

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ**

**«РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ»**

Аграрно-технологический институт  
Департамент ветеринарной медицины

«Допустить к защите»

Директор учебного департамента  
«Ветеринарной медицины»

Ватников Ю.А.

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2021 г.

**Выпускная квалификационная работа магистра**

Направление 36.04.01 «Ветеринарно-санитарная экспертиза»

**ТЕМА: ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И  
ВЫДЕЛЕНИЯ ЛЕПТОСПИР В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ**

Выполнил студент: Тимохина Анна Сергеевна

Группа: СВЭмд-01-19

Студ. Билет № 1032193276

Руководитель выпускной  
квалификационной работы  
Друковский С.Г. доц. к.в.н.



Автор



г. Москва

2021г.

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	4
1. Общие сведения о лептоспирозе	7
1.1 Патогенез при лептоспирозе	9
1.2 Морфология и физиология лептоспир	10
1.3 Эпизоотическая ситуация и распространение лептоспироза	15
1.4 Питательные среды для культивирования лептоспир	18
1.5 Особенности диагностики лептоспироза	20
1.6 Лабораторная диагностика лептоспироза	22
1.6.1 Микроскопия лептоспир	23
1.6.2 Выделение возбудителя лептоспироза в лабораторных условиях	26
1.6.3 Очистка бактериальной культуры от посторонней микрофлоры	28
1.6.4 Диагностика лептоспироза методом ПЦР	30
1.6.5 Применение серологических методов при работе с возбудителем лептоспироза	34
1.7 Заключение к литературному обзору	41
2 Собственные исследования	43
2.1.1 Материалы и методы исследования	43
2.1.2 Изучение влияния концентрации сыворотки в питательной среде на рост бактериальной культуры	44
2.1.3 Изучение влияния рН питательной среды на рост лептоспир	50
2.1.4 Изучение выделения лептоспир от животных в зависимости от возраста заражающей культуры	54
2.1.5 Изучение ростовых свойств сывороточной буферной среды без сыворотки кролика	61
2.1.6 Типизация выделенной культуры в РМА	66

2.2 Результаты исследований	71
2.2.1 Влияние концентраций сыворотки в питательной среде на рост бактериальной культуры	71
2.2.2 Влияние рН питательной среды на рост лептоспир	74
2.2.3 Зависимость выделения лептоспир из крови животных от возраста заражающей культуры	76
2.2.4 Ростовые свойства сывороточной буферной среды без сыворотки кролика	80
2.2.5 Типизация выделенной культуры лептоспир реакцией микроагглютинации	84
Заключение	86
ВЫВОДЫ	88
Список использованной литературы	89

## ВВЕДЕНИЕ

Лептоспироз — это инфекционное природноочаговое нетрансмиссивное антропозоонозное заболевание бактериальной природы, поражающее многие виды животных и птиц. Важно отметить особенность формирующегося при лептоспирозе иммунитета, несмотря на значительную продолжительность и напряженность, он обладает высокой специфичностью к конкретному серотипу возбудителя. [25]

Возбудитель — бактерии семейства *Leptospiraceae*, из порядка *Spirochaetales*. Лептоспиры обладают широким спектром резервуарных хозяев, многие виды способны длительное время сохраняться в водной среде, особенно в непроточных водоемах и в заболоченной местности. Для них характерен постоянный рост числа сероваров, подобно сальмонеллам и вирусам гриппа. Поэтому необходимо контролировать этиологическую структуру лептоспироза, для выявления адаптации возбудителя к новым хозяевам, и своевременной коррекции планов лечебных и профилактических мероприятий. [40]

*L. interrogans* широко распространены. В настоящее время, лептоспироз регистрируется во многих странах мира, таких как Австралия, США, Германия, страны Африки и т.д.. В Российской Федерации нет регионов благополучных по лептоспирозу крупного рогатого скота. По лептоспирозу свиней благополучна только Чувашская республика.

Заболевание приносит серьезный экономический ущерб: высокая смертность животных - до 45%, снижение удоя на 22-37%, потеря массы до 28%, падеж молодняка составляет до 90%, выбраковка сырья животного происхождения на мясокомбинатах, затраты на лечебно-профилактические мероприятия. Для минимизации убытков необходимо своевременное проведение профилактических и противоэпизоотических мероприятий,

быстрая и точная диагностика, выявление всех больных и подозрительных животных. [31, 8]

Лептоспироз может протекать в сверхострой, острой, подострой, хронической, латентной форме. Клиническая картина весьма переменчива, возможно бессимптомное лептоспиросительство, это затрудняет своевременную диагностику. При подозрении на лептоспироз диагноз в обязательном порядке подтверждают лабораторными методами. Существует несколько методов лабораторной диагностики лептоспироза: микроскопический; бактериологический; биопроба; серологические, куда входят ИФА, РМА, РА; ПЦР. [38] У перечисленных методов есть как преимущества, так и недостатки. Микроскопия не всегда информативна, если возбудителя в исследуемом материале мало. Также, наличие лептоспир в моче еще не говорит о болезни, т.к. для лептоспироза характерно продолжительное носительство. В последние годы написано большое количество работ по применению ПЦР для диагностики лептоспироза, разработаны различные высокочувствительные системы не имеющие сертификации. [13]

Помимо вопроса диагностики, существует проблема очистки загрязненной посторонней микрофлорой культуры: медленный рост и требовательность к составу питательной среды делает лептоспир неконкурентоспособными. При очистке на плотных питательных средах процесс занимает до месяца. Постановка биопробы сокращает это время, но подобные манипуляции возможны только в специализированных лабораториях и не всегда эффективны. От чего возникла необходимость усовершенствовать существующие лабораторные методы, для успешного применения их на практике. [27]

На основании вышеизложенного была определена тема научно-исследовательской работы, которая заключается в оптимизации методов культивирования и выделения лептоспир в лабораторных условиях. Цель которой: совершенствование существующих методов диагностики с учетом

современных достижений в области биотехнологий и адаптация их для успешного применения на практике.

