МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА СССР
ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ВЕТЕРИНАРИИ

ИНСТРУКЦИЯ О МЕРОПРИЯТИЯХ ПО БОРЬБЕ С ЛЕПТОСПИРОЗОМ ЖИВОТНЫХ

(Утверждена Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР 25 мая 1976 года взамен Инструкции о мероприятиях по борьбе с лептоспирозом сельскохозяйственных и промысловых животных от 23 ноября 1963 года)

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ЛЕПТОСПИРОЗА ЖИВОТНЫХ

(Рекомендованы Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР 15 октября 1975 года)

МОСКВА — «К О Л О С» — 1977

gost.e-ecolog.ru

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА СССР
ГЛАВНОЕ УПРАВЛЕНИЕ ВЕТЕРИНАРИИ

ИНСТРУКЦИЯ О МЕРОПРИЯТИЯХ ПО БОРЬБЕ С ЛЕПТОСПИРОЗОМ ЖИВОТНЫХ

(Утверждена Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР 25 мая 1976 года взамен Инструкции о мероприятиях по борьбе с лептоспирозом сельскохозяйственных и промысловых животных от 23 ноября 1963 года)

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ЛЕПТОСПИРОЗА ЖИВОТНЫХ

(Рекомендованы Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР 15 октября 1975 года)

МОСКВА — «К О Л О С» — 1977

Инструкцию о мероприятиях по борьбе с лептоспирозом животных разработали Ю. А. Малахов (Всесоюзный государственный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов); Р. М. Алехин и П. П. Деркачев (Главное управление ветеринарии МСХ СССР)

Методические указания разработали Ю. А. Малахов, А. Н. Шуплико, В. С. Соловьева (Всесоюзный государственный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов); В. Н. Гущин (Главное управление ветеринарии МСХ СССР)

ИНСТРУКЦИЯ О МЕРОПРИЯТИЯХ ПО БОРЬБЕ С ЛЕПТОСПИРОЗОМ ЖИВОТНЫХ МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ЛЕПТОСПИРОЗА ЖИВОТНЫХ

Редактор *А. С. Бырдина*
Технический редактор *Л. М. Кузнецова*
Корректор *А. В. Пригарина*

Сдано в набор 5/XI 1976 г. Подписано к печати 3/XII 1976 г.
Формат 84×108$^{1}/_{32}$. Усл.-печ. л. 2,52. Уч.-изд. л. 2,44.
Тираж 50 000 экз. Заказ № 1678. Бесплатно.

Ордена Трудового Красного Знамени издательство «Колос», 103716, ГСП, Москва, К-31, ул. Дзержинского, д. 1/19.
Московская типография № 32 Союзполиграфпрома при Государственном комитете Совета Министров СССР по делам издательств, полиграфии и книжной торговли.
Москва, К-51, Цветной бульвар, д. 26.

© Министерство сельского хозяйства СССР, 1977

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ЛЕПТОСПИРОЗА

Диагноз на лептоспироз устанавливают бактериологическим, серологическим и гистологическим методами исследования с учетом эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных и проведением дифференциальной диагностики.

1. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЛЕПТОСПИРОЗА

Бактериологическая диагностика основана на обнаружении лептоспир в исследуемом материале путем микроскопии или выделения культуры и складывается из следующих этапов:

— взятие патологического материала;
— микроскопия в темном поле микроскопа;
— выделение культур лептоспир посевом в специальные среды или биологической пробой на лабораторных животных;
— идентификация и дифференциация выделенных культур.

1.1. Порядок взятия материала для лабораторного анализа

1.1.1. Материалом для прижизненной диагностики служат кровь и моча, для посмертной — трупы мелких животных. От трупов крупных животных берут сердце, кусочки паренхиматозных органов, почку, транссудат из грудной и брюшной полостей, перикардиальную жидкость, мочевой пузырь с содержимым, спинномозговую жидкость.

Абортированный плод доставляют в лабораторию целиком или берут желудок с содержимым и паренхиматозные органы плода.

1.1.2. Мочу собирают при естественном мочеиспускании в чистые пробирки, закрепленные на проволоке, или в банки, чашки Петри, кружки и т. д. Легче всего брать пробы после утреннего подъема животных, а у свиней в любое время дня после 1—2-часового лежания. У коров и свиноматок мочу можно брать катетером.

1.1.3. Кровь в количестве 3—5 мл берут для бактериологического исследования в период лихорадки на

1—7-й день болезни, для серологического исследования— 5—10 мл и не ранее чем через 5—7 дней после проявления клинических признаков болезни или через 60 дней после введения вакцины.

1.1.4. Почку извлекают в невскрытой капсуле. Сердце, мочевой пузырь и желудок плода берут с содержимым, для чего накладывают лигатуры на соответствующие сосуды и сфинктеры. Каждый орган или кусочек органа завертывают отдельно в пергамент.

1.1.5. Ликвор, транссудат, спинномозговую жидкость и другие жидкие субстраты насасывают стерильным шприцем или пипеткой в стерильные пробирки.

1.1.6. Воду из водоисточника для обнаружения лептоспир берут в объеме 1,5—2 л в стерильные колбы с ватномарлевыми пробками.

1.1.7. Взятый материал помещают в ящик, опечатывают и направляют в лабораторию с нарочным.

1.1.8. Патологический материал должен быть взят и исследован в течение 6 часов в летнее время и 10—12 часов — при условии хранения его в охлажденном состоянии.

1.1.9. Микроскопия мочи должна быть закончена при температуре 30—40°С в течение 3 часов, 25—30°С — 4—5 часов, 20—25°С — 6—8 часов, 16—20°С — до 10—12 часов с момента взятия.

Вероятность обнаружения лептоспир в исследуемом материале в более поздние сроки не исключена, но значительно снижается.

1.1.10. Ветеринарный специалист, направляя материал в лабораторию для исследования на лептоспироз, должен рассчитывать, чтобы взятие материала, доставка в лабораторию и проведение исследования укладывались в сроки выживания лептоспир в патологическом материале, в противном случае ответ будет заведомо отрицательным.

В сопроводительной к патологическому материалу должно быть указано время гибели животного или время взятия пробы при жизни.

1.2. Микроскопическое исследование

1.2.1. Для микроскопического исследования на лептоспироз необходимы:

— биологический микроскоп (МБИ-3, МБИ-1, МБИ-11 и др.);

— конденсор темного поля (ОИ-7, ОИ-13 и др.);
— осветитель (ОИ-19, ОИ-21 и др.) с точечной лампой;
— предметные стекла толщиной не более 0,8—1,1 мм;
— покровные стекла стандартные.

