

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
СОЮЗА ССР

ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛЕПТОСПИРОЗА

ГОСТ 25386—91

Издание официальное

БЗ 9—91/1051

КОМИТЕТ СТАНДАРТИЗАЦИИ И МЕТРОЛОГИИ СССР
Москва

gost.e-ecolog.ru

Редактор *Т. И. Василенко*
Технический редактор *Г. А. Теребинкина*
Корректор *А. И. Зюбан*

Сдано в наб. 29.01.92. Подп. в печ. 11.03.92. Усл. п. л. 2,0. Усл. кр.-отт. 2,0. Уч.-изд. л. 2,10
Тираж 464.

Ордена «Знак Почета» Издательство стандартов, 123557, Москва, ГСП,
Новопресненский пер., 3.
Калужская типография стандартов, ул. Московская, 256.

УДК 636.9.001.4:006.354 Группа С79

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ СОЮЗА ССР

ЖИВОТНЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ

Методы лабораторной диагностики лептоспироза

ГОСТ 25386—91

Agricultural animals. Methods of laboratory diagnostics of leptospirosis

ОКСТУ 9809

Дата введения 01.01.93

Настоящий стандарт распространяется на методы лабораторной диагностики инфекционной болезни— лептоспироза, вызываемой возбудителем вида Leptospira interrogans.

Диагноз на лептоспироз устанавливают на основании эпизоотологических, эпидемиологических, клинических и патологоанатомических данных с обязательным подтверждением диагноза лабораторными исследованиями.

1. МЕТОД ОТБОРА ПРОБ

1.1. Материалом для исследований служит кровь, моча, органы и ткани, а также трупы мелких животных. От трупов крупных животных берут сердце, кусочки паранхиматозных 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, сердце и паренхиматозные органы плода.

1.2. Кровь для серологического исследования берут в количестве 5—10 $см^3$ не ранее чем через 5—7 сут после проявления клинических признаков болезни или через 90 сут — для крупного рогатого скота, 60 сут — для свиней и животных других видов после введения вакцины. Кровь для бактериологического исследования берут в период лихорадки на 1—7 сут болезни.

Издание официальное

© Издательство стандартов, 1992

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен без разрешения Госстандарта СССР

1.3. Мочу собирают при естественном мочеиспускании в чистые пробирки. У коров и свиноматок допускается брать мочу катетером.

Мочу микроскопируют непосредственно в хозяйствах.

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 заворачивают в целлофановый пакет.

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

1.6. Пробами для гистологического исследования служат кусочки коркового слоя почек и печени объемом не более 1 $см^3$, консервированные 10 %-ным раствором формалина.

1.7. Пробы патологического материала должны быть исследованы с момента взятия в течение 6 ч в летнее время и 10—12 ч при хранении его в охлажденном состоянии.

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

1.9. Взятые пробы помещают в ящик, опечатывают и направляют в лабораторию с нарочным (курьером).

В сопроводительном документе к пробам патологического материала указывают время гибели животного или время взятия проб при жизни.

2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Серологический метод

Метод основан на обнаружении специфических антител в крови животных реакцией микроагглютинации (РМА) и реакцией иммуноадсорбции (РИА).

2.1.1. *Реакция микроагглютинации*

2.1.1.1. *Аппаратура, материалы, реактивы*

Термостат, обеспечивающий регулирование температуры на 28—30 °С.

Центрифуга со скоростью вращения не менее 10000 об/мин.

Микроскоп биологический по ГОСТ 8074.

Конденсор темного поля.

Осветитель с точечной лампой.

Стекла предметные толщиной 0,8—1,1 мм и покровные (стекла, используемые для микроскопии, должны быть бесцветными, прозрачными, чистыми, без царапин и бликов) по ГОСТ 9284.

Пластинки с лунками или пробирки Флоринского.

Штативы.

Пипетки градуированные вместимостью 1, 2, 5 и 10 см³ по ГОСТ 20292.

Аппарат Флоринского.

Петля бактериологическая.

Натрий хлористый х. ч. по ГОСТ 4233 или ч. д. а. 0,85 %-ный раствор в дистиллированной воде. Раствор разливают во флаконы или бактериологические пробирки и стерилизуют в автоклаве при температуре 120 °С в течение 30 мин.

Антигены — живые культуры штаммов лептоспир, указаны в таблице.

Серогруппа	Серовар	Рекомендуемые штаммы*
Pomona	pomona	Pomona
Tarassovi	tarassovi	Perepelicin (Mitis Johnson)
Grippotyphosa	grippotyphosa	Moskva V (Valbuzzi)
Hebdomadis	kabura (borincana, hebdomadis)	Kabura (HS—22, Hebdomadis)
Sejroe	polonica (sejroe, wolffi, hardjo)	493 Poland (M—84, 3705, Hardjoprajitno)
Mini	szwajizak	Szwajizak
Icterohaemorrhagiae	copenhageni (icterohaemorrhagiae)	M—20, Waijnberg (RgA)
Canicola	canicola	Hond Utrecht IV
Bataviae	djatzi (bativiae)	HS—26 (Van Tienen)
Javanica	poi (javanica)	Poi (Veldrat Bataviae 46)
Australis	australis (bratislava)	Ballico (Iez Bratislava)
Autumnalis	autumnalis (rachmat)	Akijami A (Rachmat)
Ballum	ballum (castellonis)	Mus 127 (Castellon 3)
Pyrogenes	pyrogenes	Salinem
Cynopteri	cynopteri	Vleermuis 3568 (3522C)
Panama	panama	CZ—214—K
Celledoni	celledoni	Celledoni
Shermani	shermani	LT—821
Djasiman	djasiman	Djasiman
Sarmin	sarmin	Sarmin
Louisiana	louisiana	LSU—1945
Ranarum	ranarum	ISF
Manhao	manhao	L 105