Для достижения поставленной цели определены следующие задачи:

- 1) Изучение влияния концентрации сыворотки в питательной среде на рост бактериальной культуры;
- 2) Изучение влияния рН питательной среды на рост лептоспир;
- 3) Изучение зависимости выделения лептоспир из крови животных от возраста заражающей культуры;
- 4) Изучение ростовых свойств сывороточной буферной среды без сыворотки кролика;
- 5) Типизация выделенной культуры лептоспир в РМА;

## 1. Общие сведения о лептоспирозе

Лептоспироз относится к наиболее широко распространенным зоонозам несмотря на то, что входит в перечень забытых болезней списка ВОЗ. Различные серовары патогенных лептоспир адаптированы к определенным видам хозяев, при этом за ними отмечают тенденцию к преодолению барьера гостальной специфичности. [32, с.9.]

*L.icterohaemorrhagiae* в 1993 году выделяемая от крыс, полевко-экономок, свиней и крупного рогатого скота, в 1999 году выделена от собак, а в 2004 году получены сведения о встречаемости этого серовара в патологическом материале от лошадей, кошек и мелкого рогатого скота. *L. canicola* в 2004 году регистрировалась у крупного рогатого скота, собак и лошадей, в 2011 году выделена от мелкого рогатого скота и свиней, по данным 2016 года поражает кошек. *L. romona* в 1999 году выявлена у свиней, 2002 году встречается среди крупного рогатого скота, 2011 поражает МРС, переносится собаками, в 2016 году отмечены случаи заражения лошадей. *L. tarassovi* в 1999 году регистрируемая у свиней, в 2002 году среди КРС, а в 2004 году у лошадей. *L. grippotyphosa* в 1999 году переносилась полевкой-экономкой, основной хозяин представлен крупным рогатым скотом, в 2004 году регистрируются случаи заражения овец, свиней, лошадей, собак, в 2016 году выявлена у кошек. [44, с.18]

К лептоспирозу восприимчивы люди, домашние животные, такие как крупный рогатый скот, свиньи, лошади, овцы, кошки, собаки. Среди диких и промысловых животных это песцы, олени, лисы, кабаны, мышевидные грызуны, бурозубки, землеройки, крысы и иные виды. Чаще всего источником инфекции являются грызуны. [4, с.14]

Зачастую, антропоургические очаги лептоспироза возникают на территориях, прилегающих к природным очагам инфекции. Более чем в 90 % случаев возникновение новых антропоургических очагов связано с предшествовавшим его возникновению контактом сельскохозяйственного

животного с возбудителем из природного очага. Это может быть контакт с диким животным или продуктами его жизнедеятельности, с инфицированной травой и иными объектами окружающей среды.[1]

В развивающихся странах лептоспироз поражает людей, работающих на рисовых полях, т.к. микроорганизм комфортно чувствует себя в водной среде и влажной почве. Высоковирулентный штамм *L. grippityphosa* способен сохраняться в почве до 279 дней. Также лептоспирозу подвержены работники сельского хозяйства в случае недостаточности санитарно-профилактических мероприятий. [42] Заболевание затрагивает развитые страны во время обильных осадков, и иных благоприятных для возбудителя условий. Чаще поражается работоспособное население в возрасте от 20 до 59 лет, в 86% случаев заражения человека лептоспирозом. [3, с.14] В 65% случаев заболевают владельцы животных, 13% фермеры, на долю охотников, рыболовов и отдыхающих в купальный сезон приходится от 3 до 10%. При этом среди заболевших около 71% мужчин и 29% женщин. Среди собак и кошек породистые болеют также часто, как беспородные, по половому признаку: среди самцов в 71% случаев у котом и 76% у кобелей, соответственно 29% случаев у кошек и 24% у сук. Чаще лептоспироз регистрируется среди животных частного сектора-86%, чем содержащихся в квартирах – 14%. [44, с.17]

Заражение происходит через объекты внешней среды, выделяясь с мочой возбудитель загрязняет корма, пастбища, подстилку, водоемы. В организм нового хозяина проникает через поврежденную кожу или через слизистые оболочки. Благоприятной средой может выступать вода открытых водоемов, таких как пруды, болота и лужи, реки со слабым течением, влажная почва. [30, с.10]

## 1.1 Патогенез при лептоспирозе

Некоторые штаммы патогенных лептоспир способны вызывать заболевание как у животных, так и у людей. [4] Заражение происходит при попадании возбудителя с загрязненных объектов внешней среды, а также из загрязненной воды, на слизистые или через поврежденную кожу. Через 5-30 мин. бактерии внедряются в ткани, попадают в кровоток и с ним разносятся по организму, попадая в печень, почки, селезенку, способны преодолевать гематоэнцефалический барьер. Инкубационный период длится от 3 до 20 дней. [39. с,11] Клиническая картина многообразна, от легкого недомогания до отказа почек, поражения ЦНС и летального исхода. Лептоспироз характеризуется резким подъемом температуры с плавным снижением ее до нормы. Подъему способствует выход большого числа лептоспир в кровеносное русло. Поэтому, на 3-5 день болезни можно обнаружить спирохет при микроскопии мазков крови, в это время наступает период лептоспиремии. Бактерии преодолевают гематоэнцефалический барьер и встречаются в цереброспинальной жидкости. Поражение ЦНС приводит к неврологическим расстройствам, апатии, сменяющейся возбуждением, судорогам. Лептоспиры способствуют увеличению проницаемости сосудов, их ферменты понижают свертываемость крови, проявляется геморрагический синдром. [6, с.20]

