

LEPTOSPIROSIS'E KARŞI ETKİN BİR AŞI HAZIRLANMASI İLE BU AŞININ KEÇİ, TAVŞAN, KOBAY ve HAMSTERLERDE BAĞIŞIKLIK DENEMELERİ

A. Altan BULU

Etlik Veteriner Kont. ve Araşt. Enst.
Leptospira Lâb. Şefi
Etlik/ANKARA

GİRİŞ

Bütün dünyada insanlarda ve hayvanlarda değişik hastalık durumları oluşturan leptospira enfeksiyonları, son yıllarda büyük önem kazanmış bulunmaktadır. Diğer spirocheat'lere göre çok kısa bir geçmişi olan leptospiral enfeksiyonlar konusunda birçok ülkede yoğun çalışma ve araştırmalarla bu zoonoz hastalığın bilinmeyen yönleri açığa çıkarılmakta; sanıldığından da yaygın olan bu enfeksiyonun tırmanış halinde olduğu görülmektedir. Epidemiyolojisinin oldukça karışık ve leptospiralardan bilinen genel mikrobiyolojik yöntemlerle inceleme olanakları olmadığından çoğu kez insan ev hayvanlarda ikterik, anikterik ve de subklinik olarak seyir eden bu hastalık, gripal enfeksiyonlarla karışmakta kesin olarak teşhis edilmeleri mümkün olmamaktadır.

Yurdumuzda hayvanlarda seyreden leptospira enfeksiyonları üzerinde yapılan araştırmalara, 1950 senesinden sonra rastlanmaktadır. 1954'de Özgen ve Tunus sığırlarda ilk olarak leptospira bovis suşunu Ankara'nın Kalecik kazasından izole ederek, Türkiye'de leptospira enfeksiyonunun gerçek kanıtını ortaya koymuşlardır. Bundan sonra yapılan serolojik ve kültürel bir çok çalışma ile Türkiye'de leptospirosis yaygınlığı ile milli ekonomimize yaptığı olumsuz etkiler daha iyi anlaşılmıştır.

Evcil hayvanlarda meydana getirdiği leptospira enfeksiyonlarına karşı birçok ülkede çeşitli koruyucu aşılar geliştiril-

miştir. Jiran ve arkadaşları (10). *Leptospira Grippotyphosa*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. sejro* ile trivalent, ısı ile inaktive bir aşı hazırlayarak, bu aşığı distemper ve viral hepatitle birleştirerek köpek ve atlarda mikro aglutinasyon M.A testi ile immun antikorları tesbit etmişlerdir. Hanson ve ark. (9) *L. grippotyphosa* ile hazırladıkları aşığı 3600 domuz ve 1000 den fazla sığır üzerinde denemişler; aşıları hayvanlarda termik ve zararlı bir durum gözlenmediği gibi devam eden yavru atmalarında kesildiğini saptamışlardır. Petrov ve Bezborodkin (15) çalışmalarında hazırladıkları leptospira aşısını swine fever ve eryspelas aşıları ile kombine şekilde domuzlarda denemişler, M.A testle 1/400 titrede antikor ile baby hamsterlerde protektif antikorların bulunduğunu bildirmektedirler. Babudieri, ve ark. (2, 3) *L. grippotyphosa* ile hazırladıkları monovalent formollu bir aşı ile sığırlarda kafi derecede immun antikor husule geldiğini göstermişlerdir. Yine Fish ev Kingscote (8), avirulan canlı *L. pomona* kültürü ile genç dişi domuzlarda düşük titrede epruvasyona dayanıksız, geçici bağışıklık elde ettiklerini bildirmektedirler. Nowakowski ve ark. (13, 14). M 20 *L. icterohaemorrhagiae* ve *L. canicola* suşu ile bivalent bir aşı hazırlayarak, domuz ve köpeklerde yaptıkları M.A. ve passif pritection testler sonucu yüksek titrede antikor bulmuşlardır. Son yıllarda monovalent yerine polyvalent aşular ile kombine aşular yapılarak uygulamaya konulmuştur. Cacchione ve ark. (6). *L. Ballum*, *L. canicola* ve *L. icterohaemorrhagiae* suşları ile hazırladıkları 2×10^8 ml. organizma ihtiva eden polyvalent bir aşı ile köpek ve kobaylarda aşılamaı takiben, her serotipe karşı M.A. testi ile 1/200-10.000 aglutinasyon titresini gösteren durumları tesbit ettiler. Bey ve Jhonson (4, 5) beş ayrı leptospira suşu ile hazırladıkları aşığı sığırlarda ve köpeklerde aşılamaı takiben 2,5 yıl boyunca kan serumlarındaki antikor seviyesini M.A ve *Leptospira* Aktivite (L.A) test ile araştırmışlar, köpeklerde pasif protektif test ile bağışık antikorlar tespit emişlerdir. Dünyanın gelişmiş ülkelerinde formol, fenol ve ısı suretiyle inaktive aşular ile doku kültüründe üretilmiş liyofilize attenuue aşular kullanılmaktadır (4, 5, 6, 9, 10). Bu aşuların çeşitli evcil hayvanlarda post vaksinal bağışıklığın değerlendirilmesinde.