* В скобках приведены штаммы-аналоги Кроме рекомендуемых могут быть использованы и другие штаммы лептоспир

2.1.1.2. *Подготовка к исследованию*

Предметные и покровные стекла, не бывшие в употреблении, кипятят в мыльном растворе в течение 30 мин, промывают про-

точной водой, ополаскивают дистиллированной водой и насухо протирают.

Стекла после употребления опускают в эксикатор с 1 %-ным раствором соляной кислоты или другим дезинфицирующим веществом. После накопления достаточного количества использованных стекол кислоту сливают, стекла промывают в проточной водопроводной воде, кипятят в мыльном растворе, промывают водопроводной водой, ополаскивают дистиллированной водой и протирают.

Пластины с лунками после проведения в них реакции опускают для обеззараживания в 1 %-ный раствор соляной кислоты и выдерживают не менее 1 ч. Затем их промывают в теплой мыльной воде, протирают ершиком каждую лунку, тщательно отмывают в проточной водопроводной воде, заливают дистиллированной водой и выдерживают до следующего утра. Утром воду сливают и пластины просушивают.

Перед постановкой реакции каждую лунку дополнительно протирают тампоном из ваты.

Для исследований используют свежую, замороженную, высушенную на фильтровальной бумаге, консервированную фенолом или борной кислотой сыворотку крови.

Для консервации сыворотки фенол добавляют в виде 5 %-ного раствора при постоянном помешивании из расчета 0,05 $см^3$ (1 капля) на каждый кубический сантиметр 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.

При консервации сыворотки методом высушивания на квадраты белой фильтровальной бумаги (5×5 см) наносят по 3—5 капель (0,05 $см^3$ каждая) сыворотки Высушивание проводят при комнатной температуре или в термостате при температуре (37±1) °С Высушенные пробы сыворотки пригодны для исследования в течение месяца

Гемолизированную, загнившую, плесневелую и проросшую сыворотку не исследуют

Сыворотку разбавляют физиологическим раствором

1) невакцинированных животных 1:25;

2) вакцинированных животных 1:50.

После добавления антигена разведения удваиваются и составляют соответственно 1:50 и 1 100.

При необходимости сыворотку разбавляют в соотношениях 1:100, 1:200, 1:400 и т. д. до титра.

Сыворотку крови вакцинированного крупного рогатого скота исследуют в РМА через 3 мес, животных других видов — через 2 мес после вакцинации

При исследовании сыворотки, высушенной на фильтровальной бумаге, вырезают одну или две капли (0,05 или 0,1 см³) сыворотки, измельчают ножницами и заливают в пробирке физиологическим раствором в объеме 2,45 или 4,9 см³, экстрагируют в течение 1 ч при температуре (37±1) °С.

Полученный экстракт используют как исходное разведение сыворотки 1:25 или 1:50.

Сыворотку крови животных при ввозе их в хозяйство и вывозе из него для племенных целей и целей воспроизводства разводят 1:25 и исследуют только в одном разведении (после добавления антигена разведение сыворотки будет соответствовать 1:50).

При изучении этиологической структуры и обследовании импортируемого скота реакцию ставят со всеми приведенными в таблице антигенами, при обследовании животных в хозяйствах с известной этиологией и при перевозках внутри страны реакцию ставят с антигенами 4—7 серогрупп (Pomona, Tarassovi, Canicola, Hebdomadis, Sejroe, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae).

Диагностические штаммы лептоспир лаборатории получают во Всесоюзном государственном научно-контрольном институте ветеринарных препаратов не реже одного раза в год.

Пригодность культуры для использования в реакции оценивают просмотром в проходящем свете и микроскопией. При достаточном накоплении лептоспир после встряхивания пробирки с культурой в среде в проходящем свете хорошо заметны муаровые волны, а в спокойном состоянии наблюдается легкая опалесценция. Наличие осадка, пленки, помутнения среды свидетельствует о прорастании посторонней микрофлоры, полная прозрачность среды — об отсутствии роста лептоспир.

В реакции используют чистые культуры лептоспир в возрасте 5—15 *сут без признаков агглютинации и лизиса с накоплением* 70—100 микробных клеток в поле зрения микроскопа при увеличении 40×1,5×7 или 40×7—10.

Через каждые 3 мес лаборатории контролируют диагностические штаммы лептоспир в реакции микроагглютинации (РМА) с групповыми агглютинирующими сыворотками.

2.1.1.3. *Проведение исследования*

Для постановки РМА разведенную сыворотку разливают мерной пипеткой или аппаратом Флоринского, начиная с большего разведения, в лунки агглютинационных пластин или пробирки по 0,1 см³ в каждую.

