

в) 0,03 %-ный раствор сульфата меди: сульфат меди ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ) — 0,3 г, деионизированная вода — до 1000 см<sup>3</sup>;

г) 0,04 %-ный раствор сульфата цинка: сульфат цинка ( $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) — 0,4 г, деионизированная вода — до 1000 см<sup>3</sup>;

д) 0,2 %-ный раствор тиамин гидрохлорида: тиамин гидрохлорид 0,2 г, деионизированная вода — до 1000 см<sup>3</sup>.

Полную среду готовят путем розлива основной среды в контейнеры и последующего добавления буферного раствора альбумина. Основную среду хранят не более одного года, буферный раствор альбумина — не более 6 мес.

#### 2.2.2.10. Приготовление твин-альбумин сывороточной среды Эллиса

Для приготовления среды используют:

воду дистиллированную по ГОСТ 6709;

цинк сернокислый по ГОСТ 4174;

кальций хлористый по ГФХ;

глицерин;

аммоний хлористый по ГОСТ 3773;

витамин В<sub>12</sub>;

тиамин;

магний сернокислый по ГОСТ 4523;

железо сернокислое по ГОСТ 4148;

твин-80;

твин-40;

5-флюорацил;

кислоту нилидиксовую;

альбумин бычий;

лактальбумин-гидролизат Дифко;

магний хлористый по ГОСТ 4209;

натрия гидроокись по ГОСТ 4329;

сыворотку кроличью;

натрий фосфорнокислый по ГОСТ 245;

калий фосфорнокислый по ГОСТ 4198;

натрий хлористый по ГОСТ 4233;

аммоний хлористый по ГОСТ 3773;

агар-агар.

Среду готовят следующим образом:

а) стерилизуют дистиллированную воду по 100 см<sup>3</sup> и готовят исходные растворы каждый отдельно: сульфат цинка ( $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) — 0,4 г, хлорид кальция ( $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) — 1,0 г, глицерин — 10,0 см<sup>3</sup>, хлорид аммония ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) — 25,0 г, витамин В<sub>12</sub> — 0,02 г, тиамин — 0,5 г, сульфат магния ( $\text{MgSO}_4$ ) — 0,3 г. Растворы хранят при  $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$  до 30 сут;

б) перед употреблением готовят следующие растворы в дистиллированной воде: сульфат железа ( $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ) — 0,5 г на 100 см<sup>3</sup>, твин-80 — 20 см<sup>3</sup> на 180 см<sup>3</sup>, твин-40 — 20 см<sup>3</sup> на 180 см<sup>3</sup>,

5-флюорацил — 1,0 г на 100 см<sup>3</sup>, нилидиксовая кислота — 1,0 г на 100 см<sup>3</sup>;

в) основную часть среды готовят растворением 10,0 г бычьего альбумина, 1,0 г лактальбумина-гидролизата Дифко в 50 см<sup>3</sup> стерильной дистиллированной воды. Размешивают до полного растворения и добавляют исходные растворы: тиамин — 1 см<sup>3</sup>, хлорида кальция — 1 см<sup>3</sup>, хлорида магния — 1 см<sup>3</sup>, сульфата цинка — 1 см<sup>3</sup>, сульфата магния — 0,1 см<sup>3</sup>, сульфата железа — 10 см<sup>3</sup>, витамина В<sub>12</sub> — 1 см<sup>3</sup>; твина-80 — 9 см<sup>3</sup>, твина-40 — 3—5 см<sup>3</sup>. Перемешивают в течение 1 ч до полного растворения компонентов, устанавливают рН — 7,4 добавлением 10 %-ного раствора гидроокиси натрия. Добавляют дистиллированную воду до 96 см<sup>3</sup> и 4 см<sup>3</sup> кроличьей сыворотки свежевзятой и инактивированной при 56 °С в течение 30 мин, 20 см<sup>3</sup> флюорацила и 20 см<sup>3</sup> раствора нилидиксовой кислоты.

Для получения 1 дм<sup>3</sup> готовой к использованию среды в 988 см<sup>3</sup> дистиллированной воды растворяют гидроортофосфат натрия (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> — 1 г, дигидроортофосфат калия (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) — 0,3 г, хлорид натрия (NaCl) — 1 г, хлорид аммония (NH<sub>4</sub>Cl) — 1 см<sup>3</sup>, глицерин — 1 см<sup>3</sup>. Размешивают до полного растворения, устанавливают рН — 7,4. Удаляют 140 см<sup>3</sup> среды, добавляют 1,5 г очищенного агара и стерилизуют при 121 °С в течение 20 мин, охлаждают до 55 °С и вносят 140 см<sup>3</sup> основной среды. Фильтруют через мембранные фильтры под давлением (0,22 микрон) и разливают в пробирки.