Стекла, используемые для микроскопии, должны быть бесцветными, прозрачными, чистыми, без царапин и бликов.

1.2.2. Порядок микроскопии в темном поле следующий. Осветитель соединяют с микроскопом соединительной планкой. Передвигая лампочку осветителя, фокусируют свет на центре плоского зеркала микроскопа. При этом четко должны быть видны завитки спирали. Верхнюю линзу конденсора устанавливают на уровне предметного столика. Центрируют конденсор с помощью регулировочных винтов по оптической оси микроскопа. На верхней линзе конденсора при правильной установке виден равномерно освещенный круг.

Препарат для микроскопических исследований готовят по принципу раздавленной капли. Небольшой объем исследуемого материала наносят пипеткой или бактериологической петлей на предметное стекло и накрывают покровным стеклом, избегая образования пузырьков воздуха. На одном предметном стекле готовят три раздавленные капли.

На верхнюю линзу конденсора наносят каплю дистиллированной воды и устанавливают препарат для микроскопии. Пространство между линзой конденсора и предметным стеклом должно быть заполнено тонким слоем воды, без пузырьков воздуха, что уменьшает рассеивание световых лучей. Фокус конденсора должен находиться в плоскости препарата. Конденсор при этом обычно вплотную прилегает к стеклу. Иногда в зависимости от толщины препарата его приходится опускать на 0,5—1 мм.

Микроскопируют исследуемый материал при увеличении 40×7—10 и 20×1,5×7, а для более детального рассмотрения препарата — при увеличении 40×10—15 или 40×1,5×10.

1.3. Характеристика лептоспир

1.3.1. Лептоспиры при рассмотрении в темном поле микроскопа представляют собой спиралеподобные тон-

кие 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 круговые. Одна и та же особь может совершать и вращательные и поступательные движения.

1.3.2. Морфология и характер движения настолько типичны, что позволяют безошибочно распознавать лептоспир в патологическом материале. Кроме того, лептоспиры при микроскопии в отличие от других микроорганизмов никогда не бывают блестящими.

1.3.3. Возможность безошибочной дифференциации лептоспир от микроорганизмов других видов по морфологическим признакам дает право при лептоспирозе устанавливать диагноз только на основании микроскопических исследований, без последующего выделения чистых культур и их идентификации.

1.4. Микроскопия мочи

1.4.1. Мочу микроскопируют в нативном виде или после центрифугирования. Прозрачную мочу, не содержащую кристаллов солей, хлопьев, спермиев и других посторонних частиц, центрифугируют при 10—15 тыс. об/мин в течение 30 минут, сливают надосадочную жидкость, осадок ресуспензируют в оставшейся капле мочи и микроскопируют.

Мочу, содержащую значительное количество посторонних частиц, очищают центрифугированием при 3 тыс. об/мин в течение 10 минут, затем сливают надосадочную жидкость и центрифугируют ее для осаждения лептоспир при 10—15 тыс. об/мин в течение 30 минут.

При массовом исследовании животных в хозяйстве готовят по одной, а при наличии немногих животных — не менее трех раздавленных капель из каждой пробы мочи. Просматривают 50 и более полей зрения в каждой капле.

1.4.2. Лептоспир с активной подвижностью обнаруживают примерно в 50% положительных проб, в остальных случаях они неподвижны и довольно часто имеют измененную морфологию. Количество их также бывает различным. В моче примерно у 30% животных-лептоспи-

роносителей содержатся по 1—2, реже по 5—7 и очень редко по 10—15 лептоспир в каждом поле зрения, в 30—35% случаев удается обнаружить 1—2 лептоспиры в 5—10 полях. В остальных случаях выявляют 1—2 лептоспиры в 20—50 и более полях зрения.

В кислой моче с pH 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, довольно часто концевые крючки распрямлены.

1.5. Микроскопия крови

1.5.1. Кровь, взятую от больного или подозреваемого в заболевании животного, смешивают с двойным количеством 1,5%-ного раствора лимоннокислого натрия, центрифугируют при 2—3 тыс. об/мин в течение 5 минут или отстаивают в течение часа, микроскопируют прозрачный надосадочный слой жидкости. Целесообразно осаждение лептоспир из надосадочной жидкости проводить центрифугированием при 10—15 тыс. об/мин в течение 30 минут.

1.6. Микроскопия суспензии из ткани органов

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

1.6.2. Кусочки исследуемого органа весом 2—3 г растирают в ступке с 5—7 мл питательной среды, физиологического раствора или стерильной воды до получения гомогенной взвеси. Суспензию отстаивают в холодильнике 1—2 часа или центрифугируют при 3 тыс. об/мин в течение 10 минут и микроскопируют надосадочную жидкость.

1.6.3. Транссудат из грудной и брюшной полостей, околосердечную жидкость, содержимое желудка плода и другие жидкие субстраты микроскопируют по той же методике, что и мочу.

1.6.4. Из проб крови и суспензии каждого органа готовят не менее трех раздавленных капель и просматривают в каждой из них не менее 50 полей зрения

1.7. Дифференциальная диагностика

1.7.1. При микроскопической диагностике лептоспиры необходимо дифференцировать от нитей фибрина, обломков хвостовых частей спермиев, разрушенных эритроцитов, спиралло- и вибриоподобных микроорганизмов, интерспир у хряков и других микроорганизмов.

1.7.2. *Спермии* постоянно содержатся в моче быков и хряков и часто в большом количестве. Обломки их хвостовых частей не имеют концевых крючков, неподвижны и вследствие преломления света кажутся блестящими.

1.7.3. *Нити фибрина* постоянно обнаруживают в крови, транссудате и иногда в моче. Они не преломляют свет, но не имеют концевых крючков и не обладают подвижностью.

1.7.4. *Содержимое эритроцитов* может выдавливаться через поры мембраны в виде тонких нитей. Такой эритроцит очень напоминает «паучок» из агглютинированных лептоспир. Свободный конец каждой нити под действием тока жидкости непрерывно извивается и колеблется. Часть нитей отрывается от эритроцитов и очень напоминает по форме и размерам лептоспир, но в отличие от последних они тоньше, не имеют крючков и не способны самостоятельно двигаться.

1.7.5. *Спирилло- и вибриоподобные микроорганизмы* обнаруживают в 10—15% случаев в моче свиней и крупного рогатого скота и постоянно — в крови, спинномозговой жидкости, суспензии из органов, а также в тканях и жидкостях абортированных плодов. Эти микроорганизмы отличаются от лептоспир змееподобным движением и отсутствием концевых крючков.