1 — Mikro aglutinasyon test (M.A)

2 — *Leptospira* aktivite test (L.A)

3 — Aktif protective test (A.P.T)

4 — 'Pasif Protective test (P.P.T) gibi

testler kullanıldığı gibi zaman, zaman complement fixation 'CF), rapid makroskopik aglutinasyon test, sensitize eritrosit-lizis testi (SEL) Fluorescent antikor testi (FAT) ve indirect hemagglutination testleri de kullanılmaktadır. Bu saydığımız testlerin bir çoğu aynı zamanda serolojik tanıda da kullanılmaktadır (2, 6).

Ülkemizde son yıllarda önemli ekonomik kayıplara neden olan leptospira enfeksiyonlarına karşı, etkili bir aşı hazırlamak amacı ile birlikte leptospiral enfeksiyonlarının klinik bakımından sık, sık karşılaşılan basiller icterohaemoglobinuriae piroplasmosis, (Babesiose) theileriosis, nebati ve madeni zehirlenmeler ile benzer diğer bazı hemolitik ikterleri meydana getiren birçok sebeplerden soyutlanarak yurt çapında yaygınlığını ke sin olarak belirlemek amacı ile M.A testi uygulamaları yapılmaktadır.

METERYAL ve METOT

Leptospira aşısının hazırlanması için sıvı kültür vasatlarından Chang besi yeri, beşer litrelik iki damacanaya toplam 10 litre olarak hazırlandı (3).

Chang vasatına daha evvel hazırlanmış olan sığır karaciğer ekstraktından litreye 3,5 ml., phenol red solusyonundan 1 ml. Ayrıca % 10 hesabıyla taze tavşan kan serumu vasata ilâve olunarak, 56°C de iki gün birer saat benmaride inaktive edildi. Sterilite kontrolü için 37°C'lik etüvde 4 gün bırakıldı.

1. — Aşı Suşu

Ankara'nın Haymana kazasının, Kavurmacı çiftliğinden 1979 yılı yazında bir sığırdan laboratuvarımızca izole edilen leptospira grippotyphosa serogrubuna dahil immun antigen özelliğine sahip patojen bir suştur. Suşun identifiyesi tip spesifik hyper immun serumlarımızla laboratuvarımızca yapılmış olup, ayrıca Enstitü Pasteur referans leptospira laboratuvarı tarafından L. grippotyphosa sero grubundan olduğu kanıtlandı. Bu suşun patojenitesi, hamsterlerde haftada bir pasaj edilmekle ep-rüve suşu olarak devam ettirilmektedir.

2 — Aşı Tohum Germinin Tüplerde, Erlenlerde ve Damacanalarda Üretimi

Hamsterden geçirilen Haymana aşı suşu tohum kültürü olarak sırası ile tüplerde, erlenlerde ve damacanalarda 7-10 gün üremeyi takiben üreme ve kontaminasyon durumları karanlık saha mikroskobunda muayene edildi.

