrol hamsterleri öldürdüğü halde, aşısız kontrol danaları öldürmedi. Fakat husule getirdiği, böbrek enfeksiyonu sonucu idrarları ile leptospira organizmi çıkarmaları idrar ve böbreklerin bakteriyolojik, kültürel ve histopatolojik muayeneler sonucu pozitif bulunmasını enfeksiyon göstergesi kabul ederek eprüvasyonda kriter olarak kullandık. Tablo 6'da gösterildiği gibi 12 aydır aşılı altı baş danadan 6648 nolu hayvan hariç diğer beş dananın leptospira organizmi çıkarmadığı bakteriyolojik, kültürel ve histopatolojik muayenelerin menfi olduğu görüldü. Aşısız altı baş dananın altısında idrarları ile leptospira organizmi çıkardığı ve yapılan kültürlerden tekrar etken izolasyonuna muvaffak olundu.

Bu duruma göre aşılı 12 inci ay sonu itibariyle danaları eprüvasyondan % 83 oranında koruduğu saptandı.

Aşının Saha Denemesi :

Elimizde stok olarak bulunan aşı ile aşı suşunun izole edildiği Çankırı'nın Kurşunlu ilçesinin Çaylıca köyü bu çalışmalar için pilot bölge olarak seçildi. 433 baş sığır, 360 baş koyun aşılandı. Aşılama 21 gün ara ile iki defa uygulandı. Üç, altı ve onikinci ay sonu itibarı ile M.A.T. ile sondalama metodu kullanarak köyden seçilen yirmi baş aşılı sığırdan antikor düzeyleri saptandı. En yüksek antikor seviyesi 1/6400, en düşük 1/80 düzeyinde bulundu.

Bu antikor seviyesi oldukça yüksek titreleri ifade etmektedir. (Tablo 8). Adıgeçen köyde bir seneyi aşkın sürede yapılan çalışmada sekizyüz civarında hayvan aşılandığı, aşılı gebe hayvanlarda dahil, hiçbir yavru atma vak'ası olmadığı gibi, aşılı hayvanlarda lokal ve genel kötü post vaksinal istenmeyen reaksiyonlara rastlanmadı. Bu arada her sene, Çaylıca köyünde sporadik olarak leptospirosis çıktığı İlçe Veteriner Hekimliğince bildirilmiştir. Aşılanmadan sonra 1985 baharından bu yana köyde leptospira vak'asının çıkmadığı yakın gözlemlerimizle saptandı.

Tablo : 8 Leptospira Aşısının Çankırı-Kurşunlu Çaylıca köyü sığırlarında yapılan saha denemesi M.A.T. sonuçları.

Hayvan Sahibinin Adı Soyadı	Sığırın Lâkabı	Sıra No.	3 ay	6 ay	12 ay
Recep Yeşildağ	Ala inek	1	1/400	1/200	1/80
» »	Çonukayık	2	1/6400	1/3200	1/800
Mehmet Ali Yücel	Sakar inek	3	1/1600	1/400	1/160
» »	Sarı düve	4	1/800	1/200	1/80
» »	(160) kulak no.	5	1/800	1/200	1/80
» »	(695) kulak no.	6	1/800	1/200	1/80
Servet Çiçek	Gök inek	7	1/400	1/200	1/80
» »	Sarı inek	8	1/1600	1/400	1/80
» »	Sarı buzağı	9	1/3200	1/800	1/160
» »	Sakar dana	10	1/800	1/200	1/80
Hakkı Yücel	Kara inek	11	1/6400	1/1600	1/320
» »	Küçük montofon	12	1/1600	1/400	1/80
» »	Büyük »	13	1/800	1/200	1/80
» »	Yerli kara inek	14	1/400	1/200	1/80
Ali Uzun	Siyah inek	15	1/400	1/200	1/80
» »	Montofon düve	16	1/400	1/200	1/80
» »	(598) kulak no.	17	1/1600	1/800	1/320
» »	Siyah sivri boy, düve	18	1/800	1/200	1/80
Alaaddin Fındık	Siyah sivri boy, inek	19	1/800	1/1200	1/80
» »	Buzağı	20	1/1600	1/400	1/160