1.7.6. *Интерспиры* обитают в препуциальном мешке свиней. В моче, взятой при естественном мочеиспускании, их обнаруживают повсеместно в 50—80% случаев. В моче, взятой из мочевого пузыря, они не содержатся. Интерспиры подвижны. Оба или один конец микробной клетки перемещается судорожными, маятникообразными с широкой амплитудой движениями. После нескольких колебательных движений клетка некоторое время остается неподвижной, а затем снова можно наблюдать несколько очередных движений. Подвижность сохраняется не более 1—2 часов с момента получения мочи. Неподвижная интерспира имеет, так же как и лептоспира,

один или два крючка и не преломляет свет, но в отличие от лептоспир у нее видны первичные завитки и тело клетки напоминает нить, состоящую из бусинок. Концы крючков заострены.

1.7.7. *Другие микроорганизмы* дифференцируют от лептоспир по форме и характеру движения, и все они, кроме того, преломляют свет и кажутся блестящими.

1.8. Выделение культур лептоспир

1.8.1. Выделение лептоспир из крови при жизни возможно в первые 5—7 дней болезни в период лихорадки. Для этой цели кровь из яремной 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 (прилюжения 2 и 3).

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

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

1.8.4. Высевы из других органов делают по общепринятой методике.

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

1.8.5. Посевы культивируют при температуре 28—30° в течение трех месяцев. Лептоспиры, размножаясь в питательной среде, не изменяют ее внешнего вида. Поэтому для выявления роста лептоспир через 3, 5, 7, 10 и далее каждые 5 дней культивирования из всех пробирок микроскопируют капли, которые наносят на предметное стекло бактериологической петлей. Большинство культур вырастает через 7—20 дней. Иногда лептоспиры обнаруживают в среде на 3—5-й день, через 1—2 месяца и очень редко через 2—3 месяца культивирования.

Содержимое каждой пробирки, в которой обнаружены лептоспиры, пересевают в 3—5 пробирок со свежей питательной средой. Пробирки с обильным ростом посторонней микрофлоры уничтожают.

1.9. Порядок сохранения культур

1.9.1. Пересевы культур лептоспир производят пастеровскими пипетками. В пробирку с 5—10 мл питательной среды вносят 0,5—1,0 мл культуры. Максимальное накопление лептоспир наблюдается через 4—7 дней культивирования при температуре 28—30°.

1.9.2. Рост и чистоту культуры 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 10—15 дней не менее чем в 3—4 пробирки.

1.9.3. Штаммы лептоспир, постоянно поддерживаемые в лаборатории, можно хранить в пробирках под вазелиновым маслом, в запаянных ампулах, в морозильной камере при —70—80°С или при температуре жидкого азота (—190°С). Лептоспиры консервируют любым из этих методов после выращивания в сывороточной среде до максимального накопления.

В пробирку на культуру наслаивают 1—1,5 мл стерильного вазелинового масла или культуру расфасовывают в стерильные 1—5 мл ампулы из нейтрального стекла и запаивают.

Хранят пробирки и ампулы в темном месте при комнатной температуре. В таких условиях лептоспиры можно хранить без пересевов в течение трех месяцев.

1.9.4. Для хранения в замороженном состоянии культуры расфасовывают в ампулы, запаивают, охлаждают до 0—4°С и помещают в сосуды Дьюара, заполненные азотом, или морозильную камеру.

В жидком азоте лептоспиры можно хранить без пересевов в течение года, при этом они заметно не изменяют своих биологических свойств.

1.10. Очистка загрязненных культур лептоспир

1.10.1. Культуры лептоспир, загрязненные микрофлорой, очищают биологическим методом, фильтрацией через бактерийные фильтры или пересевом на плотные питательные среды.

1.10.2. Для очистки биологическим методом загрязненную культуру вводят внутрибрюшинно морским свинкам в дозе 1—2 мл, крольчонку — 1—2 мл, хомяку или мыши — 0,5 мл. Через 30—60 минут кровь из сердца зараженного животного высевают в пробирки с питательной средой.

1.10.3. Лептоспиры проходят через асбестовые фильтровальные пластины марки СФ и свечи Шимберляна Л-5. Для очистки методом фильтрации загрязненную культуру фильтруют через простерилизованный фильтр. Фильтрат рассеивают в 5—10 пробирок с питательной средой. В высевах из фильтрата получают чистую культуру лептоспир.

1.11. Постановка биологической пробы

1.11.1. Восприимчивы к лептоспирозу при экспериментальном заражении золотистые хомяки, крольчата, морские свинки, крапчатые суслики, щенки собак, котята, белые и серые мыши.

Для повседневной практической работы используют золотистых хомяков 20—30-дневного возраста и крольчат-сосунов в возрасте 10—20 дней.

Молодые свинки (3—5-недельного возраста) весом 150—200 г наиболее чувствительны к L. icterohaemorrhagiae, в меньшей степени — к L. pomona и мало чувствительны к лептоспирам других серологических групп.

1.11.2. Лабораторных животных заражают для выделения культур лептоспир из патологического материала и объектов внешней среды, очистки культур лептоспир от посторонней микрофлоры, определения вирулентности выделенных культур и дифференциации от сапрофитов.

1.11.3. Для выделения культур лептоспир 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 мл, крольчатам — 2—3 мл.

1.11.4. На каждую пробу исследуемого материала необходимо брать по два зверька: одного из них убивают на 4—5-й, другого, если он не погибает, на 14—16-й день после заражения. Кровь зверька, убитого на 14—16-й день после заражения, исследуют по реакции микроагглютинации, начиная с разведения 1 : 10 с лептоспирами 13 серологических групп. Положительная РМА свидетельствует о наличии лептоспир в исследуемом материале.

1.11.5. Высевы от убитых и павших зверьков делают из сердца, печени и почки в 2—3 пробирки из каждого органа. Вторую почку, кусочки печени, транссудат из грудной и брюшной полостей, околосердечную жидкость и содержимое мочевого пузыря микроскопируют.

1.11.6. Культуры лептоспир чаще удается выделить из органов зверька в период проявления клинических признаков болезни, проявляющихся отказом от корма, вялостью, дрожью, взъерошенностью шерсти, конъюнктивитом, желтушностью видимых слизистых оболочек и т. д.

1.11.7. У крольчат и морских свинок проводят после заражения термометрию. У крольчат нормальной температурой считается 38,5—39,5°С, у свинок — 38—39,5°С. В период лихорадки кровь берут из уха или сердца шприцем для микроскопии и посева.