Сыворотку из каждого разведения разливают в отдельный ряд, состоящий из 4—23 лунок (пробирок) в зависимости от количества антигенов, используемых в реакции. Каждую культуру-антиген вносят по 0,1 см³ в 1—3 лунки в зависимости от количества разведений сыворотки. После добавления антигенов пластины встряхивают и выдерживают в термостате при 30—37 °С в течение 1 ч.

Контрольной служит смесь 0,1 см³ культуры лептоспир с 0,1 см³ физиологического раствора. Лептоспиры в контрольном варианте должны оставаться подвижными, не иметь признаков лизиса и агглютинации.

Реакцию учитывают микроскопией капель из каждой лунки в темном поле микроскопа при увеличении 20×10 или 40×7×1,5. Капли из лунок наносят на предметное стекло бактериологической петлей от большего разведения к меньшему и просматривают их без покровного стекла. Капли наносят двумя способами: бактериологической петлей диаметром 3 мм наносят на стекло сразу до 30 капель и просматривают их под микроскопом; бактериологической петлей диаметром 1 мм наносят на предметное стекло в освещенный центр поля зрения одну каплю и просматривают ее, передвигая столик на 2—3 мм, и рядом с первой наносят и учитывают вторую каплю. Перед взятием каждого нового антигена петлю прокаливают и охлаждают.

Результаты реакции оценивают в крестах:

++++ — агглютинированы 100 % лептоспир;
+++ — » 75 % »
++ — » 50 % »
+ — » 25 % »
— — агглютинация отсутствует.

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

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

2.1.1.4. *Оценка результатов*

Положительной считают РМА, оцененную на два креста и более при отсутствии агглютинации в контроле.

Наличие специфических антител в сыворотке крови животных в титре 1:50 у невакцинированных — 1:100 у вакцинированных и выше свидетельствует об инфицировании данной особи лептоспирами и возможном лептоспироносительстве.

РМА специфична в любом разведении, а наличие антител в любом титре свидетельствует об унифицировании данной особи лептоспирами и возможном лептоспироносительстве.

По результатам серологических исследований возбудителями лептоспироза считают лептоспиры той серологической группы, к которой обнаружены антитела в наиболее высоком титре.

Необходимо учитывать, что в сыворотке крови свиней, лошадей, крупного и мелкого рогатого скота при исследовании в РМА обнаруживают в 5—15 % случаев антитела в наиболее высоком

титре к лептоспирам: Autumnalis, Cynopteri, Bataviae, Pyrogenes, Australis, которые не выделяют у сельскохозяйственных животных. Такие реакции следует рассматривать как межгрупповые.

Лептоспиры названных серогрупп могут быть признаны возбудителями лептоспироза у сельскохозяйственных животных только после выделения в чистой культуре или подтверждения их роли исследованием пробы сыворотки в реакции иммуноадсорбции.

В случае выявления реакций с лептоспирами необычных для сельскохозяйственных животных серогрупп проводят повторное исследование сыворотки крови в РМА с интервалом 10—12 сут с целью освобождения от межгрупповых реакций без проведения иммуноадсорбции.

2.1.2. *Реакция иммуноадсорбции*

2.1.2.1. *Аппаратура, растворы и антигены*

Для проведения исследования применяют аппаратуру, растворы и антигены, указанные в п. 2.1.1.1.

2.1.2.2. *Проведение исследования*

В реакции иммуноадсорбции изучают пробы сыворотки животных, агглютинирующие лептоспир нескольких серологических групп в разных титрах или имеющие наиболее высокий титр по отношению к лептоспирам, ранее не известным в качестве возбудителя лептоспироза у сельскохозяйственных животных.

Для проведения адсорбции выращивают во флаконах вместимостью 0,5—1,0 дм^3 все штаммы лептоспир, с которыми данная проба сыворотки дала реакцию агглютинации, 5—7 сут культуры лептоспир осаждают центрифугированием с частотой вращения 10000 об/мин в течение 30 мин. Сливают надосадочную жидкость, осадок подсушивают, 0,1 см^3 исследуемой сыворотки смешивают с 0,9 см^3 физиологического раствора и дробно в три приема с интервалом 10 мин добавляют к осадку антигена, суспендируя его после каждой порции разведенной 1:10 сыворотки. Смесь выдерживают в течение 24—48 ч при 1—5 °С и отделяют сыворотку центрифугированием при 10000 об/мин в течение 30 мин. Адсорбированную сыворотку проверяют в РМА на наличие остаточных антител к штамму-адсорбенту, а затем при отрицательных результатах исследуют с лептоспирами всех серогрупп, с которыми реагировала сыворотка до адсорбции.

Для сокращения объема работы сыворотку целесообразно в начале адсорбировать лептоспирами, являющимися частыми возбудителями болезни у животных данного вида.

2.1.2.3. *Оценка результатов*

В процессе адсорбции лептоспиры, являющиеся возбудителем инфекции у данной особи, извлекают из сыворотки антитела к лептоспирам всех серологических групп, в то время как антитела к возбудителю болезни не адсорбируются из сыворотки гетерологичными типами лептоспир.

Возбудителями инфекции являются лептоспиры той серогруппы, антигены которой извлекают из сыворотки антитела к лептоспирам всех серологических групп.