Anderson ve ark. (1) Leptospiraları agar katılmış katı besi yerinde de üretmişlerde sıvı besi yeri kadar yoğun bir üreme elde edilememekte olduğunu bildirmektedirler. Kida ve Ishii (11) dört leptospira suşu ile hazırladıkları aşığı tavşan serumlu ve kimyasal vasat olmak üzere ayrı iki ortamda hazırladıklarını ve kimyasal vasatın daha pratik olduğunu belirtmişlerdir. Riedeman ve Zamora (16) korthof vasatına tavşan serumu yerine sığır amnionmayii kullanmışlardır. Bu çalışmada aşı üretme vasatı olarak % 0,05 oranında B₁₂ vitaminini katılmış Chang sıvı besi yerini kullandık.

3 — Aşı Damacanalardaki Üreyen Kültürlerde Leptospira Germ Sayısı

Üremiş olan kültürlerde leptospira adedini tesbit etmek için PETROFFHEUSER L. HELLER ve counting chamber adı verilen THOMA özel lamaları ile belirli oranda sulandırılan kültürlerde leptospira adedi aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Laboratuvarımızda sayım için NEUBAUER LAMI (Haemocytometer) kullanıldı (3).

Canlı germeleri saymak güç olacağından ve kültürü formolle inaktive edeceğimizden sayımdan evvel % 37'lik polyme-rize olmamış saf formolden aşı kültürlerine % 0,05 hesabıyla formol katılarak, damacanalarda derecesinde en az iki saat bekletildikten sonra sayıma geçildi. 5 büyük karede sayılan germ adedi $\times 10.000 = 1 \text{ mm}^3$ deki germ sayısı.

4 — 1/10.000 Merthiolet'li fizyolojik tuzlu su hazırlanarak leptospira germelerini filtrasyondan sonra yıkamada, süspansiyon haline getirmede ve aşının sulandırmasında kullanıldı (3).

5 — Filtrasyon ve İnaktif Aşı Süspansiyonunun Elde Edilmesi

18 saat % 37'lik formolle inaktive edilen ve sayımı yapı-

muş 10 litrelik kültürü, camdan özel olarak yapılmış Type sm. 11305-0,65 gözenekli sartorius filtre kâğıdı takılı steril cihazdan süzdük. Cihaz iki kısımdan ibarettir alt ve üst kısımlar diye. Her ikisi de camdan birer fanus şeklindedir. İkisinin arasında filtre kâğıdı ve üzerinde ipek kumaşla birlikte 5 mm. çapında kafi miktarda cam boncuk ile filtre kâğıdının altında destek görevi yapan delikli metal disk bulunmaktadır. Alt ve üst cam fanusu arasındaki filtre sistemini bir çok metal mandallar tespit etmektedir. Bu şekilde hazırlanan steril cihaz, bir erlenmayere takıldı. Bir motor-pomb yardımı ile negatif basınç sağlanarak, süzme işlemine geçildi. Cihazın altına takılan erlenmayere kültürün sıvı kısmı tamamen geçene kadar bu işlem sürdürüldü. Erlenmayerde toplanan filtrat'tan bir numune alındı ve karanlık saha mikroskobu altında muayene olundu, leptospira görülmedi. Üst kısım fanusta filtre yüzeyinde toplanan ölü kültür üzerine hesap edilen miktarda yıkama sıvısı ilâve edildi. Ve her ilâveden sonra cihaz eller arasında yeter şiddetle çalkalandı. Her çalkalanışı takiben cam boncuklar yardımı ile yıkanan germeleri havi süspansiyon cihazın diğer borusundan steril bir erlenmayere aktarıldı. Bu yıkama işlemi 6-7 defa tekrarlandı. Bu yıkama sonucu parçalanarak toplanan germeler ve yıkama sıvısı sayesinde 4.500 ml. kadar süspanse bir aşı materyali elde olundu. Bu aşı materyali + 4°C de buzdolabında saklandı.

6. — Aşının Sterilite Kontrolü

Elde olunan aşidan sırası ile,

- a — Buyyona,
- b — K. ciğerli buyyona,
- c — Kanlı agar'a (aerob ve anaerob),
- d — Litman oxgall agar, Mycobiotic agar ve Sabourod's mantar vasatlarına,
- e — Chang ve Feltcher vasatlarına ekimler yapıldı.