Существует желтушная и безжелтушная форма течения. Проявление желтухи в виде иктеричности кожных покровов, слизистой, склер связано с поражением ферментами микроорганизма капилляров и разрушении эритроцитов, прогрессирующей почечной недостаточностью совместно с поражением печени. [20, с.8]

Лептоспироз у различных видов животных можно выявить по наличию антител на 5-7 день после заражения, не зависимо от формы течения. Через 2-4 недели некоторые виды становятся лептоспиноносителями, и выделяют возбудителя в окружающую среду на протяжении нескольких месяцев, а иногда и нескольких лет.[4] В процессе жизнедеятельности лептоспир в

организме хозяина накапливаются продукты их распада, это приводит к сенсibilизации животного. Бактерии покидают кровеносное русло, оставаясь в почках, из которых выделяются с мочой до нескольких месяцев. [45, с.11]

Для лептоспироза характерны следующие патологоанатомические изменения: иктеричная подкожная клетчатка с геморрагическим диатезом. Печень увеличена в размере, дряблая, на разрезе глинистая. Отмечают жировую дистрофию, отложение желчного пигмента, расширение желчных ходов. Регионарные лимфатические узлы увеличены, на разрезе покрыты кровоизлияниями. Селезенка увеличена. Мочевой пузырь переполнен, моча вишнево-красного цвета. Почки увеличены, дряблые, желтушные, с явлением паренхиматозного нефрита и дистрофии. Граница между корковым и мозговым веществом сглажена, отмечаются точечные некротические очаги серо-белого цвета, кровоизлияния в мозговое вещество, на разрезе в виде треугольников, обращенных основанием внутрь. В просвете канальцев выявляются лептоспиры. Поражение почек характерно как для острой, так и для бессимптомной формы лептоспироза. Может поражаться центральная нервная система, при этом мягкие мозговые оболочки находятся в состоянии отека, отмечаются точечные кровоизлияния, дистрофические изменения, очажки некроза из-за некроза мелких сосудов.

## **1.2 Морфология и физиология лептоспир**

Возбудитель - бактерии семейства *Leptospiraceae*, из порядка *Spirochaetales*. В семейство входит род *Leptospira* включающий виды: *L. biflexa* - сапрофитные лептоспиры, *L. interrogans* - патогенные лептоспиры. [49] Патогенные лептоспиры подразделяются на 202 серовара, объединенные по степени антигенного родства в 23 серологические группы. [5]

Лептоспиры – это подвижные спиралевидно-закрученные нитевидные бактерии, концы которых могут быть загнуты с одной или нескольких сторон, бывают и бескрючковые формы. Характер движения бактерий в жидкой питательной среде прямолинейный, поступательный, вращательный.[19]

Несмотря на разнообразие серотипов и сероваров все они однотипны морфологически, отличаются патогенными и иммунобиологическими свойствами, вызывают развитие серотип-специфичного иммунитета. [43, с.3; 29, с.3]

Пока не выяснены причины различия в степенях эпидемической реализации распространенных среди диких животных штаммов лептоспир: Pomona, Tarassovi, Sejroe. Причины различия в характере клинического течения инфекции при различных этиологических формах лептоспироза. Сравнительная экология различных сероваров лептоспир и факторы специфической взаимосвязи с хозяином, как основной причины гостальной специфичности этого возбудителя. Ряд вопросов, имеющих большую научную и практическую значимость, остается недостаточно изученным. К ним относят метаболизм и питательные особенности лептоспир. [17, с.8]

Патогенные штаммы лептоспир отличаются друг от друга по признакам гостальной, органной, тканевой специфичности. Их патогенные свойства зависят от вида и географической популяции восприимчивых животных. [23]

В связи с селективным тропизмом к определенным биотопам на тканевом уровне, некоторые штаммы лептоспир способны вытеснять друг друга при последовательном пассаже на животных, методом конкурентного исключения. Однако, у свиней со штаммами Pomona и Tarassovi, из-за тропизма к различным отдела нефрона, вытеснения не происходит.

Особенности органной персистенции также привлекают к себе внимание ветеринарных и медицинских сотрудников, т.к. могут повлиять на достоверность результатов лабораторного исследования. [12, 14]

Лептоспиры локализуются в эпителии проксимальных извитых канальцев коркового слоя почек. Sejroe и Australis - в почках и слизистой генитального тракта КРС и свиней. В зависимости от тропизма возбудителя и концентрации заражающей культуры, различается частота успешного выделения культуры из различных органов и тканей больных животных.