Tablo : 5 Leptospira Aşısının Danalarda Bağışıklık Test Sonuçları (Altıncı ay sonu)

Dana Kulak No,	Aşılama Durumu	Epruvasyondan sonra idrarın Kar. Saha, Mik. Kontrolü 15-30 gün	Kültür Muayenesi (Leptospira organizm izolasyonu)			Böbrek ve K.ciğer Doku emülsiyonu kar. saha, mik. Kontrolü	Histopatolojik Muayene Böbrek - K.ciğer		Böbrek K.ciğer touche preparat
			İdrar	Böbrek	K.ciğer				
6639	Aşılı 6 ay	—	—	—	—	—	—	—	—
6608	» »	—	—	—	—	—	—	—	—
6610	» »	—	—	—	—	—	—	—	—
6601	» »	—	—	—	—	—	+	—	—
6620	» »	—	—	—	—	—	—	—	—
6622	» »	—	—	—	—	—	—	—	—
6711	Aşısız Kontrol	+	+	+	—	+	+	+	+
6702	» »	+	+	+	—	+	+	+	+
6703	» »	+	+	+	—	+	+	+	+
6704	» »	+	+	+	+	+	+	+	+
6705	» »	+	+	+	+	+	+	+	+
6706	» »	—	+	+	—	+	—	—	—

Tablo : 6 Leptospira Aşısının Danalarda Bağışıklık Test Sonuçları (12 nci ay sonu)

Aşılı dana kulak no.	Aşılanma Durumu	İdrarın, böbrek ve k.ciğer doku emülsiyonunun Karanlık saha mikroskop kontrolu			Kültür muayenesi etken izolasyonu			Histopatolojik Muayene		Touche Preparat	
		İdrar	Böbrek	K.ciğer	İdrar	Böbrek	K.ciğer	Böbrek	K.ciğer	Böbrek	K.ciğer
6629	Aşılı	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6648	»	—	+	—	—	+	—	+	—	+	—
6603	»	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6619	»	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
6626	»	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6628	»	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Aşısız kontrol											
dana kulak no.											
1	Aşısız	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+
2	»	+	+	—	—	+	—	—	—	+	+
3	»	—	+	—	+	+	—	+	—	+	—
4	»	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+
5	»	—	+	—	—	+	—	+	—	—	+
6	»	+	+	—	+	+	—	—	—	+	+

Eprüve Suşunun Muhafazası :

Araştırma boyunca aşı tohum ve eprüvasyon kültürü olarak kullandığımız *L. grippotyphosa* sero grubundan pathogen Kurşunlu suşu her hafta hamsterlerde pasaj sureti ile canlı idamesi sağlandı. Buna paralel olarak, daha pratik muhafaza metodu olan Liquide Nitrogen Containerlerde (-197°C)'de özel payet ve silikonlu yumuşak tüplerde, % 10 gliserinli ortamda muhafaza sistemi kuruldu. Pathogen Kurşunlu suşu 20 ay burada canlılığını ve pathogenitesini muhafaza ettiği görüldü.

B U L G U L A R

L. grippotyphosa sero grubundan Kurşunlu suşu ile formol ile inaktive $7,2 \times 10^{-8}$ germ/ml. yoğunlukta bir aşı hazırlandı.