#### 2.2.2.11. Приготовление усовершенствованной селективной среды для выделения лептоспир из контаминированного материала

Для приготовления среды используют:

- глицерин по ГОСТ 6259;
- кальций хлористый по ГФ X;
- магний хлористый по ГОСТ 4209;
- цинк серноокислый по ГОСТ 4174;
- среду жидкую основную твин-альбуминовую;
- натрий уксуснокислый по ГОСТ 199;
- альбумин сывороточный;
- витамин В<sub>12</sub> по ГФ X;
- магний серноокислый по ГОСТ 4523;
- медь серноокислую по ГОСТ 4165;
- твин-80;
- пируват натрия;
- агар-агар;
- железо серноокислое по ГОСТ 4148;
- актибион;
- бацитрацин;
- 5-флюорацил;

неомицинсульфат;  
 полимиксин В;  
 рифампицин;  
 сыворотку крови кролика.

Состав среды следующий: (грамм на 100 см<sup>3</sup>): глицерин — 0,10, хлорид кальция (CaCl<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O) — 0,016, хлорид магния (MgCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O) — 0,016, сульфат цинка (ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O) — 0,004, основная жидкая твин-альбуминовая среда — 2,3, В<sub>12</sub> — 0,00002, сульфат магния (MgSO<sub>4</sub>×4H<sub>2</sub>O) — 0,001, сульфат меди (CuSO<sub>4</sub>×5H<sub>2</sub>O) — 0,00015, твин-80 — 1,5, пируват натрия — 0,20, ацетат натрия — 0,10, сывороточный альбумин — 10,0, агар-агар — 1,0, свежеприготовленный сульфат железа (FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O) — 0,01, актибион — 0,10, бацитрацин — 0,04, 5-флюороурацил — 0,25, неомицин сульфат — 0,002, полимиксин В — 0,0002, рифампицин — 0,01 (антибиотики взяты в виде 10 %-ных растворов в 1 %-ном водном этаноле).

Смеси антибиотиков добавляют к питательной среде, содержащей 0,5—2 % сыворотки крови кролика и 0,1—0,3 % агара.

#### 2.2.2.12. Приготовление избирательной среды с 5-флюорацилом для выделения лептоспир

К плотной, полужидкой или жидкой среде добавляют 100—400 мг/см<sup>3</sup> 5-флюорацила.

#### 2.2.2.13. Приготовление плотной среды Кокса

Для приготовления питательной среды используют:

дистиллированную воду по ГОСТ 6709;

агар-агар по ГОСТ 17206;

пептон по ГОСТ 13805;

сыворотку крови кролика или барана;

гемоглобин.

Среду готовят следующим образом: к 900 см<sup>3</sup> дистиллированной воды добавляют 100 см<sup>3</sup> фосфатной буферной смеси Зоренсена, тщательно перемешивают, добавляют 10 г агар-агара и 1 г пептона и нагревают в водяной бане до их расплавления, разливают во флаконы и стерилизуют при 120 °С в течение 15 мин, охлаждают до 50—45 °С, добавляют 10 % инактивированной сыворотки крови кролика или барана и 1 % гемоглобина (гемоглобин готовят растворением 1 объема эритроцитов в 20 объемах дистиллированной воды с последующим фильтрованием через фильтр Зейтца), разливают в чашки Петри по 40 см<sup>3</sup>, выдерживают для проверки на стерильность 24 ч при комнатной температуре.

Допускается применение других питательных сред, обеспечивающих хороший рост и сохранение свойств лептоспир.

Сывороточные питательные среды предназначены для культивирования штаммов лептоспир, используемых в диагностических исследованиях и при изготовлении биопрепаратов, синтетиче-

ские — для выделения лептоспир, в основном серогрупп *Sejroe*, *Hebdomadis*, *Mini* из патологического материала и для разового получения расплодок при изготовлении вакцины, полужидкие — для сохранения штаммов лептоспир, длительного культивирования посевов из первичного материала, плотные — для очистки контаминированных штаммов, изучения диссоциации лептоспир.

#### 2.2.2.14. *Обработка стеклянной посуды, резиновых изделий*

Пробирки, колбы, флаконы, бутылки, сифоны из обычного стекла, не бывшие в употреблении, обрабатывают по следующей схеме:

промывают проточной водопроводной водой;

выдерживают в течение суток в 1 %-ном растворе соляной кислоты в стеклянной или эмалированной посуде;

промывают проточной водопроводной водой и помещают на 1—2 ч в мыльный раствор;

тщательно промывают проточной водой и ополаскивают дистиллированной водой;

заливают вымытую посуду дистиллированной водой и стерилизуют в автоклаве при 120 °С в течение 1 ч или выдерживают двое суток при комнатной температуре, ежедневно меняя воду;

сливают воду и посуду высушивают в сушильном шкафу;

закрывают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют в автоклаве при 120 °С в течение 30 мин.

Посуду из нейтрального стекла моют в мыльном растворе, промывают водопроводной и дистиллированной водой, сушат, закрывают ватно-марлевыми пробками и стерилизуют.

Посуду, в которой уже выращивали лептоспиры, помещают для дезинфекции на сутки в 1 %-ный раствор соляной кислоты, моют в мыльном растворе, затем в водопроводной и дистиллированной воде.

Стерильную посуду используют для расфасовки питательной среды в течение 10 сут. При более длительном хранении ее повторно стерилизуют.