При заражении грызунов *L. Interrogans*, штаммом *Grippotyphosa*, с накоплением микробных клеток  $10^7$ , при посеве патологического материала на жидкие питательные среды, из печени и почек микроорганизм удается выделить в 100% случаев, из головного мозга в 66% случаев. При изменении концентрации микробных клеток в заражающем материале до  $10^2$ , из почек возбудитель выделяется в 100% случаев, из печени не выделяется, и ЦНС в 50%. При заражении грызунов *L. Interrogans*, штаммом *Tarassovi*, с накоплением микробных клеток  $10^7$ , при посеве патологического материала на жидкие питательные среды, из печени и почек микроорганизм удается выделить в 83% случаев, из головного мозга в 50% случаев. При изменении концентрации микробных клеток в заражающем материале до  $10^2$ , из почек возбудитель выделяется в 75% случаев, из печени не выделяется, и ЦНС в 38%. [34]

От локализации возбудителя будет зависеть клиническая картина.

Штаммы *Grippotyphosa*, *Hebdomadis*, *Sejroe*, *Icterohaemorrhagiae*, *Pomona* могут стать причиной спонгиозной энцефалопатии у человека. *Icterohaemorrhagiae* у людей поражает легкие. [18]

Лептоспироз относится к сапронозам- инфекционным заболеваниям резервуаром возбудителей, которых служит внешняя среда. Сапронозы разделяют по природным резервуарам возбудителей, определяющим эпидемиологические проявления различных сапронозов. [53] В группе сапронозов различают:

- почвенные сапронозы (кlostридиозы, сибирская язва, листериоз, актиномикоз, гистоплазмоз, бластомикоз, кокцидиоидомикоз и др.);

- водные сапронозы (легионеллезы, холера Эль-Тор, НАГ-инфекция, мелиоидоз и др.);

- зоофильные сапронозы или сапрозоонозы (лептоспирозы, псевдотуберкулез, кишечный иерсиниоз, синегнойная инфекция и др.);

- фитофильные или сапрофитозные сапронозы (эрвиниозы, листериозы, псевдомонозы)

Различен период жизнеспособности лептоспир вне организма животного, он зависит от условий среды и штамма возбудителя. *Grippytyphosa* в почве сохраняется до 279 дней, *Sejroe* в воде до 5 суток.

Для почвенных сапронозов, основным резервуаром возбудителя служит почва. К этой группе относятся кlostридиозы, сибирская язва, листериоз, актиномикоз, гистоплазмоз.

Для водных сапронозов, основным резервуаром возбудителя служит вода. К этой группе относятся легионеллез, мелиоидоз.

Для зоофильных сапронозов (сапрозоонозов), основным резервуаром возбудителя служит внешняя среда и животные. К этой группе относятся лептоспирозы, псевдотуберкулез, синегнойная инфекция.

Для фитофильных сапронозов, основным резервуаром возбудителя служит внешняя среда и растения. К этой группе относятся листериозы, некоторые псевдомонозы (*P. ceracia*, *P. Fluoresceins*).

Различные штаммы лептоспир отличаются видом основного и резервуарного хозяина. *L. Interrogans*, штамм *Grippytyphosa* в качестве переносчика использует полевку-экономку, а основным хозяином служит крупный рогатый скот. *L. Interrogans*, штамм *Hebdomadis* переносится полевыми мышами, основной хозяин- крупный рогатый скот. *L. Interrogans*, штамм *Icterohaemorrhagiae* переносят полевки-экономки и серые крысы, к основным хозяевам относятся крупный и мелкий рогатый скот, свиньи. Для *L. Interrogans*, штамма *Pomona* переносчиками служат полевая мышь и

бурозубка, основной хозяин- свиньи. *L. Interrogans*, штамм *Canicola* переносится собаками, болеет крупный рогатый скот. У штамма *Tarassovi* свиньи выступают и в роли основного хозяина, и в роли переносчика.

### 1.3 Эпизоотическая ситуация и распространение лептоспироза

В России случаи заболевания человека лептоспирозом описаны во времена русско-турецкой войны 1828-1829 гг. скрытым за названием «кавказские перемежающиеся лихорадки». В 1884-1888 годы, возбудителя еще не определили, но описывали инфекционные заболевания с явлением желтухи. А. Фидлер назвал их «болезнь Вейля». В 90-х годах того же века активно описывались всевозможные водные, болотные, иловые лихорадки. В 1914 году в воде была обнаружена сапрофитная форма лептоспир *L. biflexa*. [48]

В феврале 1915 года в Японии, при микроскопическом исследовании крови шахтеров с инфекционной желтухой, были обнаружены спирохеты и антитела к ним. Возбудитель получил название *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*. А в 1917 году выявили переносчиков лептоспир, ими оказались серые крысы из шахт, в которых заболевали рабочие, в моче крыс также нашлись спирохеты.

В 1928 году в Подмосковье было зарегистрировано массовое заболевание речной лихорадкой, С.И. Тарасов выделил возбудителя инфекции из крови заболевших, им оказался штамм *L. grippotyphosa*.

У собак лептоспироз диагностирован в 1850 г., его определили как тиф собак, штуттгартскую болезнь собак, возбудитель *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*. Иктерогемоглобинурия крупного рогатого скота была вызвана *L. grippotyphosa*. [22]

В настоящее время, лептоспироз регистрируется во многих странах мира, таких как Австралия, США, Германия, страны Африки и т.д. В Российской Федерации нет регионов благополучных по лептоспирозу крупного рогатого скота. По лептоспирозу свиней благополучна только Чувашская республика. [35, с.3]

Заболевание приносит серьезный экономический ущерб: высокая смертность животных, до 45%, снижение удоя на 22-37%, потеря массы до

28%, падеж молодняка, до 90%, выбраковка сырья животного происхождения на мясокомбинатах, затраты на лечебно-профилактические мероприятия.