Aşının temizlik ekimleri normal, fare ve kobaylarda toksisiteden uzak, canlı leptospira organizmi içermeyen, sığırlardaki zararsızlık testlerinde güven veren, bir aşı olduğu saptandı.

a — Aşının hamsterlerde yapılan bağışıklık testlerinde ise aşı bir sığır dozunun 1/100'ü inokule edilen 10 adetlik bir grup hamsteri *Leptospira* enfeksiyonundan % 100 koruduğu, b — bir sığır dozunun 1/400'ü inokule edilen 10 adetlik ikinci grup hamsteri % 70 oranında koruduğu, buna mukabil aşısız 10 adetlik 3 grup kontrol hamsterlerin eprüvasyondan sonra 10 adedinin de öldüğü ve tüm ölenlerden tekrar etken izolasyonu ile eprüvasyonun geçerliliği kanıtlanmış oldu (Tablo 3). Sığırlardaki bağışık testinde denemeye alınan yirmidört dananın eprüvasyondan sonra 15-30 günlerde idrarları ile leptospira germini çıkarıp çıkarmadığını saptamak üzere, altı aylık aşıdan sadece 6601 kulak nolu hayvanın idrarı ile etken çıkardığı saptandı. Oniki aylık aşıdan 6648 kulak numaralı hayvan hariç hiç birisinin idrarları ile etken çıkarmadığı, bakteriyolojik, kültürel ve histopatolojik muayenelerin menfi olduğu saptandı. Aşısız, kontrol altı baş dananın yapılan muayenelerde idrarları ile leptospira organizmler çıkardığı, tesbit edildi. Bu hayvanlardan yapılan ekimler sonucu tekrar etken izolasyonuna muvaffak olundu (Tablo 5-6). Otopside aşısız

kontrol danaların böbrek kapsulası altında makroskopik boz, beyaz toplu iğne başı büyüklüğünde interstitial nefritis odakları gözlemlendi. Aşılı danalarda bu durum görülmedi.

T A R T I Ş M A

Ortaya koyduğumuz monovalan L. grippotyphosa aşısında, yerli Kurşunlu suşu tohum kültürü olarak kullanılmıştır. Aşı formole inaktive bir aşıdır (1).

Yeni Zelanda'da yapılan bir çalışma L. hardjo ve L. pomona ile sentetik vasatta hazırlanan bivalan bir aşığı danalarda deneyerek pozitif idrar ve böbrek kültürlerini enfeksiyon göstergesi olarak kullanmak suretiye belirgin derecede korunma sağlandığı bildirilmektedir (14).

Yine Yeni Zelanda'da ortaya konan bir araştırmada L. hardjo, L. pomona ve L. copenhageni ile hazırlanan trivalan aşı sırası ile hamster ve danalarda bağışıklık testine tabi tutulmuş, sonuçta aşılı danaların leptospira çıkarmadığı ve aşının bunu önlediği saptanmıştır (8).

Laboratuvarımızda aşı sentetik Johnson vasatında üretilerek, aşı üzerinde yapılan testler Yeni Zelanda'da yapılan her iki çalışma ile bir paralellik göstermektedir. Yegâne ayrıldığıımız nokta aşımızın monovalan oluşudur. Hamsterlerde ve danalardaki bağışıklık testleri ile sterilite, zararsızlık ve toksisite Avrupa farmakopisinin istediği güvenlik sınırları içindedir (7).

Çekoslovakya'da yapılan aşılamalarda 1/50 ve 1/100 antikor titre elde edildiği bildirilmektedir (16). Amerika'da yapılan bir araştırmada leptospira aşılamalarında 1/100 ve 1/200 titrelerin yeterli olduğu bu antikor titresinin 6-12 ay arasında bağışıklık sağlayarak sığırlarda abortları önlediği bildirilmektedir (6). Aşımızda altıncı ve onikinci ay sonu itibarı ile sığırlarda antikor titresini olarak 1/160 ve 1/80 değerlerini bulduk (Tablo 4-7). Her ne kadar bu titreler düşük görülmekte ise de mühim olan hamster ve danalar-