2.1.3. *Учет результатов серологических исследований*

2.1.3.1. По результатам серологических исследований диагноз на лептоспироз считают установленным, а хозяйство (ферму, отделение и т. д.) неблагополучным по лептоспирозу, если специфические антитела обнаружены в сыворотке крови при однократном исследовании в РМА в титре 1:100 у вакцинированных и 1:50 и выше у невакцинированных более чем у 20 % обследованных животных.

2.1.3.2. Лептоспироз считают причиной абортов при обнаружении антител в сыворотке крови абортированного плода и предположительно при высоком титре антител (1:2500 и более) в группе абортированных животных и низком титре (до 1:500) или отрицательной реакции в группе здоровых животных.

2.1.3.3. Лептоспиры серогрупп Autumnalis, Cynopteri, Bataviae, Pyrogenes, Australis, Ballum могут быть признаны возбудителями лептоспироза животных только после выделения из органов павших животных или подтверждении их роли исследованием пробы сыворотки в реакции иммуноадсорбции.

2.2. Бактериологический метод

Метод заключается в обнаружении лептоспир в исследуемом материале путем микроскопии в темном поле микроскопа, иммунофлуоресцентным методом, выделения культур лептоспир в специальных средах, постановке биологических проб на лабораторных животных, идентификации и дифференциации выделенных культур.

2.2.1. *Аппаратура, материалы, реактивы*

Для проведения исследования применяют аппаратуру, материалы и растворы, указанные в п. 2.1.1, и дополнительно:

Колбы или бутыли вместимостью 1, 2, 3, 5 дм^3.

Сифоны с резиновыми шлангами.

Фильтры Зейтца или другие аналогичного типа.

Сыворотку крови кролика или барана, не содержащую специфических противолептоспирозных антител.

Среду сывороточную на фосфатном буфере.

Среду Уленгута (водно-сывороточную среду).

Среду Ферворта-Вольфа (в модификации С. И. Тарасова).

Среду Флетчера полужидкую.

Среду Кортгофа.

Среду синтетическую безбелковую Шенберга.

Среду твин (полисорбат) альбуминовую Эллингаузена.

Среду Эллингаузена.

Среду твин-альбумин-сывороточную Эллиса.

Среду усовершенствованную элективную для выделения лептоспир.

Среду избирательную с 5-флюороурацилом для выделения лептоспир.

Среду плотную Кокса.

2.2.2. *Подготовка к испытанию*

2.2.2.1. *Приготовление сыворотки крови кролика или барана*

Для приготовления сыворотки используют:

кровь кролика или барана;

цилиндры стерильные вместимостью 100 и 200 см³ по ГОСТ 1770;

шприцы по ГОСТ 22967;

пробирки бактериологические по ГОСТ 1770.

Сыворотку готовят следующим образом: кровь у кролика берут из сердца в количестве 30—40 см³ в стерильные цилиндры вместимостью 100—200 см³ или шприцем, из которого кровь переливают в стерильные пробирки, у барана — из яремной вены в стерильные цилиндры вместимостью 0,5—1,0 дм³ в количестве 400—500 см³.

Цилиндры или пробирки с кровью выдерживают при (37±1) °С в течение 30—40 мин, затем кровяной сгусток обводят металлической спицей и ставят в холодильник для отстаивания сыворотки на 1—2 сут. Отстоявшуюся сыворотку сливают в стерильные флаконы вместимостью 100—200 см³ и инактивируют в водяной бане при 56—58 °С в течение 1 ч.

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

2.2.2.2. *Приготовление сывороточной среды на фосфатном буфере*

Для приготовления среды используют:

калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 10075;

воду дистиллированную по ГОСТ 6709;

натрий фосфорнокислый двузамещенный по ГОСТ 11773.

Среду готовят следующим образом: рабочий раствор фосфатного буфера (pH 7,2—7,4) в количестве 1,4 дм³ разливают в бутыли с сифоном, стерилизуют в автоклаве при 120 °С в течение 30 мин.

Раствор фосфатно-буферный готовят следующим образом: в стеклянных колбах растворяют отдельно 9,078 г однозамещенного фосфорнокислого калия в 1 дм³ дистиллированной воды и 11,879 г двузамещенного фосфорнокислого натрия в 1 дм³ дистиллированной воды. Эти маточные растворы хранят при 2—4 °С до 30 сут.

Для получения рабочего буферного раствора берут 79 см³

маточного раствора двузамещенного фосфорнокислого натрия, 21 см³ маточного раствора однозамещенного фосфорнокислого калия и 900 см³ дистиллированной воды.

Буфер должен иметь pH 7,2—7,4. При отклонении pH в кислую сторону добавляют раствор двузамещенного фосфорнокислого натрия. При отклонении pH в щелочную сторону добавляют в раствор однозамещенного фосфорнокислого калия. Рабочий буферный раствор стерилизуют при 120 °С в течение 30 мин.

В охлажденный буферный раствор добавляют 5—10 % инактивированной сыворотки крови кролика или барана.

Смесь фильтруют через фильтр Зейтца или другой. Профильтрованную среду расфасовывают сифоном в стерильные пробирки или флаконы.

Среду для проверки на стерильность выдерживают при (37±1) °С в течение 3—5 сут.

2.2.2.3. *Приготовление среды Уленгута (водно-сывороточной среды)*

Для приготовления среды используют:

воду дистиллированную по ГОСТ 6709 или колодезную, или речную, или водопроводную;

пробирки бактериологические по ГОСТ 1770;

сыворотку крови кроликов инактивированную.