Новые, не бывшие в употреблении, резиновые шланги промывают в проточной воде, кипятят в течение 30—45 мин в 2 %-ном растворе питьевой соды, промывают водопроводной водой и снова кипятят в дистиллированной воде 30—45 мин, затем просушивают.

Резиновые пробки обрабатывают по этой же методике

#### 2.2.2.15. *Приготовление препаратов для микроскопических исследований*

Препараты для микроскопических исследований готовят в виде раздавленной капли. Исследуемый материал наносят пипеткой или бактериологической петлей на предметное стекло и накрывают покровным стеклом, избегая образования пузырьков воз-

духа. На одном предметном стекле готовят две-три раздавленных капли.

Мочу исследуют непосредственно после взятия или после центрифугирования. Прозрачную мочу, не содержащую кристаллов солей, хлопьев, спермиев и других посторонних частиц, центрифугируют при 10000—12000 об/мин в течение 30 мин, сливают надосадочную жидкость, осадок ресуспендируют в оставшейся капле мочи и микроскопируют.

Мочу, содержащую значительное количество посторонних частиц, очищают центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин, затем сливают надосадочную жидкость и центрифугируют ее для осаждения лептоспир при 10000—12000 об/мин в течение 30 мин.

При бессимптомном течении лептоспироза суспензию ткани готовят из кусочков коркового слоя почки, а при остром течении, кроме того, из печени и других органов. У абортированного плода микроскопируют суспензию из всех органов.

Кусочки исследуемого органа массой 2—3 г растирают в ступке с 5—7 см<sup>3</sup> питательной среды, физиологического раствора или стерильной воды до получения гомогенной взвеси. Суспензию отстаивают в холодильнике 1—2 ч или центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин и микроскопируют надосадочную жидкость.

### 2.2.3. Проведение исследований

2.2.3.1. При проведении микроскопических исследований исследуемый материал микроскопируют в темном поле микроскопа при увеличении  $40\times 7-10$  или  $20\times 1,5\times 7$ , а для более детального рассмотрения препарата — при увеличении  $40\times 10-15$  или  $40\times 1,5\times 10$ .

В каждой капле просматривают не менее 50 полей зрения.

Наличие лептоспир устанавливают по следующим признакам:

Типичные лептоспиры представляют собой спиралеподобные тонкие серебристые нити, концы которых, оба или один, загнуты и булавовидно утолщены. Встречаются и бескрючковые формы лептоспир. Лептоспиры подвижны. В жидких средах обычными формами движения являются: вращательное, прямолинейное поступательное с одновременным вращением вокруг собственной оси и круговое.

В кислой моче с рН 5,0—6,0 лептоспиры быстро утрачивают подвижность и погибают. Некоторые мертвые клетки сохраняют форму, типичную для лептоспир, но у них по длине тела бывает видна зернистость, концевые крючки довольно часто распрямлены.

Лептоспиры дифференцируют от нитей фибрина, обломков хвостовых частей спермиев, разрушенных эритроцитов, спирилле-

вибриоподобных и других микроорганизмов, а у хряков и от интеспир.

2.2.3.2. Методом посева в питательные среды лептоспиры из крови животных выделяют в первые 5—7 сут болезни в период лихорадки. Для этой цели кровь из яремной вены или ушной вены вносят через стерильную иглу по 3—5 капель в 5—7 пробирок с питательной средой или высевают из пробы крови, присланной в лабораторию.

От трупа при диагностическом убое высевают пастеровской пипеткой кровь из сердца, ткани печени и почки, а от абортрованного плода, кроме того, и из содержимого желудка. При убое клинически здоровых животных высевают из почки и мочевого пузыря. Из каждого органа засевают 3—5 пробирок с питательной средой.

Для выделения культур из почки ее освобождают от капсулы, поверхность прижигают, пипетку вводят параллельно поверхности в корковый слой. Высев делают у крупного рогатого скота из 2—3 долей, у свиней — из нескольких участков почки.

Высевы из других органов делают пастеровской пипеткой, которой насасывают материал, предварительно прижигая поверхность органа шпателем.

Мочу, ликвор, околосоудный и брюшной транссудат и другие жидкие биосубстраты засевают по 1—3 капли в 3—5 пробирок с питательной средой.

Посевы культивируют при 28—30 °С в течение 3 мес. Лептоспиры, размножаясь в питательной среде, не изменяют ее внешнего вида. Поэтому для выявления роста лептоспир через 3, 5, 7, 10 и далее каждые 5 сут культивирования из всех пробирок микроскопируют капли, которые наносят на предметное стекло бактериологической петлей. Большинство культур вырастает через 7—20 сут.

Иногда лептоспиры обнаруживают в среде на 3—5-е сутки или через 1—2 мес и очень редко — через 2—3 мес культивирования.

Содержимое каждой пробирки, в которой обнаружены лептоспиры, пересевают в 3—5 пробирок со свежей питательной средой. Пробирки с обильным ростом посторонней микрофлоры выбраковывают, остальные пересевают на питательные среды с антибиотиками или лептоспиры подвергают очистке.