1.11.8. Патогенность и вирулентность выделенных культур лептоспир проверяют на золотистых хомяках или крольчатах. Патогенные лептоспиры способны размножаться в организме животного, вызывать клинические проявления болезни, характерные патологоанатомические изменения и гибель животного. Лептоспиры-сапрофиты такими свойствами не обладают. Заражение животных проводят внутрибрюшинно 5—7-дневной культурой, содержащей 70—100 лептоспир в поле зрения микроскопа. Культуры лептоспир, убивающие золотистых хомяков на 5—12-й день дозой менее 0,1 мл, считают высоковирулентными, 0,2—0,4 мл — средней вирулентности и 0,5—1 мл — слабовирулентными.

1.11.9. Определение серогрупповой принадлежности культур лептоспир проводят в соответствии с Наставлением по применению групповых агглютинирующих лептоспирозных сывороток, утвержденным Главным управлением ветеринарии МСХ СССР 31 мая 1974 г.

1.11.10. В качестве биологической модели для обна-

ружения лептоспир могут быть использованы взрослые кролики и морские свинки. Кровь животных исследуют по РМА на наличие специфических антител. Животных, в крови которых не обнаружены специфические антитела, заражают исследуемым материалом.

Кровь зараженных животных исследуют три раза через каждые семь дней по реакции микроагглютинации начиная с разведения 1 : 10 с лептоспирами 13 серологических групп. Обнаружение в крови зараженных животных специфических антител свидетельствует о наличии лептоспир в исследуемом материале и позволяет ориентировочно судить о их серогрупповой принадлежности.

2. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВОДЫ

2.1. Вода является основным фактором в передаче возбудителя лептоспироза.

Лептоспир обнаруживают в воде биологической пробой на крольчатах, свинках, хомяках, крапчатых сусликах, взрослых кроликах, используя одну из следующих методик.

2.2. Пробы воды объемом 1—2 л берут в стерильную посуду, подогревают до 30° и выливают в эмалированный кювет, помещают в него на один час двух подопытных животных, кожа брюшка или задние ноги которых скарифицированы, так чтобы скарифицированная поверхность была погружена в воду. Начиная с четвертого дня у крупных зверьков (крольчата, морские свинки) берут кровь из сердца с целью выделения гемокультур, исследуют микроскопически брюшной экссудат. Одного из мелких зверьков убивают. На 14—20-й день всех выживших животных также убивают. Патологический материал исследуют на наличие лептоспир. Кровь исследуют на РМА.

2.3. Пробу воды (до 500 мл) центрифугируют при 10—15 тыс. об/мин в течение 30 минут, сливают надосадочную жидкость, а осадки из всех центрифужных стаканов суспензируют в стерильной питательной среде для лептоспир или физиологическом растворе. Суспензию вводят внутрибрюшинно или подкожно хомякам по 0,5—1 мл, крольчатам и морским свинкам по 1—2 мл. В дальнейшем исследуют, как указано в п. 2.2.

2.4. Полученный после центрифугирования осадок подкожно вводят в дозе 2—3 мл взрослым кроликам, не имеющим в крови лептоспирозных антител.

Через 7—14 и 20 дней кровь кролика исследуют по РМА с лептоспирами 13 серологических групп. Обнаружение специфических антител в титре 1 : 10 и выше свидетельствует о наличии лептоспир в исследуемой пробе воды.

3. ИМПРЕГНАЦИЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ СРЕЗОВ ИЗ ОРГАНОВ СЕРЕБРОМ ПО ЛЕВАДИТИ

3.1. Материалом для гистологического исследования служат кусочки коркового слоя почек и печени толщиной не более 1 см, консервированные 10%-ным раствором формалина.

Лептоспиры удается обнаружить с наибольшим постоянством в гистологических срезах импрегнированных серебром по Левадити. Методы Крантца, Полагута и Майера менее эффективны.

3.2. Несколько кусочков органов не толще 1 см, лучше 2—3 мм, фиксируют в 10%-ном водном растворе нейтрального формалина 24—48 часов. После фиксации кусочки переносят в 96° спирт на 24 часа. Промывают в дистиллированной воде до тех пор, пока кусочки не осядут на дно бюкса (не менее 2—3 часов), воду меняют три раза.

3.3. Помещают кусочки в 1—3%-ный раствор азотнокислого серебра на 3—6 дней. Процесс серебрения ведут при температуре 37°С. Раствор азотнокислого серебра готовят на свежей дистиллированной воде из расчета 15 мл раствора на один кусочек.

3.4. Прополаскивают в дистиллированной воде в течение 2—5 минут. После промывки кусочки переносят в небольшую порцию редуцирующей смеси в отдельной чашечке на 2 минуты (раствор быстро темнеет) и затем помещают их в приготовленный перед употреблением основной редуцирующий раствор следующего состава: пирогалловая кислота — 4 г, дистиллированная вода — 100 мл, формалин чистый — 5 мл.

Раствор готовят из расчета 20—25 мл на один кусочек ткани. Восстановление обязательно проводят в банке из темного стекла.

3.5. Кусочки выдерживают в редуцирующей смеси 24—48 часов при комнатной температуре в темном месте или в банке из темного стекла.

Время выдержки контролируют приготовлением еди-

ничных срезов через каждые 12—16 часов во избежание передержания, так как срезы могут стать черными. Промывают в дистиллированной воде 1—2 часа.

3.6. Обрабатывают препараты последовательно спиртами: в 96° спирт (спирт 1) на сутки; в 96° спирт (спирт 2) на сутки; в 96° спирт (спирт 3) — на сутки; спирт-метил (спирты этиловый и метилсалициловый поровну) — до опускания кусочков на дно бюкса, а затем в метилсалициловый — до утра.

3.7. После этого перекладывают в кашу-парафин (ксилол и парафин поровну) на 30 минут при 57°; парафин 1 — на 60 минут при 57°С; парафин 2 — на 60 минут при 57°С.

Из быстро остуженного парафина вырезают блок с кусочком органа и наклеивают на деревянный кубик. Приготавливают тонкие срезы на санном микротоме и наклеивают на предметное стекло, депарафинируют в трех бюксах с ксилолом по 10—15 минут в каждом и заключают под покровное стекло в канадский бальзам, подсушивают и просматривают под микроскопом со светлопольным конденсором при увеличении 90×7—10.

В случае неудовлетворительных результатов импрегнации лептоспир готовят препараты из других одновременно приготовленных блоков. Препараты необходимо хранить в темноте.