96 saat besi yerleri 37°C de bekletildi bu müddet sonunda hiçbir üreme gözlenmedi.

7. — Bağışıklık Denemelerinde Kullanılacak Hayvanlarda Tabii Seroaglutininlerin Araştırılması

Bağışıklık denemelerinde kullanılacak olan deneme hayvanları,

Keçi : 4 baş sağlıklı ahırdan alınmıştır 40 kg. ağırlığında,

Tavşan : 6 Adet sağlıklı elavajdan beyaz, ağırlık 350-450 gr.

Kobay : 6 Adet sağlıklı elavajdan beyaz, ağırlık 200-250 gr.

Hamster : 12 Adet sağlıklı elavajdan (syriz golden) ağırlık 60-65 gr.

Hamster hariç diğer üç tür deney hayvanlarından kan alındı. Serumlarında mikro aglutinasyon testle (M.A) tabii seroaglutininler arandı. Negatif veren hayvanlar aşılannmaya alındı.

8 — Dozlar

Keçiler için 2 ml. tavşanlar, kobaylar ve hamsterler için 1 ml. aşı dozu tatbik edildi.

9 — Aşı Süspansiyonu

Formolle öldürülmüş leptospira grippotyphosa serogrubundan yerli bir suş olan Haymana suşu ile hazırlanmış 1.5×10^{-9} /ml. germ bulunan monovalent bir aşıdır.

10 — Aşılama Yolu

Aşı tüm hayvanlara deri altı yolla verildi.

11 — Aşılama ve Bağışıklık Denemeleri

Aşı denemeleri, 1 nolu tabloda gösterildiği şekilde yürütülmüştür. Aşılamadan sonra 21 gün, hamster hariç her üç tür hayvanında dereceleri sabah akşam olarak kontrol edildi. Aşılamadan 21 gün sonra hayvanlardan kan alınarak serumlarında M.A testi ile immun antikorlar arandı. Tablo 2'deki sonuçlar alındı. Tavşan, kobay ve hamsterler 21 günlük bağışıklık periyodunun tamamlanması ile beraber, daha evvel her üç nevii hayvan üzerinde ayrı aydı % 50 letal dozu (LD_{50}) tespit edilmiş olan homolog patojen haymana suşunun 1.000 LD_{50} si ile üç grup deneme hayvanı da eprüve edildi. Neticeler 1 nolu tabloda gösterilmiştir.

BULGULAR VE SONUÇ

Aşı Kültürümüzde Germ Miktarının Tesbiti

10 günlük üremeyi takiben germ asyımında Neubauer lamında beş büyük kare sayıldı. (Her büyük karenin içinde 16 küçük kare bulunmaktadır.) Böylece $16 \times 5 = 80$ küçük kare sayılmış oldu. Beş büyük karede toplam 67 adet leptospira germi sayıldı. Bu formülde yerine koyduğumuzda $67 \times 10.000.000 = 670.000.000/1$ ml. Aşı kültürümüzdeki germ sayısı bulunmuş oldu. (Ard, arda yapılan sayımlar arasında 200.000'e kadar varan farklılıklar normal kabul edilmiştir.)

1/10.000 Merthioletli, Fizyolojik Tuzlu Sulu Yıkama Solüsyonunun Hesaplanması

Daha evvel sayımını yaptığımız kültürümüzde 670.000.000/ml. germ bulunmuştu. Toplam kültürümüz 10 litre olduğuna göre $10.000 \times 670.000.000 = 67 \times 10^{11}$ adet germ bulunmaktadır. Aşımızın ml. de $1,5 \times 10^9$ adet leptospira germi bulunması gerektiğinden tüm kültürdeki toplam germ sayısını ml. de istenen

$$6.700.000.000.000$$

germ sayısına bölündü. $\frac{6.700.000.000.000}{1.500.000.000} = 4.466$ ml. dir. Bunun-

$$1.500.000.000$$

da 1/10'u olan 446,6 ml. 1/1.000 merthioletli su 9/10 ise 4019,4 ml. fizyolojik tuzlu su olarak bulundu.