Лептоспироз снижает интенсивность воспроизводства и продуктивность свиноголовья. Клинические случаи регистрируются редко, обычно характеризуется латентным течением, что способствует развитию лептоспиросительства. [43, с.3]

В Российской Федерации лептоспироз является наиболее распространенным природно-очаговым зоонозом. (с.3) Летальность от числа заболевших может составлять от 10 до 30%.

В случае введения ограничений при выявлении лептоспироза в хозяйстве, животных из этого хозяйства запрещается выводить и ввозить для воспроизводства, запрещается продавать животных населению. От животных-производителей с подтвержденным лабораторными методами исследования лептоспирозом прекращают получать сперму, а полученную ранее от больных животных уничтожают. [41]

Перегруппировка животных допускается только под руководством ветеринарного специалиста. Животные не допускаются к воде открытых водоемов, а вода таких водоемов не используется для поения и купания. Запрещается выпас на пастбищах используемых ранее для выпаса больных животных, животных, не прошедших вакцинацию от лептоспироза. Невакцинированных животных запрещено выпасать на территориях природных очагов лептоспироза. Если в кормах для животных обнаружены инфицированные грызуны, такой корм может скармливаться исключительно вакцинированному поголовью. Все эти ограничения весьма затратны для животноводческих хозяйств.

Молоко от больных животных после кипячения может идти на корм внутри хозяйства. Больные и подозрительные по заболеванию животные проходят лечение антибиотиками и гипериммунными сыворотками или направляются на убой в связи с экономической целесообразностью для предприятия. (с.5.) СП 3.1.091-96

Существует цикличность лептоспирозной инфекции. У КРС лептоспироз отличается ярковыраженной сезонностью, заболевание начинает регистрироваться в мае, доходя до максимума в июле-августе. Этому способствует повышение температуры воздуха и увеличение объема осадков, благодаря чему лептоспиры получают возможность длительно сохраняться во внешней среде во влажной почве. [35, с.9]

У КРС чаще всего лептоспироз вызван серологическими группами *Grippotyphosa* в 38% случаев, *Tarassovi* 22%, *Hebdomadis* – 18%. У свиней *Grippotyphosa* в 45% случаев, *Pomona* 22,5%, *Hebdomadis* 17%. Мышевидные грызуны переносят лептоспиры серогрупп *Grippotyphosa*, *Pomona*, *Hebdomadis* по 20,4%, *Icterohaemorrhagiae* 18,1%, *Tarassovi* 13,3%. Свиньи болеют лептоспирозом без выраженной сезонности, чаще в осенние и зимне-весенние месяцы. [35, с.9] У лошадей заболеваемость лептоспирозом проявляется без выраженной сезонности. У лошадей преобладает бессимптомная форма, протекающая в виде лептоспирозной субинфекции. Штаммы *Canicola* 49%, *Icterohaemorrhagiae*, *Grippotyphosa* 12%. [29, с.11]

Существует закономерность роста и спада заболеваемости и носительства лептоспирозной инфекции. Период роста и спада длится 5 лет, рост связан с увеличением популяций грызунов, оптимальными условиями внешней среды, это высокая влажность и тепло в конце мая и июне. В осенне-зимний период, с сентября по февраль, грызуны загрязняют корма и подстилку, водоемы, от чего в ноябре-декабре наблюдается рост числа заболевших сельскохозяйственных животных. Животные становятся носителями, контаминируют окружающую среду. Заболеваемость начинает идти на спад, когда у животных появляется иммунитет. Так, периоды роста отмечены в 1981 году, 1986 году, 1991, 1997, 2002, 2007, 2013, 2018, это позволяет предположить похожую ситуацию в 2023 году. [57]

Отмечена видовая чувствительность животных к лептоспирам определенных серогрупп: У КРС серогруппы *Sejroe* 43%, *Tarassovi* 26%. *Hebdomadis* 10%, *Pomona* 10%. Лошади *Icterohaemorrhagiae* 46%, *Canicola*

22%, Pomona 15%. Grippytyphosa 13%. Свиньи Icterohaemorrhagiae 48,7%, Pomona 36,5%, Tarassovi 14,3%, Canicola 0,5%. [43, с.21]

Этиология лептоспироза у диких хищников схожа с собаками, а у диких травоядных с сельскохозяйственными животными, что может охарактеризовать их как возможный источник возбудителя инфекции. [35, с.19] Собаки могут быть носителями серогрупп Icterohaemorrhagiae, Canicola, Grippytyphosa, Sejroe, Pomona, Tarassovi. [35, с.18]

Отмечают территориальную приуроченность очагов лептоспироза, они часто располагаются возле рек и непроточных водоемов, где в обильной растительности на влажной почве наблюдается высокая плотность мышевидных грызунов. [43, с.15] Антропургическими очагами лептоспироза могут выступать неблагополучные животноводческие комплексы. Это связано с несвоевременным выявлением лептоспиросительства в поголовье, а также недостаточность проводимых дератизационных мероприятий. [43, с.16]

Барьер гостальности- относительный показатель, который имеет определенное значение при оценке эпизоотической ситуации и оптимизации противолептоспирозных мероприятий. [21, с.25] Этиологическую структуру лептоспироза у различных видов животных формируют не только адаптированные, но и другие серогруппы, что подтверждает относительный характер специфической гостальности. [21, с.38]