2.2.3.3. Выделенные культуры лептоспир идентифицируют с помощью лептоспирозных групповых агглютинирующих сывороток в перекрестной реакции микроагглютинации в соответствии с п. 2.1.1.2 и наставлением по применению агглютинирующих лептоспирозных сывороток, при необходимости в реакции иммуноадсорбции или методом моноклональных антител.

Пересевы культур лептоспир проводят пастеровскими пипетками.

В пробирку с 5—10 см<sup>3</sup> питательной среды вносят 0,5—1,0 см<sup>3</sup> культуры. Максимальное накопление лептоспир наблюдается через 4—7 сут культивирования при 28—30 °С.

Рост и чистоту культур лептоспир в жидких питательных средах контролируют микроскопически в темном поле микроскопа и макроскопически — просмотром пробирок с культурами в луче света от осветителя. При этом после встряхивания в питательной среде четко просматриваются муаровые волны, образуемые выросшей культурой.

Культуру лептоспир пересевают через каждые 12—15 сут не менее чем в три пробирки.

Штаммы лептоспир, постоянно поддерживаемые в лаборатории, хранят в пробирках под вазелиновым маслом, в запаянных ампулах, в морозильной камере при минус 60—70 °С или при температуре жидкого азота минус 196 °С. Лептоспиры консервируют любым из этих методов после выращивания в сывоточной среде до максимального накопления.

В пробирку на культуру наслаивают 1—1,5 см<sup>3</sup> стерильного вазелинового масла или культуру расфасовывают в стерильные ампулы из нейтрального стекла вместимостью 1—5 см<sup>3</sup> и запаивают. Хранят пробирки и ампулы в темном месте при комнатной температуре без пересевов в течение 3 мес.

Для хранения в замороженном состоянии культуры расфасовывают в ампулы, запаивают, охлаждают до 0—4 °С и помещают в сосуды Дьюара, заполненные азотом, или в морозильную камеру. В жидком азоте лептоспиры хранят без пересевов в течение года, при этом они заметно не изменяют биологических свойств.

Культуры лептоспир, контаминированные другими микроорганизмами, очищают биологическим методом, фильтрацией через бактериальные фильтры или пересевом на плотные питательные среды.

Для очистки биологическим методом загрязненную культуру вводят внутрибрюшинно морской свинке или крольчонку в дозе 1—2 см<sup>3</sup>, хомяку или мыши — 0,5 см<sup>3</sup>. Через 30—60 мин кровь из сердца зараженного животного высевают в пробирки с питательной средой, культивируют и ведут наблюдение, как указано выше.

Для очистки методом фильтрации загрязненную культуру фильтруют через асбестовые стерилизующие пластины марки СФ или свечи Шамберляна Л-5. Фильтрат рассеивают в 5—10 пробирок с питательной средой. В высевах из фильтрата получают чистую культуру лептоспир.

Очистку культур лептоспир на плотной питательной среде проводят рассевом исследуемого материала шпателем в несколько чашек Петри. Культуры лептоспир, обильно контаминированные

посторонней микрофлорой, разводят физиологическим раствором и из каждого разведения делают высев в чашки Петри на плотную питательную среду. Чашки заклеивают лейкопластырем и посеы культивируют при  $(28 \pm 1)$  °С. Колонии лептоспир появляются на 7—20-е сут культивирования в толще или у поверхности среды и имеют вид прозрачных мелких дисков с хорошо очерченными или размытыми краями, увеличивающихся в размере до 1—2 см или в виде матовых точек диаметром 1—2 мм. Колонии переносят пастеровской пипеткой или бактериологической петлей в жидкую среду и культивируют в термостате до появления роста.

2.2.3.4. Серовариантную принадлежность изоляторов лептоспир изучают в реакции иммуноадсорбции, для чего после установления серогрупповой принадлежности в перекрестной РМА определяют степень антигенного родства каждого испытуемого штамма со всеми штаммами-эталопами, входящими в состав данной серогруппы. Для этого с одной стороны исследуют испытуемый штамм со всеми агглютинирующими эталонными сыворотками данной серогруппы, с другой — антисыворотку к штамму-изоляту исследуют со всеми эталонными штаммами этой же серогруппы. Отбирают для сравнения с изучаемым штаммом в перекрестной реакции иммуноадсорбции штаммы-эталонные и антисыворотки с ним, реагирующие хотя бы с одной стороны на 10 % гомологичного титра.

Для проведения адсорбции штаммы выращивают во флаконах в течение 7—15 сут при 28—30 °С до накопления 80—150 лептоспир в поле зрения при увеличении микроскопа  $40 \times 1,5 \times 10$ . Культуру осаждают центрифугированием при 10000 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость сливают, осадок в каждом центрифужном стакане тщательно подсушивают и к осадку трехкратно с интервалом 10 мин добавляют 1 см<sup>3</sup> исследуемой сыворотки, предварительно разведенной физиологическим раствором 1:10, после чего пробирки плотно закрывают резиновыми пробками и выдерживают при 3—5 °С в течение 24 или 48 ч. Для использования в реакции иммуноадсорбции испытуемые сыворотки подводят к стандартному титру 1:3000 по отношению к гомологичной культуре. После выдерживания смеси в условиях рефрижератора лептоспиры осаждают центрифугированием при 10000 об/мин в течение 10 мин, получают истощенную сыворотку, которую исследуют на наличие остаточных антител к штамму-адсорбенту (контроль). При положительных результатах контроля в разведении 1:30 и выше проводят дополнительную адсорбцию сыворотки штаммом адсорбентом с последующим повторным контролем на полноту истощения сыворотки. Сыворотку истощают до получения отрицательных результатов контроля. При отрицательных результатах реакции сыворотку ис-