Bağışıklık Denemeleri

Sıvı kültür vasatı Chang'de üretilen formolle inaktive monovalan aşımızın keçi, tavşan, kobay ve hamsterlerdeki bağışıklık denemeleri (1 nolu tablo) sonuçlarını incelediğimizde 6 adet tavşanın aşılardan 21 gün sonra 6 adet aşısız kontrol tavşanla birlikte yaptığımız eprüvasyonda, aşımızın koruması tavşanda % 84,5 kobayda % 69, hamsterlerde % 83,4 eprüvasyon yapamadığımız 4 adet keçide ise, 2 nolu tabloda gösterildiği şekilde M.A testi sonucu keçilerin ikisinde 1/100 titrede antikor bulunmasına rağmen diğer iki keçide negatif sonuç alınmıştır (% 50). Tavşanlarda ise 1/200 - 1/1600 titrede müsbet birinde ise negatif bulunmuştur. Kobaylarda ise 1/100 - 1/800 titreye varan müsbet duruma rastlandı. Aşılardan sonra 1/100 titrede antikor tesbiti bağışıklığın teşekkülüne yeterli görülmek-

tedir (2). (APT yapıldığından PPT yapılmamıştır. Bağışıklık testlerine paralel olarak aşının zararsızlık testleri de birlikte yapıldı.)

Aşının Zararsızlık Denemeleri

İki adet yetişkin kobaya aşından 5 şer ml. deri altı enjekte edildi. Ayrıca denemeye aldığımız her grup hayvan üzerinde aşının zararsızlık kriterleri aşağıdaki sonuçları vermiştir:

a — Aşılı hayvanların, aşılamaı takiben 21 gün boyunca sabah akşam dereceleri alınmış olup, hayvanların hiç birinde hipertermi olayı ve enjeksiyon yerinde bir ödem, hassasiyet tespit edilmemiştir.

b — Aşılı hayvanların vücut ağırlıkları normal olarak aynı kalmış olup, çok az ağırlık artışı saptanmıştır.

c — Aşılı hayvanlardan hiç birisi *Leptospira* eneksiyonundan ölmemiştir.

Eprüvasyondan Sonra Aşısız Kontrol Hayvanlardaki Gözlemler

a — Üç tür kontrol hayvanlarında 40-41°C dereceye çıkan hipotermi ile bazen 36°C bulan bir hipotermi takip etmiş, arkasından şiddetli ikter ile birlikte 7-10 gün arasında ölümler görülmüştür.

b — Bütün aşısız kontrol hayvanlarda, ikterohemorrajik lezyonlar görülmüştür. Tüm vücut zarları, mukoz membranlar ikterik, burun kanaması, akciğerler, sindirim sistemi ve mezenteriumda şiddetli konjesyon. Hepato splenomegali böbreklerin solgun ve hafifçe büyümüş olduğu gözlenmiştir. Hemorajik lezyonlar hamsterlerde çok açık olarak bulunmuştur. Tavşanlarda ise ikterik tablo hâkim görülmüştür. Yapılan bütün denemelerde aşılanan keçilerde % 50, tavşanlarda % 84,5 kobaylarda % 69 oranında bir bağışıklık sağlandı.

T A R T I Ş M A

Meydana getirdiğimiz *leptospira* aşısında aşı suşu olarak patojen yerli bir suş kullandık. Babudieri ve ark (2). *Leptospira*

aşlarında patojen suşların antijenik özelliklerinin yüksek olması, bağışıklıkta en önemli faktör olduğunu belirtmişlerdir. Patojen Haymana suşu hamsterlerde pasaj suretiyle idame ettirilmekte ve patojenitesi hamsteri 7 gün içerisinde öldürecek şekilde stabil hale gelmiştir. Aşı için kültürün üretilmesinde Chang vasatı bilhassa seçildi (3). Hazırlanışı kolay, bileşimindeki kimyasal maddeler hemen hemen her bakteriyoloji laboratuvarında bulunmaktadır. Kida ve ark. (11). Biri tavşan serumlu vasatda diğeri tavşan serumsuz hazır kimyasal vasat olan shenbergde üretilen iki aşı kültürü hazırladıklarını vasat olarak shenbergi tercih ettiklerini bildirmektedirler. Morris ve ark. (12). Aşılı hayvanlara ribosom ekstraktı vererek bağışıklığı teşvik etmişlerdir.