Среду готовят следующим образом: воду дистиллированную, водопроводную, колодезную или речную разливают в пробирки по 5 см³ и стерилизуют, охлаждают, добавляют в каждую пробирку по 0,5 см³ свежей кроличьей инактивированной сыворотки. Среду для проверки на стерильность выдерживают при (37±1) °С в течение 3—5 сут.

2.2.2.4. *Приготовление среды Ферворта-Вольфа (в модификации С. И. Тарасова)*

Для приготовления среды используют:

воду дистиллированную по ГОСТ 6709;

натрий хлористый по ГОСТ 4233;

пептон (Дифко или Витте);

бумагу фильтровальную по ГОСТ 12026;

пробирки бактериологические по ГОСТ 1770;

сыворотку крови кролика;

баню водяную.

Среду готовят следующим образом. к 900 см³ дистиллированной воды добавляют 0,5 г хлорида натрия, 1 г пептона (Дифко или Витте), 100 см³ маточного раствора фосфатного буфера с pH 7,2—7,4. Смесь в колбе автоклавируют при 120 °С в течение 30 мин. На следующий день дважды фильтруют через бумажный фильтр, разливают в пробирки по 5 см³ и снова автоклавируют при 120 °С в течение 30 мин. В пробирки с прозрачной сре-

дой добавляют по 0,5 см³ кроличьей сыворотки. Среду прогревают в водяной бане при 56—58 °С в течение 30 мин.

Для проверки на стерильность пробирки со средой выдерживают при (37±1) °С в течение 3—5 сут.

2.2.2.5. *Приготовление полужидкой среды Флетчера*

Для приготовления используют:

воду дистиллированную по ГОСТ 6709;

агар-агар микробиологический по ГОСТ 17206 или пищевой по ГОСТ 16280, или Дифко;

пробирки бактериологические по ГОСТ 25336;

сыворотку крови кролика или барана;

баню водяную.

Среду готовят следующим образом: к 1 дм³ дистиллированной воды добавляют 2 г агар-агара (лучше агар Дифко). Смесь кипятят 30 мин, расфасовывают по 5 см³ в пробирки, автоклавируют при 120 °С в течение 30 мин, охлаждают, добавляют в каждую пробирку по 0,5 см³ стерильной кроличьей или овечьей сыворотки, прогревают в водяной бане при 56—58 °С в течение 30 мин. Среду контролируют на стерильность выдержкой при (37±1) °С в течение 3—5 сут.

2.2.2.6. *Приготовление среды Кортгофа*

Для приготовления среды используют:

воду дистиллированную по ГОСТ 6709;

пептон Витте;

натрий хлористый по ГОСТ 4233;

натрия гидрокарбонат по ГОСТ 199;

калий хлористый по ГОСТ 4234;

кальций хлористый по ГФХ;

калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 10075;

натрий фосфорнокислый двузамещенный по ГОСТ 11773;

аппарат Коха;

бумагу фильтровальную по ГОСТ 12026;

пробирки бактериологические по ГОСТ 1770.

Среду готовят следующим образом: к 500 см³ дистиллированной воды добавляют 0,40 г пептона Витте, 0,70 г хлорида натрия ($NaCl$), 0,01 г гидрокарбоната натрия ($NaHCO_3$), 0,02 г хлорида калия (KCl), 0,02 г хлорида кальция ($CaCl_2$), 0,09 г калия фосфорнокислого однозамещенного (KH_2PO_4), 0,48 г натрия фосфорнокислого двузамещенного ($Na_2HPO_4 \times 2H_2O$). Раствор прогревают в аппарате Коха при 100 °С в течение 20 мин, охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр и еще раз прогревают при 100 °С в течение 30 мин. После того как раствор остынет, добавляют 8 % свежей сыворотки. Среду разливают по 5—8 см³ в пробирки и прогревают в водяной бане при 56 ° С в течение 1 ч.

2.2.2.7. *Приготовление безбелковой среды Шенберга*

Для приготовления среды используют:
воду дистиллированную по ГОСТ 6709;
натрий фосфорнокислый двузамещенный по ГОСТ 11773;
калий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 10075;
магний сернокислый по ГОСТ 4523;
сульфат железа (II) аммоний;
кислоту этилендиаминтетрауксусную;
твин-80;
твин-60;
глицерин по ГОСТ 6259;
L — аспарагин;
витамин B_{12};
витамин B_1;
кальция карбонат по ГОСТ 3159;
кислоту соляную по ГОСТ 3118;
уголь активированный древесный;
фильтр мембранный.

Среду готовят следующим образом: к 1 дм³ дистиллированной воды добавляют 0,531 г натрия фосфорнокислого двузамещенного (Na_2HPO_4), 0,069 г калия фосфорнокислого однозамещенного (KH_2PO_4), 0,150 г сульфата магния ($MgSO_4 \times 7H_2O$), 0,006 г сульфата железа (II) — аммония $FeSO_4 \cdot (NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$, 0,004 г Ca^{++}, 0,010 г этилендиаминтетрауксусной кислоты, 0,050 г твина-80, 0,200 г твина-60, 0,200 г глицерина, 0,500 г L-аспарагина, 0,01 г витамина B_{12} и 0,001 г витамина B_1. Ca^{++} берут в виде карбоната кальция и обрабатывают раствором соляной кислоты, витамин B_1 добавляют в среду асептически после стерилизации. Среду нагревают до кипения, фильтруют, расфасовывают и стерилизуют при 121 °С в течение 15 мин, конечное значение pH составляет 7,4—7,6.