следуют с гомологичным и гетерологичным антигенами. Разведения исследуемой сыворотки с каждым антигеном составляют 1:30, 1:100, 1:300, 1:1000, 1:3000, последний принимают за 100 %, а каждое разведение соответственно составляет 1, 3, 10, 33 и 100 % титра испытуемой сыворотки. Наряду с трехкратным разведением сыворотки используют двукратные разведения.

Испытуемую культуру лептоспир относят к тому серовару, адсорбция которым позволяет добиться полного истощения исследуемой сыворотки.

Два штамма относят к разным сероварам, если после перекрестной адсорбции адекватным количеством гетерологичного антигена 10 % или более гомологичного титра постоянно остается при повторных исследованиях хотя бы в одной из двух сывороток.

Серогрупповую или серовариантную принадлежность культур лептоспир также устанавливают методом моноклональных антител. Для чего моноклональные антитела с серогрупповой или серовариантной специфичностью соединяют с адекватным количеством испытуемого антигена, пластины инкубируют при  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 30 мин. Учет реакции проводят под микроскопом с конденсором «темное поле». Положительные результаты реакции позволяют отнести испытуемый изолятор к тому моноклону, с которым получена данная реакция. Использование моноклональных антител позволяет быстро (до 1 ч) и точно установить серовариантную принадлежность лептоспир.

2.2.3.5. При постановке биологической пробы используют золотистых хомяков в возрасте 20—30 сут, крольчат-сосунов в возрасте 10—20 сут и морских свинок в возрасте 21—35 сут.

Морские свинки наиболее чувствительны к лептоспирам *Icterohaemorrhagiae*, в меньшей степени — к *Rotopa* и мало чувствительны к лептоспирам других серологических групп.

Лабораторных животных заражают кровью, мочой, суспензией из паренхиматозных органов животных (абортированного плода) или спермой. Исследуемый материал вводят подкожно или внутрибрюшинно хомякам от 0,3—0,5 до 1 см<sup>3</sup>, крольчатам — от 2 до 3 см<sup>3</sup>.

На каждую пробу исследуемого материала берут по два зверька: одного из них убивают на 4—5 сут, период подъема температуры, другого, если он не погибнет, на 14—16-е сут после заражения. Кровь последнего исследуют в РМА, начиная с разведения 1:10 с лептоспирами 15 серологических групп. Положительная РМА свидетельствует о наличии лептоспир в исследуемом материале.

Высевы из убитых и павших зверьков делают из сердца, печени и почки в 2—3 пробирки из каждого органа. Вторую почку, кусочки печени, трансудат из грудной и брюшной полостей, око-

лосердечную жидкость и содержимое мочевого пузыря микроскопируют.

Культуры лептоспир чаще удается выделить из органов зверьков, имеющих клинические признаки болезни, проявляющиеся лихорадкой, отказом от корма, вялостью, дрожью, взъерошенностью шерсти, конъюнктивитом, желтушностью видимых слизистых оболочек и т. д.

У крольчат и морских свинок после заражения проводят термометрию. В период лихорадки кровь для микроскопии и посева берут из уха или сердца.

В качестве биологической модели для обнаружения лептоспир используют также взрослых кроликов и морских свинок. Предварительно кровь животных исследуют в РМА на наличие специфических антител. Животных, в сыворотке крови которых не обнаружены специфические антитела, заражают исследуемым материалом. Кровь зараженных животных исследуют 2—3 раза через каждые 7 сут в РМА, начиная с разведения 1:10 с лептоспирами 15 серологических групп. Обнаружение в сыворотке крови зараженных животных специфических антител свидетельствует о наличии лептоспир в исследуемом материале и позволяет ориентировочно судить об их серогрупповой принадлежности.

Вирулентность выделенной культуры изучают на золотистых хомяках или крольчатах, которых заражают внутрибрюшинно 5—7-дневной культурой, содержащей 70—100 лептоспир в поле зрения микроскопа. Высоковирулентные культуры лептоспир вызывают гибель золотистых хомяков в дозе менее 0,1 см<sup>3</sup>, средней вирулентности — 0,2—0,4 см<sup>3</sup> и слабовирулентные — 0,5—1,0 см<sup>3</sup>.

2.2.3.6. Диагностика лептоспироза может проводиться с помощью флуоресцирующего глобулина, предназначенного для выявления лептоспир независимо от серогрупповой принадлежности в крови, паренхиматозных органах, транссудате из грудной и брюшной полостей, перикардальной и спинномозговой жидкостях, моче больных и павших животных, органах и тканях abortированного плода, в воде и почве.