3.8. Микрокартина: лептоспиры черные, окружающая ткань буровато-желтая. Лептоспиры располагаются на поверхности эпителия и в просветах мочевых канальцев почек, несколько реже — в цитоплазме эпителия, преимущественно группами. После импрегнации серебром типичные лептоспиры имеют S-образную с 1—2 изгибами или змеевидную форму с грубыми, толстыми завитками, которые в отдельных случаях слабо заметны. Иногда в просвете и на поверхности эпителия мочевых канальцев встречаются аргирофильные гранулы (окрашены в цвет лептоспир), которые при отсутствии типичных форм нельзя принимать за лептоспир.

4. СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЛЕПТОСПИРОЗА

4.1. Серологическая диагностика лептоспироза основана на обнаружении специфических антител в крови животных, реакцией микроагглютинации (РМА) или реакцией макроагглютинации (РА).

4.2. Сыворотку крови животных исследуют на лептоспироз по РМА или РА для выяснения благополучия хозяйства по этому заболеванию и установления диагноза на лептоспироз у отдельных животных.

В последнем случае проводят 2—3-кратное исследование. Кровь берут для исследования на 5—7-й день болезни и повторно через 7—10 дней.

4.1. Порядок постановки и учета реакции микроагглютинации (РМА)

4.1.1. Для постановки реакции микроагглютинации необходимы:

— исследуемая сыворотка крови животных;
— антигены — культуры диагностических штаммов лептоспир;
— электролит — физиологический раствор;
— микроскоп, конденсор темного поля и осветитель те же, что для микроскопической диагностики;
— агглютинационные пластинки или пробирки Флоринского;
— 40—100-гнездные штативы;
— бактериологические пробирки;
— градуированные пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл;
— аппарат Флоринского;
— предметные стекла.

4.1.2. *Исследуемая сыворотка.* Для исследования пригодна сыворотка свежая, замороженная, высушенная на фильтровальной бумаге, консервированная фенолом или борной кислотой. Консервируют отстоявшуюся сыворотку, слитую в сухие стерильные пробирки.

Добавляют 5%-ный раствор фенола при постоянном помешивании 0,05 мл (1 капля) на каждый миллилитр сыворотки.

Борную кислоту вносят в сыворотку до получения насыщенного раствора и образования на дне пробирки небольшого осадка кристаллов. Кристаллы кислоты не должны попадать в пипетку во время постановки реакции.

Высушивают сыворотку на квадратах (5×5 см) белой фильтровальной бумаги по 3—5 капель (0,05 мл каждая) при комнатной температуре или в термостате при температуре 37°С. Консервированные пробы сыворотки пригодны для исследования в течение месяца.

Гемолизированные, загнившие, плесневелые и проросшие сыворотки не исследуют.

4.1.3. *Антигены.* В качестве антигенов в РМА используют живые культуры лептоспир различных серологических групп. Республиканские лаборатории ставят реакцию с лептоспирами 13 серологических групп: Icterohaemorrhagiae, Javanica, Canicola, Pyrogenes, Cynoptery, Autumnalis, Pomona, Grippotyphosa, Hebdomadis, Tarassovi, Bataviae, Australis, Ballum.

Краевые, областные, межрайонные лаборатории исследуют сыворотку домашних животных с антигенами 6 серогрупп: Grippotyphosa, Pomona, Icterohaemorrhagiae, Tarassovi, Hebdomadis, Canicola.

Сыворотку крови диких животных исследуют с лептоспирами 13—15 серогрупп.

В РМА используют эталонные штаммы лептоспир или их аналоги, рекомендованные Всесоюзным государственным научно-контрольным институтом ветеринарных препаратов МСХ СССР.

Диагностические штаммы лептоспир лаборатории получают во Всесоюзном государственном научно-контрольном институте ветеринарных препаратов МСХ СССР и поддерживают их периодическими пересевами через каждые 10—15 дней.

Пригодность культуры для использования в реакции оценивают путем просмотра пробирок в проходящем свете и микроскопией.

При достаточном накоплении лептоспир после встряхивания пробирки с культурой в проходящем свете в среде хорошо заметны муаровые волны, а в спокойном состоянии легкая опалесценция. Наличие осадка, пленки, помутнения среды свидетельствует о прорастании культуры посторонней микрофлорой, полная прозрачность среды — об отсутствии лептоспир.

В реакции используют чистые культуры лептоспир в возрасте 5—15 дней без признаков агглютинации и лизиса (четкообразные, неподвижные клетки) с накоплением 70—100 микробных клеток в поле зрения микроскопа при увеличении $20\times10\times1{,}5$ или 40×7—10. Культуры, содержащие 150—200 и более лептоспир в поле зрения микроскопа, разводят перед постановкой реакции питательной средой или физиологическим раствором до указанной концентрации.

Через каждые три месяца лаборатории проводят

контроль диагностических штаммов лептоспир в реакции микроагглютинации и лизиса с групповыми агглютинирующими сыворотками.

В ответах о результатах исследования и при составлении отчетов лаборатория указывает серогруппу лептоспир, с которой реагировала сыворотка, а не серовар или штамм.

4.1.4. *Электролит.* В качестве электролита в реакции микроагглютинации используют 0,85%-ный раствор хлористого натрия (марки ХЧ или ЧДА) в дистиллированной воде. Раствор разливают во флаконы по 100—200 мл или бактериологические пробирки, стерилизуют в автоклаве при 1,0 ати 30 минут.

4.1.5. Сыворотку исследуют в трех разведениях: 1 : 100, 1 : 500, 1 : 2500, порядок приготовления которых показан в таблице.

Схема приготовления разведений исследуемой сыворотки

Необходимое количество (мл)		Полученные разведения сыворотки	
физиологического раствора	сыворотки	без антигена	с антигеном
4,9	0,1 нативной	1:50	1:100
2,0	0,5 из разведения 1:50	1:250	1:500
2,0	0,5 из разведения 1:250	1:1250	1:2500

При необходимости реакцию ставят в разведениях 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400, 1 : 800 и т. д. до титра.

4.1.6. При исследовании сыворотки, высушенной на фильтровальной бумаге, вырезают две сухие капли (0,1 мл сыворотки), измельчают ножницами и заливают в пробирке физиологическим раствором в объеме 4,9 мл, экстрагируют в течение часа при температуре 37°С.

Полученный экстракт используют как исходное разведение сыворотки 1 : 50.

4.1.7. Реакцию ставят в агглютинационных пластинках. Разведенную сыворотку разливают, начиная с бо́льшего разведения, в лунки агглютинационных пластин по

0,1 мл в каждую мерной пипеткой на 1,0 мл или аппаратом Флоринского.