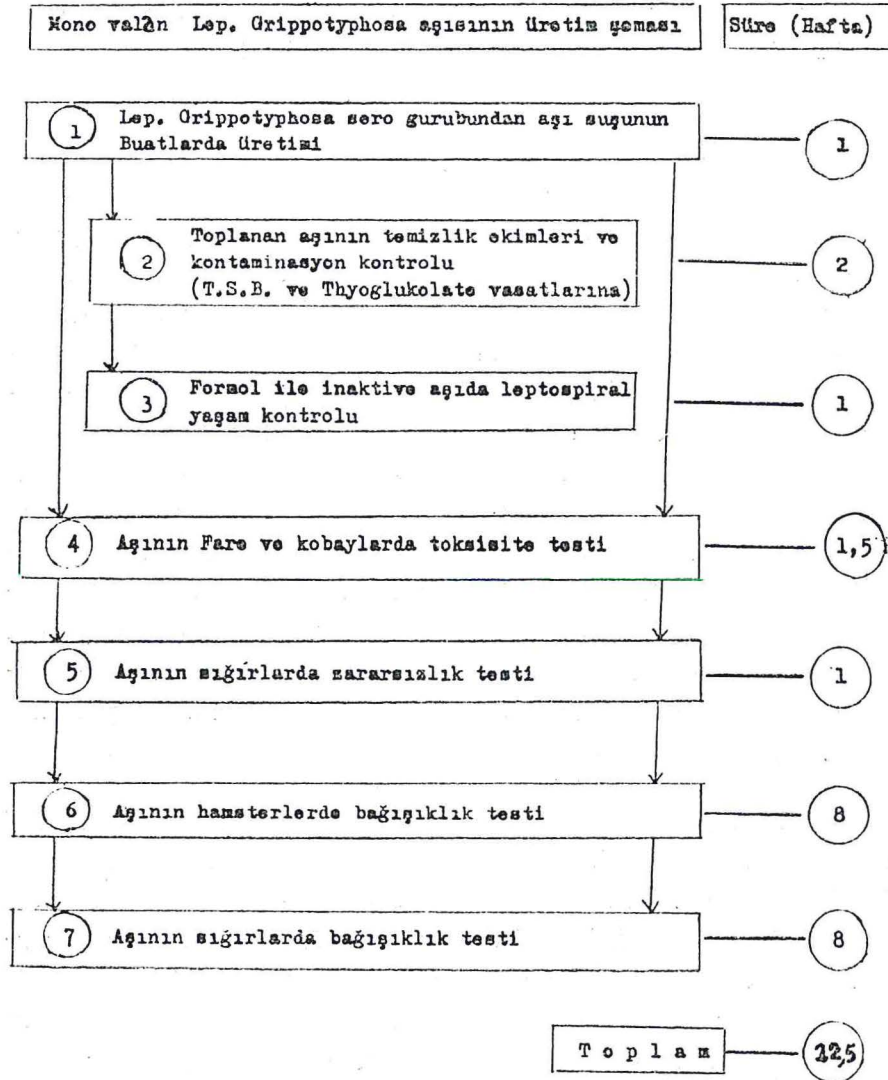
da bulduğumuz % 83 koruma sağlayan bağışıklık test sonuçlarıdır (8, 14).

Aşı dozunu sığırlarda 5 ml. olarak kullandık. Aşı dozu sığırlarda Amerika ve Avrupa farmakopesine göre 5 ml. dir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

L. grippotyphosa sero grubundan patojen Kurşunlu suşu ile % 0,1 formol ile inaktive % 0,01 merthiolatlı % 10 Al(OH)₃'e adsorbe $7,2 \times 10^{-8}$ germ/ml. yoğunlukta monovalan bir aşı hazırlandı. Aşının bağışıklık testleri hamsterlerde, 1/100 ve 1/400 sığır dozu verilerek uygulandı. Hamsterlerin 1/100 sığır dozu ile aşılana- ları % 100 eprüvasyona dayandıkları halde 1/400 sığır dozu ile aşılana hamsterleri eprüvasyonda % 70 oranında koruyabildi. Sığırlarda ise bağışıklık testi için yirmidört dana kullanıldı. Aşılama 21 gün ara ile 5 ml. aşı dozu 2 defa uygulandı. Aşılama- dan altı ve onikinci aylar sonu itibarı ile aşısız kontrol danalarla birlikte 3×10^{-8} germ/ml. patojen Kurşunlu kültürü ve hamster böbrek emülsiyonu karışımından 1000 LD₅₀/5 ml. ile eprüve edildiler. Eprüvasyon sonu danaların leptospira enfeksiyonlarına karşı aşının % 83 oranında koruduğu kanısına varıldı.