Для детоксикации добавляют к питательной среде сыворотку крови или альбумин или соединяют твин с 0,5 частями по массе мелкого порошка древесного угля. Для этого 20 г отобранного полисорбата разводят в 200 см³ дистиллированной воды при комнатной температуре и перемешивают раствор до достижения однородной консистенции. При помешивании к водному раствору медленно добавляют 40 г активированного древесного угля. Отношение твина к древесному углю может варьироваться от 1:6 до 6:1. Помешивание продолжают до 18 ч при 22—25 °С, далее отстаивают уголь в течение 18 ч при 4 °С. Раствор полисорбата осторожно отделяют от осадка древесного угля, центрифугируют в течение 1 ч при 10000 об/мин, фильтруют через мембранный фильтр для удаления оставшихся мелких частиц угля, хранят раствор полисорбата при минус 20 °С.

2.2.2.8. *Приготовление твин (полисорбат) альбуминовой среды Эллингаузена*

Для приготовления среды используют:
аммоний хлористый по ГОСТ 3773;
цинк сернокислый по ГОСТ 4174;
кальций хлористый по ГВХ;
магний хлористый по ГОСТ 4209;
железо сернокислое по ГОСТ 4148;
медь сернокислую по ГОСТ 4165;
глицерин по ГОСТ 6259;
твин-80;
витамин B_1;
витамин B_{12};
воду дистиллированную по ГОСТ 6709;
натрий фосфорнокислый однозамещенный;
калий фосфорнокислый;
натрий хлористый по ГОСТ 4233,
тиамин;
альбумин бычий;
натрия гидроокись.

Для приготовления среды готовят исходные водные растворы грамм на 100 см³ воды): хлорида аммония (NH_4Cl) — 25, сульфата цинка ($ZnSO_4 \times 7H_2O$) — 0,4, хлорида кальция ($CaCl_2 \times 2H_2O$) — 1,0, хлорида магния ($MgCl_2 \times 6H_2O$) — 1,0, сульфата железа ($FeSO_4 \times 7H_2O$) — 0,5, сульфата меди ($CuSO_4 \times 5H_2O$) — 0,3, глицерина — 10, твина-80 — 10, витамина B_1 — 0,5, витамина B_{12} — 0,02. Растворы хранят в замороженном состоянии.

Основную среду готовят добавлением к 997 см³ дистиллированной воды натрия фосфорнокислого однозамещенного (Na_2HPO_4) — 1,0 г или ($Na_2HPO_4 \times 2H_2O$) — 1,2535 г, калия фосфорнокислого (KH_2PO_4) — 0,3 г, хлорида натрия ($NaCl$) — 1,0 г и исходных растворов: хлорида аммония — 1,0 см³, тиамина — 1,0 см³, глицерина 1,0 см³, pH доводят до 7,4, стерилизуют в автоклаве при 121 °С в течение 20 мин.

Альбуминово-твиновая добавка представляет собой 10 %-ный бычий альбумин, фракция V, 20 г которой добавляют к 100 см³ стерильного бидистиллята, при постоянном помешивании, добавляют исходные растворы: хлоридов кальция и магния по 3,0 см³, сульфата цинка — 2,0 см³, сульфата меди — 0,2 см³, сульфата железа — 20,0 см³, витамина B_{12} — 2,0 см³, твина-80 — 25,0 см³, воды до 200 см³. Доводят pH до 7,4, используя гидроксид натрия, фильтруют через фильтр миллипор (0,22 микрон) или Зейтца (0,2—0,3 микрон). Добавку можно хранить при (4±1) °С или замороженной при минус 20 °С.

Среду для культивирования готовят добавлением 1 части альбуминовотвиновой добавки к 9 частям основной среды в асеп-

тических условиях, фильтруют, расфасовывают по пробиркам или флаконам.

2.2.2.9. *Приготовление среды Эллингаузена*

Для приготовления среды используют:

цинк сернокислый по ГОСТ 4174;

железо сернокислое по ГОСТ 4148;

воду деионизированную;

L-цистин;

раствор тиамина гидрохлорида — 0,2 %-ный раствор;

полисорбат—80;

витамин B_{12};

альбумин сывороточный;

натрий фосфорнокислый однозамещенный по ГОСТ 245;

калий фосфорнокислый по ГОСТ 4198;

натрий хлористый по ГОСТ 4233;

аммоний хлористый по ГОСТ 3773;

медь сернокислую по ГОСТ 4165.

Готовят полную среду смешиванием 800 см³ основной среды и 200 см³ буферного раствора альбумина сыворотки крови крупного рогатого скота.

Основную среду готовят следующим образом. Смешивают 40 см³ фосфатного буфера, 50 см³ солевого раствора, 1 см³ 0,03 %-ного раствора сульфата меди, 10 см³ 0,04 %-ного раствора сульфата цинка, 0,05 см³ сульфата железа ($FeSO_4 \times 7H_2O$), растворенного в 20—40 см³ деионизированной воды, 0,2 г цистина, 0,1 см³ 0,2 %-ного раствора тиамина гидрохлорида, 1,2 см³ полисорбата-80 (растворенного в 5—10 см³ воды), 0,2 см³ раствора витамина B_{12} (1000 см³), доводят деионизированной водой до 1000 см³.