Fin ve Jenkin (7) L. Patoc ve L. canicola suşlarını hücre kültüründe ürettiklerini bildirmişlerdir. Bazı araştırmalarda vasata tavşan serumu yerine sığır amnion mayii katmışlardır (16). Bizde vasatımızda % 0,05 oranında B₁₂ vitamini ilâve ettik ve iyi netice aldık. (670 x 10⁶/ml. üreme elde olundu). Köpeklerde denenen polyvalan bir leptospira aşısının 1/40-160 titrede antikor husule getirdiği bildirilmektedir (13). Yine domuz ve sığırlarda denenen bir aşının 1/400 titrede antikor müsbet devam eden yavru atmalarında hemen kesildiğinden bahsetmektedir (9, 14). Laboratuvarımızca hazırlanan numune aşımız keçilerde 1/100 titrede antikor verdiğini saptadık. Cacchione ve ark. (6) hazırladıkları polyvalan bir aşı ile köpek ve kobaylarda 1/200-1/1.000 titreye varan bağışıklık kriteri bulduklarını ifade etmişlerdir.

Aşımız kobaylarda 1/100-1/800'e varan titrede antikor pozitif bulundu. Köpek yavrularında denenen başka bir aşıda da pasif protektive test sonucu yüksek titrede antikor bulunduğundan bahsedilmektedir (5).

Fish ve Kingcote (8) hazırladıkları avirulan bir aşı ile genç dişi domuzlarda aşılama sonrası aktif protektif test olumsuz bulunmuştur.

Aşımızla aşılı tavşan, kobay ve hamsterlerde aşılama sonrası yapılan A.P.T. sonucu % 70'in üzerinde aynı hayvanların M.A test sonucu kan serumlarındaki antikor titreleri de diğer

araştırcılara ait sonuçlara paralellik göstermesi dikkate değer bulundu.

Deney hayvanlarında yaptığımız M.A test sonuçları ile A.P.T. sonuçları birbirine yakın değerlerde bulunmuştur (2).

Nowakowski ve ark. (14) hazırladıkları monovalan bir aşıyı domuzlarda 15 gün ara ile yapılan rapel aşılama sonucunda bağışıklığın daha güvenilir olacağından bhsedilmektedir.

Aşının onbeş gün ara ile iki kere uygulanması ilerideki çalışmalarımızda denenmesi gereken hususlardandır.

Ö Z E T

Bu alışma ülkemizde uzun zamandır eksikliği duyulan leptospirosis hastalığına karşı bir aşı hazırlamak için yapıldı. Aşımızda Ankara - Haymadan izole ettiğimiz, patojen L. grip-potyphosa sero grubundan yerel haymana suşu kullanıldı.

Aşı retimi B₁₂ vitamini katılmış Chang vasatında yapıldı. retimden sonra % 0,05 formolle inaktive edildi.

Aşı szldkten sonra $1,5 \times 10^{-9}$ germ olacak şekilde % 0,01 lik merthioletli fizyolojik tuzlu su ile sulandırıldı. Aşı monovalan, formolle inaktive edilmiş bir aşıdır. Sterilite kontrolunda aşınan saf ve temiz olduğu saptandı. Bağışıklık testlerinden M.A testi ile keçi, tavşan, kobayların kan serumları işlendi. Yeterli seviyede immün antikörler bulundu. Aynı hayvanlarda aktif protektif test uygulandı. % 69 - % 84,5 arasında bağışıklık sağlandı.