#### **1.4 Питательные среды для культивирования лептоспир**

Для успешного культивирования микроорганизмов необходимо подбирать питательные среды с учетом их физиологических потребностей. [28, с.3] Для культивирования лептоспир часто применяют питательные среды, в состав которых входит сыворотка барана или кролика. К ним относится сывороточная среда на фосфатном буфере, водно-сывороточная среда Уленгута, полужидкая среда Флетчера, твин-альбумин-сывороточная

среда Эллиса, элективные среды. Плотные питательные среды для культивирования лептоспир имеют сложный состав [17, с.4]

Сыворотку крови получают путем забора крови от кролика или барана во флаконы вместимостью до 200см<sup>3</sup> и до 1000см<sup>3</sup> соответственно. Кровь кролика берут из сердца в объеме 30-40 мл. У барана кровь отбирают из яремной вены от 400 до 500мл. Флаконы с отобранной кровью выдерживают в термостате при температуре 37±1 °С 30-60 минут, после чего кровяной сгусток обводят металлической спицей и помещают в холодильник на 24-47ч для отстаивания сыворотки. Когда сыворотка отстоялась, ее отбирают в стерильные флаконы объемом 100-200см и инактивируют в течение часа на водяной бане при температуре 56-58°С. Хранить сыворотку после инактивации можно в холодильнике при температуре 1-5 °С.

Для приготовления фосфатного буфера используют калий фосфорнокислый однозамещенный, дистиллированную воду, натрий фосфорнокислый двузамещенный.

Сначала подготавливают маточные растворы. Для этого 9,078 г однозамещенного фосфорнокислого калия растворяют в 1 л дистиллированной воды, отдельно в 1 л дистиллированной воды растворяют 11,879 г двузамещенного фосфорнокислого натрия. Полученные маточные растворы хранят в холодильнике при температуре 2-4 °С не более 1 месяца. Буферный раствор получают смешиванием 79мл маточного раствора двузамещенного фосфорнокислого натрия, 21 мл маточного раствора однозамещенного фосфорнокислого калия и 900 мл дистиллированной воды. рН полученного буфера должен быть в пределах 7,2-7,4, отклонение корректируют добавлением маточного раствора двузамещенного фосфорнокислого натрия или однозамещенного фосфорнокислого калия

Фосфатный буфер разливают во флаконы вместимостью 500мл до ½ объема и стерилизуют в автоклаве в течение 0,5 часа при 120°С.

После того, как буфер остыл, в него вносят от 5 до 10% объема инактивированной сыворотки крови. Полученную среду расфасовывают в пробирки и выдерживают при  $(37\pm 1)$  °С до 5 суток для проверки на стерильность.

Для приготовления водно-сывороточной среды Уленгута используется дистиллированная, колодезная, водопроводная или речная вода, инактивированная сыворотка крови кролика. Воду фасуют по пробиркам внося в каждую по 5 мл, пробирки стерилизуют, охлаждают и вносят в каждую по 0,5 мл инактивированной сыворотки крови кролика. Полученную среду расфасовывают в пробирки и выдерживают при  $(37\pm 1)$  °С до 5 суток для проверки на стерильность.

### **1.5 Особенности диагностики лептоспироза**

Для проведения эффективных лечебно-профилактических мероприятий необходимо учитывать эпизоотическую ситуацию, этиологическую структуру, роль животных в эпизоотическом процессе, пути распространения и источники инфекции, способы ее передачи. Характер, структура и локализация очагов лептоспироза зависит от распространения и образа жизни животных-носителей. Важное место в борьбе с лептоспирозом занимает лабораторная диагностика. [35, с.3]

Диагноз лептоспироза во всех случаях должен быть подтвержден лабораторными исследованиями. К ним относят: микроскопический; бактериологический; биопроба; серологические, куда входят ИФА, РМА, РА; ПЦР.

В целях своевременного выявления лептоспироза проводят исследование сыворотки крови животных в реакции микроагглютинации (РМА) с набором культур-антигенов:

- на племпредприятиях, станциях (пунктах) искусственного осеменения и в племенных хозяйствах (фермах) всех производителей проверяют на лептоспироз два раза в год;

- свиней, крупный и мелкий рогатый скот, лошадей перед вводом (ввозом) и выводом для племенных и пользовательских целей (за исключением животных на откорм) поголовно;

- во всех случаях при подозрении на лептоспироз.

Лептоспироз считают причиной аборта (мертворождения) при обнаружении:

- лептоспир в органах (тканях, жидкостях) плода или околоплодных водах методом микроскопии или выделением культуры путем посева на специальные питательные среды;

- антител к лептоспирам в сыворотке крови плода в РМА с набором культур-антигенов, в разведении 1:5 (с антигеном 1:10) и более.

Лептоспироз считают причиной гибели животных при наличии клинических признаков: резкое повышение температуры, желтушность кожных покровов и слизистых, подавленное состояние, сменяющееся возбуждением. Патологоанатомических изменений, характерных для этой инфекции: иктеричная подкожная клетчатка с геморрагическим диатезом. [25, с.3] Печень увеличена в размере, дряблая, на разрезе глинистая. Отмечают жировую дистрофию, отложение желчного пигмента, расширение желчных ходов. Регионарные лимфатические узлы увеличены, на разрезе покрыты кровоизлияниями. Селезенка увеличена. Мочевой пузырь переполнен, моча вишнево-красного цвета. Почки увеличены, дряблые, желтушные, с явлением паренхиматозного нефрита и дистрофии. Граница между корковым и мозговым веществом сглажена, отмечаются точечные некротические очаги серо-белого цвета, кровоизлияния в мозговое вещество, на разрезе в виде треугольников, обращенных основанием внутрь. В просвете канальцев выявляются лептоспиры. Поражение почек характерно как для острой, так и для бессимптомной формы лептоспироза. Может поражаться центральная