Каждое разведение сыворотки разливают в отдельный ряд, состоящий из 5—13 лунок (пробирок) в зависимости от количества антигенов, используемых в реакции. Каждую культуру-антиген вносят по 0,1 мл в три лунки с разными разведениями сыворотки. После добавления антигенов пластины встряхивают и выдерживают в термостате при температуре 30°С в течение часа.

Контролем служит смесь культуры лептоспир с физиологическим раствором по 0,1 мл. Лептоспиры в контроле должны оставаться подвижными, не иметь признаков лизиса и агглютинации.

4.1.8. Реакцию учитывают путем микроскопии капель из каждой лунки в темном поле микроскопа при увеличении 20×10 или 20×7×1,5. Капли из лунок выносят на предметное стекло бактериологической петлей от большего разведения к меньшему и просматривают их без покровного стекла. Капли можно наносить двумя способами: 1) бактериологической петлей диаметром 3 мм наносят на стекло сразу до 30 капель и затем просматривают их под микроскопом; 2) бактериологической петлей диаметром 1 мм наносят на предметное стекло в освещенный центр поля зрения одну каплю и просматривают ее, передвигают столик на 2—3 мм и рядом с первой наносят и учитывают вторую каплю. В этом случае на одном предметном стекле учитывают 60—80 капель.

После каждого антигена петлю прокаливают и охлаждают.

4.1.9. Результаты реакции оценивают в крестах по четырехбалльной системе:

++++ — агглютинированы 100% лептоспир;
+++ — агглютинированы 75% лептоспир;
++ — агглютинированы 50% лептоспир;
+ — агглютинированы 25% лептоспир;
— (знак минус) — агглютинация отсутствует.

Агглютинация проявляется в склеивании лептоспир и образовании паучков. Паучок включает от 3—5 до нескольких десятков и даже сотен лептоспир. Свободные концы лептоспир сохраняют подвижность.

В начальных разведениях сыворотки может наблюдаться лизис лептоспир, проявляющийся в набухании и обездвиживании, появлении зернистости и полного распада микробных клеток.

4.1.10. Положительной считают реакцию, оцененную не менее чем на два креста, при отсутствии агглютинации в контроле.

При повторном исследовании сыворотки крови реакцию ставят в тех же разведениях.

4.2. Порядок постановки и учета реакции макроагглютинации (РА)

Реакцию макроагглютинации ставят и учитывают в соответствии с Временным наставлением по применению антигенов для диагностики лептоспироза у животных реакцией макроагглютинации, утвержденным Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР 12 мая 1974 года.

4.3. Оценка показаний РМА и РА

4.3.1. Животных с титром сыворотки в РМА 1 : 100 или реагирующих по РА на 1—2 креста, кроме лошадей и крупного рогатого скота, реагирующих с лептоспирами группы Hebdomadis, считают подозреваемыми в заражении.

Крупный рогатый скот, реагирующий с лептоспирами группы Hebdomadis, и лошадей, реагирующих с лептоспирами любой серологической группы, считают подозреваемыми в заражении при титре антител в РМА 1 : 500 или реагирующих в РА на 1—2 креста с неразведенной сывороткой.

Кровь от животных, подозреваемых в заражении, и от животных, не реагировавших при первом исследовании, повторно проверяют через 7—10 дней.

4.3.2. Выявление антител у животных, не реагировавших при первом исследовании, или нарастание титра у реагировавших в РМА в пять и более раз, или положительная РА на 3—4 креста свидетельствуют об активном инфекционном процессе у обследуемых животных.

4.3.3. Животных (кроме лошадей и реагирующего с лептоспирами группы Hebdomadis крупного рогатого скота) с титром сыворотки в РМА 1 : 500 и более или в РА на 3—4 креста и крупный рогатый скот, реагирующий с лептоспирами группы Hebdomadis и лошадей, реагирующих с лептоспирами любой серогруппы при

титре в РМА 1 : 2500 и более или в РА на 3—4 креста, рассматривают как возможных лептоспироносителей.

4.3.4. Возбудителями лептоспироза при серологической диагностике считают лептоспир той серологической группы, к которой обнаружены антитела в наиболее высоком титре.

Необходимо учитывать, что в сыворотке крови свиней, крупного рогатого и мелкого рогатого скота и лошадей при исследовании по РМА обнаруживают в 5—15% случаев (из числа положительно реагирующих) антитела в наиболее высоком титре к лептоспирам Australis, Autumnalis, Ballum, Pyrogenes, Cynoptery, Bataviae, которые не были выделены ни в одном случае от сельскохозяйственных животных.

Такие реакции следует рассматривать как межгрупповые, являющиеся следствием заражения животных лептоспирами Pomona, Tarassovi и другими, обычно выделяемыми от сельскохозяйственных животных.

Лептоспиры Australis, Bataviae, Autumnalis, Ballum, Pyrogenes, Cynoptery, Kazachstanica могут быть признаны возбудителями лептоспироза у сельскохозяйственных животных только после выделения этих лептоспир в чистой культуре или подтверждении их роли реакцией иммуноабсорбции.

4.4. Методика постановки реакции иммуноабсорбции при исследовании проб сыворотки

4.4.1. В реакции иммуноабсорбции изучают пробы сыворотки животных, агглютинирующие лептоспиры нескольких серологических групп в равно высоких титрах или имеющие наиболее высокий титр по отношению к лептоспирам, ранее не известным в качестве возбудителя лептоспироза у сельскохозяйственных животных.

4.4.2. Для проведения абсорбции выращивают в 0,2—0,5-литровых флаконах все штаммы лептоспир, с которыми данная проба сыворотки дала реакцию агглютинации. К 5—7-суточным культурам добавляют 0,3% формалина и выдерживают 10—12 часов. Затем лептоспиры осаждают центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 30 минут. Сливают надосадочную жидкость, а осадок суспензируют в объеме 0,9 мл среды или физиологического раствора, 0,1 мл исследуемой сыворотки смешивают с 0,9 мл концентрированного антигена и вы-

держивают в течение 48 часов при температуре 1—5°С. Абсорбированную сыворотку проверяют в РМА на наличие остаточных антител к штамму-абсорбенту, а затем исследуют с лептоспирами групп, с которыми реагировала сыворотка до абсорбции.

4.4.3. В процессе абсорбции лептоспиры, являющиеся возбудителем инфекции у данной особи, извлекают из сыворотки антитела к лептоспирам всех других серологических групп, в то время как антитела к штамму-возбудителю болезни не абсорбируются из сыворотки гетерологичными типами лептоспир.