Сухой глобулин разводят стерильной дистиллированной водой до указанного на этикетке ампулы первоначального объема. Растворенный глобулин дополнительно разводят физиологическим раствором с рН=7,4—7,6 до рабочего разведения, указанного на этикетке ампулы, переносят в стерильную пробирку, консервируют мертиолятом в соотношении 1:10000 (0,1 см<sup>3</sup> 1 %-ного раствора мертиолята на 10 см<sup>3</sup> глобулина), закрывают резиновой пробкой и хранят при температуре 2—10 °С. Такой глобулин можно использовать в течение месяца при соблюдении условий хранения. Рабочий раствор глобулина без кон-

серванта можно использовать в течение 5 сут, храня его при температуре 2—5 °С.

Препараты из исследуемого материала готовят на тщательно обезжиренных и хорошо промытых предметных стеклах. Новые предметные стекла заливают раствором нашатырного спирта (на 1000 см<sup>3</sup> дистиллированной воды 10 см<sup>3</sup> нашатырного спирта) на 10 мин, протирают марлевым тампоном, не касаясь поверхности стекол пальцами и два-три раза перекладывают в свежий раствор. Перед использованием стекла вынимают из раствора и высушивают на воздухе.

Использованные стекла кипятят 2 ч в дистиллированной воде с добавлением двух столовых ложек стирального порошка на 5 дм<sup>3</sup> воды. Многократно промывают дистиллированной водой, не касаясь поверхности стекол пальцами, затем отмывают в растворе нашатырного спирта так же, как при обработке новых стекол.

Мазки из мочи, крови, суспензии органов, полосных жидкостей, воды, культуры и т. п. на предметном стекле делают на площади около 2,0×2,5 см<sup>2</sup>, обводят восковым карандашом на обратной стороне стекла, высушивают при комнатной температуре.

Прозрачную мочу (не содержащую кристаллов соли, спермиев и других посторонних частиц) центрифугируют при 8000—10000 об/мин в течение 30 мин (для осаждения лептоспир), сливают надосадочную жидкость, осадок ресуспендируют в оставшейся капле мочи и наносят на предметное стекло для последующего высушивания и окраски.

Мочу, содержащую значительное количество посторонних частиц, сначала очищают центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 мин, сливают надосадочную жидкость и центрифугируют ее для осаждения лептоспир при 8000—10000 об/мин в течение 30 мин, сливают надосадочную жидкость и делают мазок из ресуспендированного осадка. Для исследования пригодна только свежая моча, хранившаяся не более 10—12 ч при температуре не выше 20 °С. При более высокой температуре допускается хранение мочи до 6—8 ч.

Кровь, взятую от больного, подозрительного по заболеванию или подозреваемого в заражении животного, смешивают с двойным количеством 1,5 %-ного раствора лимонно-кислого натрия, центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин или отстаивают в течение 1 ч. Препараты готовят из прозрачного надосадочного слоя жидкости. Целесообразно осаждение лептоспир из надосадочной жидкости проводить центрифугированием при 8000—10000 об/мин в течение 30 мин.

Суспензию из органов павших (убитых) животных при бессимптомном течении лептоспироза готовят из коркового слоя

почек, при остром течении — из ткани почек и печени. У абортированного плода готовят и исследуют суспензию из всех органов. Патологический материал должен быть взят и исследован в течение 6 ч в летнее время и 10—12 ч при условии хранения его в охлажденном состоянии. Вероятность выделения лептоспир в более поздние сроки снижается.

Кусочки исследуемого органа массой 2—3 г растирают в ступке с 5—7 см<sup>3</sup> питательной среды или физиологического раствора, или стерильной воды до получения гомогенной взвеси. Суспензию отстаивают в холодильнике 1—2 ч или центрифугируют в течение 10 мин при 3000 об/мин и делают мазки из надосадочной жидкости.

Препараты из транссудата из грудной и брюшной полостей, содержимого желудка плода и других жидких субстратов готовят по той же методике, что и из мочи. Препараты из культур лептоспир готовят без предварительной обработки путем нанесения на стекло капли культуры.

Пробы воды для исследования центрифугируют при 8000—10000 об/мин в течение 30 мин, сливают надосадочную жидкость, а осадок ресуспендируют в капле надосадочной жидкости и наносят на предметное стекло.

Мазки высушивают при комнатной температуре, фиксируют ацетоном 5 мин или этиловым спиртом 15 мин и снова высушивают на воздухе.

Для окрашивания препараты размещают горизонтально на мостике. На каждый мазок наносят 3—5 капель разведенного флуоресцирующего глобулина, распределяют его по всей поверхности мазка и выдерживают его при комнатной температуре 20 мин. Для лучшего окрашивания препараты следует периодически покачивать. Затем глобулин сливают.

Препараты промывают водопроводной водой и физиологическим раствором (рН=7,4—7,6) по 5 мин, меняя за это время раствор 4—5 раз. Затем препараты промывают в таком же порядке дистиллированной водой, воду стряхивают и мазки подсушивают на воздухе или используя обогреватель с вентилятором. После этого на мазок наносят небольшую каплю смеси, состоящей из 9 частей глицерина и 1 части 0,05 М фосфатного буфера (рН=8,0, накрывают покровным стеклом, плотно прижимают его к предметному стеклу, удаляя излишки забуференного глицерина).