нервная система, при этом мягкие мозговые оболочки находятся в состоянии отека, отмечаются точечные кровоизлияния, дистрофические изменения, очажки некроза из-за некроза мелких сосудов. Диагноз должен быть подтвержден, обнаружением лептоспир в крови или паренхиматозных органах (кроме почек). [37, с.4]

«Патологоанатомические изменения очень variabelны, решающими при постановке диагноза являются данные лабораторных исследований.»  
Основные методы лабораторной диагностики: бактериологический и серологический. [43, с.18]

## 1.6 Лабораторная диагностика лептоспироза

Общий анализ крови может показать высокое количество лейкоцитов и низкое количество тромбоцитов. Скорость оседания эритроцитов и С-реактивный белок плазмы крови, отражающий острые воспалительные процессы в организме, также могут быть повышены.

Из-за поражения почек, при лептоспирозе уровень мочевины и креатинина в крови будет повышен. При этом заболевании увеличивается экскреция калия с мочой, что приводит к низкому уровню калия и низкому уровню натрия в крови.

Анализ мочи может выявить наличие белка, лейкоцитов и микроскопической гематурии. поскольку бактерии оседают в почках, начиная со второй недели болезни в моче при бактериологическом методе диагностики может обнаруживаться возбудитель.

При поражении печени уровень трансаминаз и прямого билирубина повышается. Серогруппа *Icterohaemorrhagiae* ассоциируется с желтухой и повышенным уровнем билирубина. Наблюдается острая гемолитическая анемия и конъюгированная гипербилирубинемия, гемолитическая анемия способствует развитию желтухи. Характерными для лептоспироза являются

аномальные уровни сывороточной амилазы и липазы, что связано с развитием панкреатита.

Лептоспироз может затрагивать центральную нервную систему и проявляться признаками менингита. В таких случаях исследование спинномозговой жидкости (ликвора) показывает преобладание лимфоцитов и белков на фоне нормального уровня глюкозы. Эти данные согласуются с асептическим менингитом.

### **1.6.1 Микроскопия лептоспир**

Лептоспиры плохо окрашиваются по Граму и анилиновыми красителями, в связи с чем для их обнаружения в органах и тканях используют окраску мазков-отпечатков по Романовскому-Гимзе или импрегнацию серебром гистологических срезов по Вартину-Стерри. Окрашивание препаратов позволяет не только выявить возбудителя инфекции, но и оценить местную клеточную реакцию организма на патоген. Микроскопия позволяет подтвердить лептоспироз в случае падежа животного с подозрением на эту инфекцию.

Микроскопические исследования с целью выявления лептоспир, можно проводить без предварительной окраски, для этого микроскоп снабжают конденсором темного поля, а материал просматривают в виде раздавленной капли на стекле.

Для микроскопического исследования отбирают патологический материал, это могут быть паренхиматозные органы или их часть. В первые 5-7 суток болезни во время лихорадки возбудителя можно выделить из крови больного животного. Возбудитель обнаруживается в моче. Для выделения лептоспир от трупа при диагностическом убое кровь отбирается из сердца, также отбираются ткани печени, почек. От абортirованных плодов берут дополнительно содержимое желудка. [18, с.5]

Патологический материал микроскопируют в виде раздавленной капли на стекле в темном поле микроскопа при увеличении 40x7 - 40x10. Для этого материал наносят на предметное стекло и накрывают покровным стеклом, следя, чтоб под стеклом не оставалось пузырьков воздуха. На одном предметном стекле можно разместить до 3х раздавленных капель. Для более детального рассмотрения препарата - при увеличении 40x10 - 40x15. От каждой капли просматривают не менее 50 полей зрения.

Мочу можно исследовать сразу после взятия или после предварительного центрифугирования. Прозрачную мочу центрифугируют со скоростью 10000-12000 об/мин, 30 мин. Удаляют надосадочную жидкость, после чего полученный материал микроскопируют. В случае наличия в моче посторонних примесей, режим центрифугирования заменяют на 3000 об/мин в течение 10 мин. После удаления надосадочной жидкости поступают, как и с прозрачной мочой. О лептоспирозе свидетельствует присутствие в микроскопируемой моче мертвых клеток характерной формы, белые нити спирально закручены, крючки как с одного, так и с обоих концов могут быть распрямлены. При рН 5,0-6,0 лептоспиры обычно не подвижны и быстро гибнут. Спирохет следует дифференцировать от нитей фибрина, хвостовых частей спермиев, иных извитых микроорганизмов, таких, как интерспиры у хряков.

В случае бессимптомного течения лептоспиры в крови практически не встречаются, для микроскопической диагностики готовят суспензию из ткани коркового слоя почки. При остром течении, аналогичным образом суспендируют ткани печени и иных пораженных органов. При заборе материала от мелких животных, органы суспендируются целиком. Диагностируя лептоспироз у абортированного плода, суспензию получают из всех органов.

От исследуемого органа отбирают кусочки массой 2-3 г. Их помещают в ступку и заливают 5-7мл питательной среды или физиологического раствора. Материал растирают до получения

гомогенной взвеси. Полученную суспензию помещают в холодильник на 1-2 часа, после чего микроскопируют надосадочную жидкость методом раздавленной капли на стекле.