Для сокращения объема работы сыворотку можно в начале абсорбировать лептоспирами, являющимися наиболее частыми возбудителями болезни у животных данного вида.

4.4.4. Оценка эпизоотической ситуации в хозяйстве по результатам лабораторных исследований приведена в Инструкции о мероприятиях по борьбе с лептоспирозом животных пп. 2.4., 2.5. и 2.6.

Приложение 1

СПИСОК СЕРОЛОГИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ И ЭТАЛОННЫХ ШТАММОВ ЛЕПТОСПИР, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ДОМАШНИХ И ДИКИХ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Серологическая группа	Серологический вариант	Типовой штамм
Icterohaemorrhagiae	icterohaemorrhagiae	RGA
	copenhageni	M-20
	mankarso	Mankarso
	naam	Naam
	mwogolo	Mwogolo
	dakota	Grand River
	sarmin	Sarmin
	birkini	Birkin
	smithi	Smith
	ndambari	Ndambari
	ndahambukuje	Ndahambukuje
	budapest	PV-1
	weaveri	GZ-390-U
Javanica	javanica	Veldrat Batavia 46
	poi	Poi
	sorex-jalna	Sorex Jalna
	coxi	Cox
	sofia	Sofia 874
Celledoni	celledoni	Celledoni
	whitcombi	Whitcombi
Canicola	canicola	Hond Utrecht IV
	bafani	Bafani
	kamituga	Kamituga
	jonsis	Jones
	sumneri	Sumner
	broomi	Patane
	bindjei	Bindjei
	schnueffneri	Vleermuise 90-C
	benjamin	Benjamin
	malaya	H-6
Ballum	ballum	MUS-127
	castellonis	Castellon-3
	arboreae	Arboreae
Pyrogenes	pyrogenes	Salinem
	Zanoni	Zanoni
	myocastoris	LSU-1551
	abramis	Abraham
	biggis	Biggs
	hamptoni	Hampton
	alexi	HS-616
	robinsoni	Robinson
	manilae	LT-398

Продолжение

Серологическая группа	Серологический вариант	Типовой штамм
Cynopteri	cynopteri	3522-C
	canalzoniae	Cz-188k
	butembo	Butembo
Autumnalis	autumnalis	Akiyama A
	rachmati	Rachmat
	fortbragg	Fort Bragg
	sumatrana	Sapulette
	bulgarica	Nikolaevo
	bangkinang	Bangkinang-1
	erinaceiauriti	Erinaceus auritus 670
	mooris	Moores
	sentot	Sentot
	louisiana	LSU-1945
	orleans	LSU-2580
	djasiman	Djasiman
	gurungi	Gurung
Australis	australis	Ballico
	lora	Lora
	müenchen	München C-90
	jalna	Jalna
	bratislava	Jez Bratislava
	fugis	Fudge
	bangkok	Bangkok D-92
	peruviana	Lt-941
	pina	LT-932
	nicaragua	Lt-990
Pomona	pomona	Pomona
	kennewieni	Lt-1026
	monjakov	Monjakov
	mozdok	5621
	tropika	CZ-299U
	proechimys	LT-796
Grippotyphosa	grippotyphosa	Moskva-V
	valbuzzi	Valbuzzi
Hebdomadis	hebdomadis	Nebdomadis
	nona	Nona
	kambale	Kambale
	kremastos	Kremastos
	worsfoldi	Worsfold
	jules	Jules
	maru	CZ-285—B
	borincana	HS-622
	kabura	Kabura
	mini	Sari

Продолжение

Серологическая группа	Серологический вариант	Типовой штамм
Hebdomadis	szwajizak	Szwajizak
	georgia	LT-117
	perameles	Bandicoot-343
	wolffi	3705
	hardjo	Hardjoprajitno
	recreo	LT-957
	medanensis	Hond-HC
	trinidad	LT-1098
	seiroe	M-84
	balcanica	1627 Burgas
	polonica	493-Poland
	nero	Gamsulin
	haemolytica	March
	ricardi	Richardson
Bataviae	bataviae	Van Tienen
	paidjan	Paidjan
	djatzi	HS-26
	kobbe	CZ-320-K
	balboa	LT-761
	claytoni	LT-818
	brasiliensis	LT-996
Tarassovi	tarassovi	Perepelicin
	bakeri	LT-79
	atlantae	LT-81
	guidae	RP-29
	kisuba	Kisuba
	bravo	Bravo
	atchafalaya	LSU-1013
	chagres	LT-924
	rama	LT-955
	gatuni	LT-839
Panama	panama	CZ-214-K
Shermani	shermani	LT-821
Semaranga	semaranga	Veldrat Semarang-173
	patoc	Patoc I
	sao-paulo	Sao Paulo
Andamana	andamana	CH-11

ОБРАБОТКА ПОСУДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛЕПТОСПИР

Лептоспиры выращивают в пробирках или флаконах из белого нейтрального стекла, а при их отсутствии — в обычных пробирках.

Предназначенную для культивирования лептоспир посуду не используют для других целей.

Пробирки 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 часа в мыльный раствор одного из стиральных порошков («Новость», «Лотос» и др.);

— тщательно промывают проточной водопроводной и ополаскивают дистиллированной водой;

— заливают вымытую посуду дистиллированной водой и стерилизуют в автоклаве при 1 ати в течение часа или выдерживают двое суток при комнатной температуре, ежедневно меняя воду;

— сливают воду и посуду высушивают в сушильном шкафу;

— стерилизуют в автоклаве при 1 ати в течение 30 минут и при необходимости подсушивают в сушильном шкафу.

Пробирки из нейтрального стекла не обрабатывают в растворе соляной кислоты. Остальные этапы выполняют полностью.

Простерилизованные пробирки используют для расфасовки питательной среды в течение 10 дней. При более длительном хранении их повторно стерилизуют.

Обработку колб, флаконов, бутылей и стеклянных сифонов проводят по этой же методике.

Посуду, в которой уже выращивали лептоспиры, помещают для дезинфекции на сутки в 1%-ный раствор соляной кислоты, после чего обрабатывают по описанной схеме.

Резиновые шланги, используемые в сифонах при фильтрации и разливке среды, должны быть перед употреблением тщательно обработаны.

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

Резиновые пробки обрабатывают по этой же методике.

Обработка предметных и покровных стекол

Предметные и покровные стекла, не бывшие в употреблении, кипятят в стиральном порошке («Новость», «Лотос» и др.) в течение 30 минут, промывают в проточной воде, ополаскивают дистиллированной водой и насухо протирают ветошью.