Çizelge : 1. a) KEÇİ, TAVŞAN, KOBAY ve HAMSTERLERDE YAPILAN AŞILAMA ve DENEYLER

Aşılana Hayvanın Nevii	İnokule Edilen Aşının Cinsi	Germ Yoğunluğu/ml.	Aşının Dozu ve Enfeksiyonlu Yolu	Aşılana Hayvan Sayısı	Aşısız Kontrol Hayvan Sayısı	Bağışıklık Testleri
Keçi	Formolle inaktive L. Grippyphosa serogrubundan Haymana suşu ile hazırlanmış mono-valent aşı	$1,5 \times 10^{-9}$	2 ml. (Subcutan)	4	—	Aktif protektif test (A.P.T.) yapılmadı. M.A testi yapıldı. İki keçide 1/100 titrede pozitif iki keçi negatif bulundu % 50
Tavşan	» »	$1,5 \times 10^{-9}$	2 ml. (» »)	6	6	M.A ve A.P.T. yapıldı.
Kobay	» »	$1,5 \times 10^{-9}$	1 ml. (» »)	6	6	M.A ve A.P.T. yapıldı.
Hamster	» »	$1,5 \times 10^{-9}$	1 ml. (» »)	12	12	M.A ve A.P.T. yapıldı.

b) TAVŞAN, KOBAY ve HAMSTERDE A.P.T. SONUÇLARI

(APT) Eprüve Edilen Hayvanın Nevii	Eprüvasyon Dozu ve Dilusyonu	İnokulum Miktarı	Verilme Yolu	Aşılı Hayvan Miktarı	Ölen	(Kontrol) Aşısız Hayvan Miktarı	Ölen
Tavşan	Patogen Haymana Suşunun $1000 LD_{50} - 10^{-2}$	1 ml.	Deri altı	6	1	6	4
Kobay	$1000 LD_{50} - 10^{-2}$	1 ml.	Deri altı	6	2	6	4

**Çizelge : 2. DENEY HAYVANLARINDA YAPILAN MİKRO
AGLUTİNASYON TEST (MA) SONUÇLARI (*)**

a) Keçilerde :

Keçi Kan Serumları No:	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600
1	++	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—
4	++				

b) Tavşanlarda :

Tavşanların Kan Serumları	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200
1	+++	++	—	—	—	—
2	+	—	—	—	—	—
3	++++	+++	++	++	—	—
4	++++	++++	+++	++	—	—
5	++++	++++	+++	++	+	—
6	++++	++++	+++	++	+	—

c) Kobaylarda :

Kobay Kan Serumları	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200
1	++++	+++	++	++	—	—
2	++++	++	+	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—
4	+++	++	+	—	—	—
5	+	—	—	—	—	—
6	++	+	—	—	—	—

(*) Yapılan M.A testinde antijen olarak chang vasatında üretilmiş 7 günlük taze Haymana suşu kullanılmıştır.

S U M M A R Y

STUDIES ON THE PREPARATION AND ANTIGENICITY OF THE VACCINE AGAINST LEPTOSPIROSIS

Ali Altan BULU

Chief of the leptospira Lab. Etlik Veterinary
Control and Research Institute
ANKARA - TURKEY

The vaccine was prepared from *Leptospira grippotyphosa* Haymana strain which was isolated by the author from Haymana - Ankara.

The culture was grown in Chang's medium supplemented with vitamin B₁₂ for 9 days.

Formolin (37 %) was added in the ratio of 0,05 % after harvesting the culture. The number of the leptospira organisms were counted with a haemocytometer and the culture was filtered through types SM, 11305-0,65 pore size sartorius membrane.

Leptospira organisms on the filter membrane were collected into a steril flask at concentration of $1,5 \times 10^9$ /ml. with saline solution containing 0,01 % merthiolate.

The monovalent vaccine was produced from Haymana-strain. (*L. grippotyphosa*) purity of the vaccine was ascertained in nutrient broth, blood agar (aerobic and anaerobic). Fletcher's agar, Chang medium, Littman Oxgall agar, mycobiotic agar and Sabourod's medium.

Safety of the vaccine was checked in goats, rabbits, guinea pigs and hamster.s

Innocuity of the vaccine was also checked by inoculating two guinea pigs with 5 ml. of the vaccine.

For untowards reaction vaccinated animals were observed for a period of 21 days. At 21 post vaccination day blood samples from the tes animals were tested by micro agglutination Lysis test. and titres were as follows :

Two goats 1/100, one rabbit 1/200, two 1/800, two 1/1600 and guineo-pigs 1/100 - 1/800.

The efficeacy of the vaccine was tested by challenging vaccinated and 12 control hamsters at 21 post vaccination day with a virulent strain of *L. grippityphosa*.

All of the control hamsters died within 14 days wheras the vaccinated animals survived.