Для контроля готовят 2—3 мазка одного из диагностических штаммов лептоспир и окрашивают их параллельно с мазками из патологического материала.

Мазки просматривают под люминесцентным микроскопом или биологическим микроскопом.

Увеличение 7×90, сила тока 4,1 А. Микроскопируют через

нефлюоресцирующее масло или его заменитель, приготовленный из химически чистого диметилфталата (100 см<sup>3</sup>) и нафталина сублимированного (1,75 г) или тимола чистого (5,0 г).

Окрашенные флуоресцирующим глобулином лептоспиры имеют зеленоватое, несияющее свечение всей поверхности микроба (в отличие от контурного сияющего свечения микробов других видов). В препарате лептоспиры сохраняют свою форму, просматриваются отдельные вторичные (первичные не видны) завитки спирали, но, как правило, не видны характерные для живых лептоспир булавовидные утолщения на концах, наблюдаемые при темнопольной микроскопии.

Диагноз устанавливают по морфологии лептоспир и интенсивности их свечения, оцениваемой в крестах:

- + + + — четкое зеленоватое свечение;
- + + — умеренное зеленоватое свечение;
- + — зеленоватые «тени»;
- — нет форм, характерных для лептоспир.

#### 2.2.4. Оценка результатов

2.2.4.1. По результатам бактериологических исследований диагноз на лептоспироз считают установленным, а хозяйство неблагополучным по лептоспирозу в любом из следующих случаев:

лептоспиры обнаружены при микроскопическом исследовании в крови или суспензии из органов животных, абортированном плоде, моче или органах лабораторного животного;

при обнаружении методом флуоресцирующих антител в патологическом материале микробов с морфологией, типичной для лептоспир с интенсивностью свечения не менее чем в два креста (+ +);

культура лептоспир выделена из патологического материала или из органа лабораторного животного, зараженного исследуемым материалом.

Лептоспироз считают причиной гибели животных при наличии клинических признаков и патологических изменений, характерных для лептоспироза, специфичность которых подтверждена обнаружением лептоспир в крови или паренхиматозных органах.

Лептоспироз считают причиной абортос при обнаружении лептоспир в органах (тканях) абортированного (мертворожденного) плода.

#### 2.3. Гистологический метод

Метод основан на обнаружении лептоспир в гистологических срезах, импрегнированных серебром.

##### 2.3.1. Аппаратура, реактивы, материалы

Для проведения исследования применяют аппаратуру, реактивы и растворы по п. 2.2.1 со следующими дополнениями:

Кислота пирогалловая.

Серебро азотнокислое, 1—3 %-ный раствор.

Формалин, 40 %-ный.

Спирт этиловый ректификованный 96 %-ный по ГОСТ 18300.

Спирт метилсалициловый.

Ксилол.

Парафин.

### 2.3.2. Проведение исследований (метод Левадита)

Кусочки органов фиксируют в 10 %-ном водном растворе нейтрального формалина в течение 24—48 ч. После фиксации кусочки переносят в 96 %-ный этиловый спирт на 24 ч. Промывают в дистиллированной воде до тех пор, пока кусочки не осядут на дно бюксы (не менее 2—3 ч). Воду меняют три раза. Затем кусочки помещают в 1—3 %-ный раствор азотнокислого серебра на 3—6 ч. Процесс серебрения ведут при  $(37 \pm 1)$  °С. Раствор азотнокислого серебра готовят на свежей дистиллированной воде и используют из расчета 15 см<sup>3</sup> раствора на один кусочек.

Промывку проводят в дистиллированной воде в течение 2—5 мин. После промывки кусочки переносят в небольшую порцию редуцирующей смеси в отдельной чашечке на 2 мин (раствор быстро темнеет) и затем помещают их в приготовленный перед употреблением основной редуцирующий раствор следующего состава: пирогалловая кислота — 4 г, дистиллированная вода — 100 см<sup>3</sup>, формалин чистый — 5 см<sup>3</sup>. Раствор готовят из расчета 20—25 см<sup>3</sup> на один кусочек ткани. Восстановление обязательно проводят в банке из темного стекла.

Пробы выдерживают в редуцирующей смеси 24—48 ч при комнатной температуре в темном месте или банке из темного стекла. Затем их промывают в дистиллированной воде 1—2 ч.

Препараты обрабатывают последовательно, выдерживая в спиртах по следующей схеме:

96 %-ный этиловый спирт (спирт 1) — 1 сут;

96 %-ный » » (спирт 2) — 1 сут;

96 %-ный » » (спирт 3) — 1 сут;

смесь этилового и метилсалицилового спиртов в равных объемах до опускания кусочков на дно посуды;

метилсалициловый спирт — 12 ч.

После спиртовой проводки кусочки ткани выдерживают при  $(57 \pm 1)$  °С в смеси ксилола с парафином (1:1) — 30 мин, затем в парафине 1 — 60 мин и парафине 2 — 60 мин. Из быстро остуженного парафина вырезают блок с кусочком органа и наклеивают на деревянный кубик. Готовят тонкие срезы на санном микротоме и наклеивают на предметное стекло, депарафинируют в трех бюксах с ксилолом по 10—15 мин в каждом и заключают под микроскопом со светлпольным конденсором при увеличе-

нии 90×7—10. При неудовлетворительных результатах ипрегна-ции лептоспир готовят препараты из других одновременно при-готовленных блоков.