Стекла после употребления опускают в эксикатор с 10%-ным раствором соляной кислоты. После накопления достаточного количества использованных стекол кислоту сливают, стекла промывают в

проточной водопроводной воде, кипятят в стиральном порошке, промывают водопроводной водой, ополаскивают дистиллированной водой и протирают.

Обработка агглютинационных пластин

Пластины после учета реакции опускают для обеззараживания в бак с 1%-ным раствором соляной кислоты и выдерживают не менее часа. Затем промывают в теплой мыльной воде, протирая ершиком каждую лунку. Тщательно отмывают в проточной водопроводной воде, заливают дистиллированной водой и выдерживают до следующего утра, воду сливают, пластины просушивают.

Перед постановкой реакции каждую лунку дополнительно протирают ватным тампоном.

Приложение 3

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛЕПТОСПИР

Лептоспиры выращивают на сывороточных средах. Лучшей для изготовления сред является сыворотка крови кроликов и баранов. Сыворотка крови доноров, используемая для приготовления питательной среды, не должна содержать специфических противолептоспирозных антител.

Добавляют сыворотку в количестве 5—10% к дистиллированной, водопроводной, речной, колодезной воде или фосфатному буферу. По этому принципу составлены все жидкие и полужидкие питательные среды. Способствуют росту лептоспир пептон 0,8—1%, гемоглобин 0,05%, витамины группы В, РР по 1 мг на литр среды, камполон (экстракт печени) 0,01% и др.

Изготовление фосфатно-буферных растворов — основы среды

На фосфатном буфере среду готовят только в стеклянной посуде. Сначала готовят маточные растворы из расчета: однозамещенный фосфорнокислый калий (KH_2PO_4) — 9,078 г на литр дистиллированной воды, двузамещенный фосфорнокислый натрий ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) — 11,876 г. на литр дистиллированной воды.

Маточные растворы можно хранить при температуре 2—4 °С в течение 30 дней. Из маточных растворов готовят рабочий буферный раствор из расчета:

79 мл маточного раствора двузамещенного фосфорнокислого натрия ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$);

21 мл маточного раствора однозамещенного фосфорнокислого калия (KH_2PO_4);

900 мл дистиллированной воды.

На потенциометре определяют pH буфера. Он должен быть в пределах 7,2—7,4. При отклонении pH в кислую сторону добавляют раствор двузамещенного фосфорнокислого натрия, при отклонении pH в щелочную сторону добавляют раствор однозамещенного фосфорнокислого калия.

Рабочий буферный раствор стерилизуют при температуре 120 °С в течение 30 минут.

Взятие крови и получение сыворотки

Каждая лаборатория для получения сыворотки крови с целью изготовления питательных сред должна содержать животных-доноров: 10—15 кроликов породы шиншилла или 2—3 барана.

Животные должны получать полноценный сбалансированный рацион, включающий достаточное количество витаминов и минеральных солей.

Кровь берут у кроликов из сердца в количестве 30—40 мл в 100—200-миллилитровые стерильные цилиндры или шприцем, из которого кровь переливают в стерильные пробирки.

Кровь у барана берут из яремной вены в 0,5—1,0-литровые стерильные цилиндры в количестве 400—500 мл.

Цилиндры или пробирки с кровью выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 30—40 минут, затем кровяной сгусток обводят металлической спицей и ставят в холодильник для отстаивания сыворотки на 1—2 суток. Отстоявшуюся сыворотку сливают в 100—200-миллилитровые стерильные флаконы и инактивируют в водяной бане при температуре 56—58 °С в течение часа.

Инактивированную сыворотку хранят в холодильнике при температуре 1—5 °С и используют по мере необходимости для изготовления питательной среды.

Рецепты питательных сред

Водно-сывороточная среда. Воду дистиллированную, водопроводную, колодезную или речную разливают по пробиркам (по 5 мл) и стерилизуют. После охлаждения добавляют в каждую пробирку по 0,5 мл свежей кроличьей сыворотки, инактивированной в водяной бане при температуре 56—58 °С в течение 30 минут. Среду для проверки на стерильность выдерживают в термостате при температуре 37 ° в течение 3—5 суток.

Водно-сывороточную среду в ветеринарных лабораториях готовят по модифицированной прописи.

Рабочий раствор фосфатного буфера (pH 7,2—7,4) в количестве 1,4 л разливают в бутыли с сифоном, стерилизуют в автоклаве при 0,8 ати в течение 30 минут (по С. И. Тарасову).

Фильтр Зейтца с пластиной СФ монтируют на 3—5-литровой бутыли и стерилизуют при 1 ати в течение часа.

В охлажденный буферный раствор добавляют 5—10% инактивированной сыворотки кролика или барана и (при наличии) 0,01% камполона (по Л. С. Новиковой).

Смесь фильтруют через фильтр Зейтца (по С. Я. Любашенко), для чего бутыль со средой устанавливают на 1—1,5 м выше фильтра. Профильтрованную среду расфасовывают сифоном в стерильные пробирки или флаконы.

Среду для проверки на стерильность выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 3—5 суток.

Среда Ферворта — Вольфа в модификации С. И. Тарасова

Дистиллированной воды 900 мл, хлористого натрия 0,5 г, пептона (Дифко или Витте) 1 г, маточного раствора фосфатного бу-

фера с pH 7,2 100 мл. Смесь в колбе автоклавируют при 1 ати в течение 30 минут. На следующий день дважды фильтруют через бумажный фильтр, разливают в пробирки по 5 мл и снова автоклавируют при 1 ати в течение 30 минут. В пробирки с прозрачной средой добавляют по 0,5 мл кроличьей сыворотки. Среду прогревают в водяной бане при температуре 56—58 °С в течение 30 минут.

Для проверки на стерильность пробирки со средой выдерживают в термостате при температуре 37 °С в течение 3—5 суток.

Полужидкая среда Флетчера

К 1 л дистиллированной воды добавляют 2 г агар-агара (лучше агар Дифко). Смесь кипятят 30 минут, расфасовывают по 5 мл в пробирки, автоклавируют при 0,8 ати в течение 30 минут, охлаждают, добавляют в каждую пробирку по 0,5 мл стерильной кроличьей или овечьей сыворотки, прогревают в водяной бане при температуре 56—58 °С в течение 30 минут. Среду контролируют на стерильность выдержкой в термостате при температуре 37 °С в течение 3—5 суток.

Каждая из приведенных сред обеспечивает выделение культур лептоспир из исследуемого материала и поддержание диагностических штаммов лептоспир.

gost.e-ecolog.ru