L I T E R A T Ü R

- 1 — **Anderson, L. E., Jenkin H. M., 1972.** Estimation of leptospiral viability with agar pour plates. *Am. J. Vet. Res.*, 33 (12), 2487-2592.
- 2 — **Babudieri, B., Bussinello, E., Bajocchi, E., Salvi, A., Massa, L., 1955.** Studi sulla lespirosi delle riasie della valle padana Ricerche epidemiologiche profilassi vachinale. *Riv. Infort.*, 42, 453.
- 3 — **Babudieri, B.,** Leptospira aşı protokolu.
- 4 — **Bey, R. F., Johnson, R. C., 1978.** Hummoral immun responses of cattle vaccinated with leptospiral pentavalent outer envelope and whole culture vaccine *Am. I. Vet. Res.*, 39 (7), 1109-1114.
- 5 — **Bey, R. F., Johnson, R. C., 1978.** Humoral immune response of dogs vaccinated with leptospiral pentavalent outer envelope and whole culture vaccines. *Am. J. Vet. Res.*, 39 (5), 831-836.
- 6 — **Cacchione, R. A., Saravi M. A., Cascell, E. S., Martinez, E. S., 1977.** Trivalent vaccine against canine leptospirosis I. serological responses and laboratory tests) *Revista de medicina veterinaria, Argentina* 58 (5/6) 419-422, 425 Ref.: *Vet. Rull.* 1979. 316-2433.
- 7 — **Finn, M. A., Jenkin H. M., 1972.** Cytopathic effects of leptospira serotypes patoc and canicola in threekidney cell culture systems. *Am. J. Vet. Res.*, 34 (5), 669-672.
- 8 — **Fish, N. A., Kings Cote, B., 1973.** Protection of gilts leptospirosis by use of a live vaccine. *Canadian Veterinary Journal* 14 (1), 12-15.
- 9 — **Hanson, L. E., Tripathy, D. N., Killinger, A. H., 1972.** Current Status of leptospirosis immunization ins Swine and cattle *journal of the American Veterinary Medical Association* 161 (11), 1235-1243.
- 10 — **Jiran, E., Kadlec, V., Svatos, L., 1972.** A freeze-dried trivalent vaccine against canine leptospirosis *Veterinarni Medicina.* 17 (6), 367-377. Ref.: *Vet. Bull.* 1973, 7, 69.
- 11 — **Kida, H., Ishu, T., Tsunehisa, Y., Yamamoto, S., Yanagava, R., 1977.** Comparison of vaccines prepared from leptospire grown in a serum medium and in a chemically defined medium. *Zentralblatt für Bak-*

- teriology parasitenkunde, infekitions krank heiton and Hgiene Erste Abteilung originale 238 A (1) 86-96
- 12 — **Morris, J. A., Orr, H. S., 1979.** Immunity induced hamters vaccinated with a ribosome extract of leptospira inter organs serogrup icterohaemorrhagiae. Journal of Biological Standardization 7 (1), 81-87 U. K.
 - 13 — **Nowakowski, J., Orzechowska-Kulawczuk, M., 1977.** Immunogenicity of vaccines against. Leptospirosis in dogs Mdcyna Weterynaryjna 33 (9), 524-526.
 - 14 — **Nowakowski, J., Orzechowska-Kulawczuk M., Majdan, S. 1977.** Agglutinin and protective antibodies in pigs vaccineted with monovalent vaccines against leptospirosis. Medycyna Weterynarjna 33 (8), 455-458.
 - 15 — **Petrov, V. F., Bezborodkin N. S., 1972.** Dynamics of formation of immunity to leptospirosis in pigs inoculated with combined vaccine against swine fever. Erysipelas and leptospirosis 25, 7-10 (Ru). Vet. Inst. Ul. Lenina. Vitebsk Belorusskaya SSR. Ref.: Vet. Bull. 1973. 216-2487.
 - 16 — **Riademann, S., Zamora, I., 1977.** Bovine amniotic fluid as a substitute for rabbit serum in the culture of leptospirosis. Revista Latin Americana de microbiologia 19 (2), 83-86 Chile. Ref.: Vet. Bull. 1979. 401. 3090.