После добавления L-цистина среду перемешивают 20 мин, дают отстояться 20 мин. Смесь очищают фильтрованием. Затем добавляют остальные компоненты. Среду перемешивают, разливают в стеклянные контейнеры, автоклавируют.

Буферный раствор альбумина сыворотки крупного рогатого скота готовят смешиванием 40 см³ фосфатного буфера и 50 г альбумина сыворотки крови крупного рогатого скота, фракция V в порошке (либо эквивалентное количество в стерильном растворе), деионизированную воду добавляют до 1000 см³. Стерилизуют фильтрованием.

Растворы готовят следующим образом:

а) фосфатный буфер: натрий фосфорнокислый (Na_2HPO_4) — 16,6 г, калий фосфорнокислый (KH_2PO_4) — 2,17 г смешивают, добавляют деионизированной воды до 1000 см³;

б) солевой раствор: хлорид натрия (NaCl): 36,0 г, хлорид аммония (NH_4Cl) — 5,35 г, сульфат магния ($MgSO_4 \times 6H_2O$) — 3,8 г, деионизированная вода — до 1000 см³;

в) 0,03 %-ный раствор сульфата меди: сульфат меди ($CuSO_4 \times 5H_2O$) — 0,3 г, деионизированная вода — до 1000 см³;

г) 0,04 %-ный раствор сульфата цинка: сульфат цинка ($ZnSO_4 \times 7H_2O$) — 0,4 г, деионизированная вода — до 1000 см³;

д) 0,2 %-ный раствор тиамина гидрохлорида: тиамин гидрохлорид 0,2 г, деионизированная вода — до 1000 см³.

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 B_{12};
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 см³ и готовят исходные растворы каждый отдельно: сульфат цинка ($ZnSO_4 \times 7H_2O$) — 0,4 г, хлорид кальция ($CaCl \times 2H_2O$ — 1,0 г, глицерин — 10,0 см³, хлорид аммония (NH_4Cl) — 25,0 г, витамин B_{12} — — 0,02 г, тиамин — 0,5 г, сульфат магния ($MgSO_4$) — 0,3 г. Растворы хранят при (4±1) °С до 30 сут;

б) перед употреблением готовят следующие растворы в дистиллированной воде: сульфат железа ($FeSO_4 \times 7H_2O$) — 0,5 г на 100 см³, твин-80 — 20 см³ на 180 см³, твин-40 — 20 см³ на 180 см³,

5-флюорацил — 1,0 г на 100 см³, нилидиксовая кислота — 1,0 г на 100 см³;

в) основную часть среды готовят растворением 10,0 г бычьего альбумина, 1,0 г лактальбумина-гидролизата Дифко в 50 см³ стерильной дистиллированной воды. Размешивают до полного растворения и добавляют исходные растворы: тиамина — 1 см³, хлорида кальция — 1 см³, хлорида магния — 1 см³, сульфата цинка — 1 см³, сульфата магния — 0,1 см³, сульфата железа — — 10 см³, витамина B_{12} — 1 см³; твина-80 — 9 см³, твина-40 — — 3—5 см³. Перемешивают в течение 1 ч до полного растворения компонентов, устанавливают pH — 7,4 добавлением 10 %-ного раствора гидроокиси натрия. Добавляют дистиллированную воду до 96 см³ и 4 см³ кроличьей сыворотки свежевзятой и инактивированной при 56 °С в течение 30 мин, 20 см³ флюорацила и 20 см³ раствора нилидиксовой кислоты.

Для получения 1 дм³ готовой к использованию среды в 988 см³ дистиллированной воды растворяют гидроортофосфат натрия (Na_2HPO_4 — 1 г, дигидроортофосфат калия (KH_2PO_4) — 0,3 г, хлорид натрия (NaCl) — 1 г, хлорид аммония (NH_4Cl) — 1 см³, глицерин — 1 см³. Размешивают до полного растворения, устанавливают pH — 7,4. Удаляют 140 см³ среды, добавляют 1,5 г очищенного агара и стерилизуют при 121 °С в течение 20 мин, охлаждают до 55 °С и вносят 140 см³ основной среды. Фильтруют через мембранные фильтры под давлением (0,22 микрон) и разливают в пробирки.

2.2.2.11. *Приготовление усовершенствованной элективной 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 сернокислый по ГОСТ 4174;

среду жидкую основную твин-альбуминовую;

натрий уксуснокислый по ГОСТ 199;

альбумин сывороточный;

витамин B_{12} по ГФ X;

магний сернокислый по ГОСТ 4523;

медь сернокислую по ГОСТ 4165;

твин-80;

пируват натрия;

агар-агар;

железо сернокислое по ГОСТ 4148;

актибион;

бацитрацин;

5-флюорацил;

неомицинсульфат;
полимиксин В;
рифампицин;
сыворотку крови кролика.