Aşılama çiftleşmeden önce veya hemen sonra yapılabilir. Aşı sığırlarda omuz gerisine veya boyuna 5 ml. olarak 21 gün ara ile iki defa uygulanır. Bunu takip eden diğer senelerde bir doz idame aşılama ile bağışıklık bir yıl devam eder (7, 9). Aşı ışıktan korunmuş olarak soğukhava deposu veya buzdolabında $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 'de en az 6 ay saklanır (7). Gebe hayvanlara aşı tatbik edilmez. Gebeliğin ikinci yarısından sonra husule getirilen bağışıklık abortları önlemez.



Ö Z E T

Leptospira grippotyphosa sero grubundan yerli Kurşunlu suşu kullanarak, monovalan numune aşısı hazırlandı. Aşıda % 0,1 formol, % 0,01 merthiolate ile % 10 Al(OH)₃ kullanılmıştır. Aşı tohum kültürü Johnson vasatında 30°C'de 7-10 gün inkube edilerek aşısı üretilmiştir.

Kültürden Hawksley Thoma lamı kullanarak germ sayımı yapıldı ve $7,2 \times 10^{-8}$ germ/ml. bulundu. Aşının sterilite, leptospiral viability, toksisite testleri sırası ile uygulandı. Test sonuçları güvenilir limitler içinde bulundu.

Hamsterlerdeki potency testi için 10 adetlik üç grup 3 aylık hamster alındı. 21 gün ara ile iki gruba 1/100 ve 1/400 sığır dozu miktarında aşısı inokule edildi. Aşılı hamsterler ikinci aşılama 15 gün sonra 10 adet aşısız kontrol hamsterle birlikte her üç grup hamster 3×10^{-8} germ/ml. pathogen *L. grippotyphosa* kültürünün 1000 LD₅₀/0,2 ml. ile eprüve edildiler. Eprüvasyondan sonra 1/100 sığır dozu ile aşılı 1 inci hamster grubu hayatta kaldı. 0/10, 1/400 sığır dozu tatbik edilen II inci hamster grubun üç tanesi öldü. 3/10 böylece birinci grup eprüvasyona % 100 dayandı. II. grup ise % 70'te kalmıştır. Sığırlardaki bağışıklık testi hamsterlere paralel olarak yapıldı, bu testte 24 dana kullanıldı. Danalar 5 ml. aşısı ile 21 gün ara ile iki defa aşılandı. Aşılama altıncı ve onikinci aylar sonu aşısız kontrol danalarla birlikte 3×10^{-8} germ/ml. hamsterden pasaj edilmiş pathogen kurşunlu kültürünün 1000 LD₅₀/5 ml.'si ile deri altı ve gözde damlatılarak eprüve edildi. Eprüvasyondan sonra idrarlarından ve böbreklerinden bakteriyel kültürel ve histopatolojik muayeneler sonucu test danalarını *Leptospira* enfeksiyonuna karşı aşının en az % 83 oranında koruduğu görüldü.

Saha denemesi olarak Çankırı'nın Kurşunlu, Çaylıca köyünde 433 baş sığır, 360 baş koyun aşılandı, aşılı hayvanda istenmeyen lokal ve genel post vaccinal reaksiyonlara rastlanmadı. Aşısı tohum kültürü hamsterlerde her hafta pasaj suretiyle canlılığı devam ettirilirken, buna paralel olarak aynı suş liquide nitrogen containerlerinde özel payet ve silikonlu tüp içinde % 10 gliserinde patojenitesini kayıp etmeden en az iki senedir muhafaza edilmektedir.