### 2.3.3. Оценка результатов

При микроскопии гистосрезов лептоспиры обнаруживают ча-ще на поверхности эпителия и в просветах мочевых канальцев почек, несколько реже — цитоплазме эпителия, преимуществен-но группами.

Типичные лептоспиры всегда окрашены в черный цвет, имеют S-образную форму с 1—2 изгибами или змеевидную форму с грубыми толстыми завитками, которые в отдельных случаях сла-бо заметны. Окружающая ткань окрашивается в буровато-жел-тый цвет.

По результатам гистологических исследований диагноз на лептоспироз считают установленным, а хозяйство неблагополуч-ным по лептоспирозу, если лептоспиры обнаружены в гистоло-гических срезах импрегнированных серебром, приготовленных из почек или печени животных.

Лептоспироз считают причиной абортос, если лептоспиры об-наружены в гистосрезе из органов абортированного (мертворож-денного плода).

## ИНФОРМАЦИОННЫЕ ДАННЫЕ

**1. РАЗРАБОТАН И ВНЕСЕН** Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства и продовольствия

### РАЗРАБОТЧИКИ

Ю. А. Малахов, Г. Л. Соболева

**2. УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ** Постановлением Комитета стандартизации и метрологии СССР от 27.12.91 № 2240

**3. СРОК ПРОВЕРКИ** — 1996 г.

**4. ВЗАМЕН** ГОСТ 25386—82

**5. ССЫЛОЧНЫЕ НОРМАТИВНО-ТЕХНИЧЕСКИЕ ДОКУМЕНТЫ**

| Обозначение НТД,<br>на который дана<br>ссылка | Номер пункта       | Обозначение НТД,<br>на который дана<br>ссылка | Номер пункта       |
|---|--------------------|---|--------------------|
| ГОСТ 199—78                                   | 2.2.2.6; 2.2.2.11  | ГОСТ 4523—77                                  | 2.2.2.7; 2.2.2.10; |
| ГОСТ 245—76                                   | 2.2.2.9; 2.2.2.11  |   | 2.2.2.11           |
| ГОСТ 1770—74                                  | 2.2.2.1; 2.2.2.3;  | ГОСТ 6259—75                                  | 2.2.2.7; 2.2.2.8,  |
|   | 2.2.2.4; 2.2.2.6   |   | 2.2.2.10; 2.2.2.11 |
| ГОСТ 3118—77                                  | 2.2.2.7            | ГОСТ 6709—72                                  | 2.2.2.2.; 2.2.2.3; |
| ГОСТ 3159—76                                  | 2.2.2.7            |   | 2.2.2.4; 2.2.2.5;  |
| ГОСТ 3773—72                                  | 2.2.2.8; 2.2.2.9;  |   | 2.2.2.6; 2.2.2.7;  |
|   | 2.2.2.10           |   | 2.2.2.8; 2.2.2.10; |
| ГОСТ 4165—78                                  | 2.2.2.8; 2.2.2.9;  |   | 2.2.2.13           |
|   | 2.2.2.11           | ГОСТ 8074—82                                  | 2.1.1.1            |
| ГОСТ 4174—77                                  | 2.2.2.8; 2.2.2.9;  | ГОСТ 9284—75                                  | 2.1.1.1            |
|   | 2.2.2.10; 2.2.2.11 | ГОСТ 10075—75                                 | 2.2.2.2; 2.2.2.6;  |
| ГОСТ 4148—73                                  | 2.2.2.8; 2.2.2.9;  |   | 2.2.2.7            |
|   | 2.2.2.10; 2.2.2.11 | ГОСТ 11773—76                                 | 2.2.2.2; 2.2.2.6;  |
| ГОСТ 4198—75                                  | 2.2.2.9; 2.2.2.10  |   | 2.2.2.7            |
| ГОСТ 4209—77                                  | 2.2.2.8; 2.2.2.10; | ГОСТ 12026—76                                 | 2.2.2.4; 2.2.2.6   |
|   | 2.2.2.11           | ГОСТ 13805—76                                 | 2.2.2.13           |
| ГОСТ 4233—77                                  | 2.1.1.1; 2.2.2.4;  | ГОСТ 16280—88                                 | 2.2.2.5            |
|   | 2.2.2.6; 2.2.2.8;  | ГОСТ 17206—84                                 | 2.2.2.5; 2.2.2.13  |
|   | 2.2.2.9; 2.2.2.10  | ГОСТ 18300—87                                 | 2.3.1              |
| ГОСТ 4234—77                                  | 2.2.2.6            | ГОСТ 20292—74                                 | 2.1.1.1            |
| ГОСТ 4329—77                                  | 2.2.2.10           | ГОСТ 22967—82                                 | 2.2.2.1            |
|   |                    | ГОСТ 25336—82                                 | 2.2.2.5            |