Состав среды следующий: (грамм на 100 см³): глицерин — 0,10, хлорид кальция ($CaCl_2 \times 2H_2O$) — 0,016, хлорид магния ($MgCl_2 \times 6H_2O$ — 0,016, сульфат цинка ($ZnSO_4 \times 7H_2O$) — 0,004, основная жидкая твин-альбуминовая среда — 2,3, B_{12} — 0,00002, сульфат магния ($MgSO_4 \times 4H_2O$) — 0,001, сульфат меди ($CuSO_4 \times 5H_2O$) — 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 ($FeSO_4 \times 7H_2O$) — 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/см³ 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 см³ дистиллированной воды добавляют 100 см³ 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 см³, 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, бутыли, 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 $см^3$ 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 40×7—10 или 20×1,5×7, а для более детального рассмотрения препарата — при увеличении 40×10—15 или 40×1,5×10.

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 щелочной 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, 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 интерспир.

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 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.

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, околосердечный 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 см³ питательной среды вносят 0,5—1,0 см³ 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 сывороточной среде до максимального накопления.

В пробирку на культуру наслаивают 1—1,5 см³ стерильного вазелинового масла или культуру расфасовывают в стерильные ампулы из нейтрального стекла вместимостью 1—5 см³ 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 бактерийные фильтры или пересевом на плотные питательные среды.

Для очистки биологическим методом загрязненную культуру вводят внутрибрюшинно морской свинке или крольчонку в дозе 1—2 см³, хомяку или мыши — 0,5 см³. 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 посевы культивируют при (28±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. Сероварианту 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-эталонами, 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-эталоны 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 40×1,5×10. 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 $см^3$ 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 сероваріантную принадлежность культур лептоспир также устанавливают методом моноклональных антител. Для чего моноклональные антитела с серогрупповой или сероваріантной специфичностью соединяют с адекватным количеством испытуемого антигена, пластины инкубируют при (37±1) °С 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 сероваріантную 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 Pomona 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^3, крольчатам — от 2 до 3 см^3.

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, транссудат 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, коньюктивитом, 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 $см^3$, средней вирулентности — 0,2—0,4 $см^3$ и слабовирулентные — 0,5—1,0 $см^3$.

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, перикардиальной и спинномозговой жидкостях, моче больных и павших животных, органах и тканях абортированного 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 pH=7,4—7,6 до рабочего разведения, указанного на этикетке ампулы, переносят в стерильную пробирку, консервируют мертиолятом в соотношении 1:10000 (0,1 $см^3$ 1 %-ного раствора мертиолята на 10 $см^3$ 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 $см^3$ дистиллированной воды 10 $см^3$ 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 $дм^3$ 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 $см^2$, 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 $см^3$ 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 (pH=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 (pH=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^3) 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 абортов 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 Левадити)*

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±1) °С. Раствор азотнокислого серебра готовят на свежей дистиллированной воде и используют из расчета 15 $см^3$ 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 $см^3$, формалин чистый — 5 $см^3$. Раствор готовят из расчета 20—25 $см^3$ 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±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 светлопольным конденсором при увеличе-

нии 90×7—10. При неудовлетворительных результатах импрегнации лептоспир готовят препараты из других одновременно приготовленных блоков.

2.3.3. *Оценка результатов*

При микроскопии гистосрезов лептоспиры обнаруживают чаще на поверхности эпителия и в просветах мочевых канальцев почек, несколько реже — цитоплазме эпителия, преимущественно 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 слабо заметны. Окружающая ткань окрашивается в буровато-желтый цвет.

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

Лептоспироз считают причиной абортов, если лептоспиры обнаружены в гистосрезе из органов абортированного (мертворожденного 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, на который дана ссылка	Номер пункта	Обозначение НТД, на который дана 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; 2.2.2.11
ГОСТ 245—76	2.2.2.9; 2.2.2.11		
ГОСТ 1770—74	2.2.2.1; 2.2.2.3; 2.2.2.4; 2.2.2.6	ГОСТ 6259—75	2.2.2.7; 2.2.2.8, 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; 2.2.2.4; 2.2.2.5; 2.2.2.6; 2.2.2.7; 2.2.2.8; 2.2.2.10; 2.2.2.13
ГОСТ 3159—76	2.2.2.7		
ГОСТ 3773—72	2.2.2.8; 2.2.2.9; 2.2.2.10		
ГОСТ 4165—78	2.2.2.8; 2.2.2.9; 2.2.2.11	ГОСТ 8074—82	2.1.1.1
ГОСТ 4174—77	2.2.2.8; 2.2.2.9; 2.2.2.10; 2.2.2.11	ГОСТ 9284—75	2.1.1.1
		ГОСТ 10075—75	2.2.2.2; 2.2.2.6; 2.2.2.7
ГОСТ 4148—78	2.2.2.8; 2.2.2.9; 2.2.2.10; 2.2.2.11	ГОСТ 11773—76	2.2.2.2; 2.2.2.6; 2.2.2.7
ГОСТ 4198—75	2.2.2.9; 2.2.2.10		
ГОСТ 4209—77	2.2.2.8; 2.2.2.10; 2.2.2.11	ГОСТ 12026—76	2.2.2.4; 2.2.2.6
		ГОСТ 13805—76	2.2.2.13
ГОСТ 4233—77	2.1.1.1; 2.2.2.4; 2.2.2.6; 2.2.2.8; 2.2.2.9; 2.2.2.10	ГОСТ 16280—88	2.2.2.5
		ГОСТ 17206—84	2.2.2.5; 2.2.2.13
		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

gost.e-ecolog.ru