S U M M A R Y**PREPARING A VACCINE WITH LOCAL STRAINS,
AGAINST BOVINE LEPTOSPIROSIS, WHICH HAS
ADSORBED TO ALUMINIUM HYDROXIDE AND IT
HAS STRONG IMMUNOLOGIC PROPERTIES**

A monovalent vaccine was prepared by using Kurşunlu strain which is indigenous, belonging to the *L. grippotyphosa* serological group. In this vaccine 0,1 % formaldehyde, 0,01 % merthiolate and 10 % $Al(OH)_3$ had been used. Vaccinal seed germs have been incubated at 30°C for 7-10 days and so the vaccine have been produced.

The germs counting was made by using Hawksley Thoma slide, and the number of the germs was found as $7,2 \times 10^{-8}$ germ/ml. Leptospiral viability, toxicity and sterility tests have been applied respectively. The results of the tests were found in reliable limits.

For potency test in hamsters, the animals, at the age of 3 months were divided into 3 groups and each group was containing ten hamsters. At interval of 21 days, the vaccine have inoculated into two groups with the amount of 1/100 and 1/400 cattle doses.

Vaccinated hamsters, after 15 days from second vaccination and together with unvaccinated control hamsters have been challenged with 3×10^{-8} germ/ml. pathogen *L. grippotyphosa* cultures which were 1000 $LD_{50}/0,2$ ml.

After challenge, first hamster group were alive. These hamsters had been vaccinated with 1/100 cattle dose. In the second hamsters group, three animals were died. These hamsters had been vaccinated with 1/400 cattle dose.

And so the first group was resistant to the challenge at the rate of 100 %. The ratio was found 70 % at the second group. The immunity test in the cattle, was made similar to hamsters. In this test 24 calves were used. At the vaccination 5 ml. vaccine has been used at interval 21 days. 6 and 12 months later from vaccination, unvaccinated control calves and vaccinated calves were challenged with 3×10^{-8} germ/ml. In this challenge the culture which is called Kurşunlu strain passaged from hamsters has been used as 1000 $LD_{50}/5$ ml. subcutaneously and by dropping to eyes.

After challenge, bacteriological and histopathological examinations from their urines and kidneys have been made. The results showed that, the vaccine was protective for calves at least, at ratio of 83 %.

As a field trial 433 cattle and 360 sheep have vaccinated in the Çaylıca village/Kurşunu. We didn't encounter undesirable postvaccinal, local and general, reactions.

The vaccinal seed culture has been maintained by serial weekly passages in hamsters. Being paralel to this, the same strain with 10 % glycerine has been kept in the container which contain Li- quide nitrogen, in the plastic pipette and silicon tubes. This strain has been maintained for two years without lossing its pathogenity.

L İ T E R A T Ü R

- 1 — ADLER, B., FAINE, S. (1978) : Immunogenicity of boiled compared with formalizet leptospiral vaccines in rabbits, hamsters and humans. J. Hyg., Camb. (1980). 84, 1.
- 2 — BABUDIERY, B., (1961) : Laboratory Diagnosis leptospirosis Bull. org. Mond. Santé Bull. wld. Hlth. Org. 1961. 24, 45, 58.
- 3 — BULU, A.A., (1981) : Leptospirosise karşı etkin bir aşı hazırlanması ile bu aşının keçi, tavşan, kobay ve hamsterlerde bağışıklık denemeleri, Etlik Vet. Mik. Enst. Derg. 1979-1981 Cilt. 5, Sayı: 1,2,3/44, 58.
- 4 — BULU A.A., YUMUŞAK, M. (1981) : Ankara bölgesinde sığırlar arasında seyreden ikterohaemoglobinuri vak'alarında serolojik ve kültürel metodlarla tesbit edilen leptospirosis olayları. Etlik Vet. Mik. Enst. Derg. 5, 1,2,3, 78-85.
- 5 — CESSI, D., CASTELLI, S. (1968) : Prove sperimentali con un vaccino Emulsionato Contro La Leptospirosi suina. Atti della societa Italiana della Sienze Veterinarie. Volum XXII, 1968. 808-811.
- 6 — DIESCH, Stanley L. (1980) : Vaccination and titer evaluation. Modern Veterinary Practice, November, 1980. 905-008, College of Veterinary Medicine, University of minnesota. 55108.
- 7 — European pharmacopoeia Vol. III. Supplement (1977) 51, 159, 162.
- 8 — FLINT, S.H. and LIARDET, D.M. (1980) : A trivalent leptospiral vaccine with emphasis on a leptospira interrogans serovar hardjo component to prevent leptospiruria. Newzeland Veterinary Journal (1980), 29 (12) 263-6.

- 9 — HANSON, L.E., TRIPATHY, B.V., KILLINGER, A.H., (1972) : Current status of leptospirosis Immunization in swine and cattle J.A.V.M.A. Vol. 161 No: 11.
- 10 — HUH, R.G., HANSON, L.E., KILLINGER, A.H., CARDELLA, M.A., (1973) : Immunity to leptospirosis: *Leptospira interrogans* Serotype pomona Bacterins in cattle. Am. J. Vet. Vol. 36, No: 1 59-64.
- 11 — JOHNSON, R.C., ROGER, P. (1964) : 5- fluorouracil as a selective agent growth of leptospire J. Bact. 87: 422. 6.
- 12 — JOHNSON, R.C., HARRIS, V.G. (1967) : Journal of Bacteriology 94 27.
- 13 — MORSI, Hüssein M. and SHIBLEY, George P. (1972) : Cellular and whole Culture Bivalent Leptospiral Bacterins Safety and potency in Guinea pigs and hamster. 1973. Am. J. Vet. Res. Vol. 34 No: 1 115-116.
- 14 — MARSHALL, R.B., BROUGHTON, E.S. and HELLSTROM, J.S. (1979) : Protection of cattle against. Natural Challenge with leptospira interrogans serovar hardjo using a hardjo pomona vaccine. N.Z. Vet. J. 27: 114-116.
- 15 — ÖZGEN, H., TUNUS, M. (1954) : Türkiye'de ilk olarak *Leptospira bovis* suşunun kültürel geliştirilmesi, Türk Vet. Hekim. Derg. 24 (98-99) 1865-1874.
- 16 — PLESKO, I. (1966) . Criteria of postvaccinal immunity in Leptospirosis. Ann. Sec. belge Méd. trop. 4 ,2, 225-230. Bratislava.
- 17 — RIS, D.R., HAMEL, K.L. (1979) : *Leptospira interrogans* serovar pomona vaccines with different adjuvants in cattle New, Zel. Vet. J. 27: 169-71.
- 18 — RUSSEL, F. Bey, RUSSEL, C. Jhonson, (1977) : Humora immune Responses of cattle vaccinated with leptospiral pentavalent outer Envelope and Whole culture Vaccine Am. J. Vet. Res. Vol. 39, No: 7 1109-1114-1978.
- 19 — STALHEIM, O.H.V. (1967) : Vaccination of Hamsters, Swine and Cattle while Viable A virulent *Leptospira pomona*. Am. J. Vet. Res., Vol. 29, No: 7 1463-1468.
- 20 — STALHEIM, O.H.V. (1970) : Duration of immunity in cattle in response to a viable. A virulent *Leptospira pomona* vaccine. Am. J. Vet. Res., Vol. 32, No: 6, 851-854.
- 21 — YORK, Charles J. and BAKER, James A. (1953) : Vaccination for Bovine Leptospirosis. Am. J. Vet. Res. 1953. Vol. XIV. No: 50, 5-8.