### **1.6.2 Выделение возбудителя лептоспироза в лабораторных условиях**

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. [55]

Для микроскопической диагностики лептоспироза патологический материал микроскопируют в виде раздавленной капли на стекле в темном поле микроскопа при увеличении 40x7 - 40x10, а для более детального рассмотрения препарата - при увеличении 40x10 - 40x15. От каждой капли просматривают не менее 50 полей зрения.

О лептоспирозе свидетельствует присутствие в микроскопируемой моче мертвых клеток характерной формы, белые нити спирально закручены, крючки как с одного, так и с обоих концов могут быть распрямлены. При рН 5,0-6,0 лептоспиры обычно не подвижны и быстро гибнут. Спирохет следует дифференцировать от нитей фибрина, хвостовых частей спермиев, иных извитых микроорганизмов, таких, как интерспиры у хряков.

В первые 5-7 суток болезни во время лихорадки возбудителя можно выделить из крови больного животного, для этого в 5-7 пробирок вносят по 3-5 капель венозной крови.

Для выделения лептоспир от трупа при диагностическом убое кровь на посевы берется из сердца, также отбираются ткани печени, почек. От абортированных плодов берут дополнительно содержимое желудка.[16]

В случае убоя клинически-здорового животного, материал на посев отбирается из почки и мочевого пузыря. Полученный патологический материал высевают на 3-5 пробирок с питательной средой.

Почку убитого или павшего животного освобождают от капсулы, поверхность прижигают, уничтожая возможную постороннюю микрофлору.

В корковый слой, для отбора материала на посев, параллельно поверхности почки вводят пипетку. У крупного рогатого скота материал отбирают из 2-3 долей у свиней из нескольких участков. С иными органами поступают аналогичным образом, прижигая поверхность органа и насасывая материал пастеровской пипеткой.

Биологические жидкости: мочу, транссудат и прочее высевают в 3-5 пробирок с жидкой питательной средой, по 1-3 капли.

Пробирки с посевом помещают в термостат и выдерживают при температуре 28-30 °С до 3 месяцев. Внешний вид среды при этом не изменяется. На 3,5,7,10 сутки культивирования рост культуры оценивают микроскопией капли на стекле в темном поле микроскопа. Чаще всего культура вырастает на 7-20 суток, вероятность появления роста лептоспир на 3ий месяц культивирования достаточно низкая. Последующая микроскопия проводится 1 раз в 5 дней.

В случае выявления роста лептоспир, культуру из этих пробирок пересевают на 3-5 пробирок с жидкой питательной средой для дальнейшего термостатирования. Пробирки с посторонней микрофлорой очищают или выбраковывают. Очистить культуру можно пересевая ее на жидкую питательную среду с добавлением антибиотика и иными методами. [56]

Идентификацию выделенной культуры проводят посредством реакции микроагглютинации с групповыми агглютинирующими лептоспирозными сыворотками.

В лаборатории для диагностики лептоспироза основные штаммы этого возбудителя должны постоянно поддерживаться. Культуру микроорганизмов пересевают раз в две недели, для этого в три пробирки с 5-10мл жидкой питательной среды вносят 0,5-1мл культуры. Через 4-7 суток в термостате при температуре 28-30 °С можно наблюдать максимальное накопление микробных клеток.

Состояние культуры в жидкой питательной среде контролируют, просматривая пробирки в луче осветительного прибора, в первую очередь

позволяя выявить постороннюю микрофлору, такую как плесневые грибы, механический осадок. При встряхивании пробирки в среде можно наблюдать муаровые волны, что свидетельствует о наличии лептоспир в посеве. Микроскопируют раздавленную каплю на стекле в темном поле микроскопа.

После накопления лептоспирами максимальной концентрации на жидкой сывороточной среде, посев в лаборатории консервируют различными способами.

Лептоспир можно хранить в пробирках под вазелиновым маслом, насливая на культуру от 1 до 1,5 мл стерильного вазелинового масла. Можно поместить бактериальную культуру в стерильные ампулы на 1-5мл из нейтрального стекла, и сохранять в запаянном виде. При комнатной температуре в темном месте ампулы и пробирки можно хранить до 3 месяцев.

Этот возбудитель спокойно переносит низкие температуры, так что сохраняется в морозильной камере при -60-70 °С или при -196 °С. Для этого запаянные ампулы с посевом, после чего охлаждают до 0-4 °С и помещают в сосуды Дюарра. В таком виде лептоспиры сохраняются до 1 года. Биологические свойства возбудителя практически не изменяются на протяжении всего срока хранения.

### **1.6.3 Очистка бактериальной культуры от посторонней микрофлоры**

Зачастую, при выделении лептоспир из патологического материала, посев оказывается контаминирован посторонней микрофлорой. Для очистки такой культуры применяют биологический метод, фильтрацию или посев на плотные питательные среды.

Биологический метод очистки заключается во внутрибрюшинном введении загрязненной культуры лабораторным животным, это могут быть морские свинки, крольчата, золотистые хомяки, мыши. Дозировка рассчитывается исходя из концентрации культуры и вида животного.

Морским свинкам и крольчатам вводят 1-2мл культуры, золотистым хомякам и мышам 0,5мл. Спустя 30-60 минут у зараженного животного отбирают кровь из сердца и производят посев на питательную среду.

Фильтровать загрязненную культуру лептоспир можно через асбестовые стерилизующие пластины, после фильтрации производят посев на 5-10 пробирок с питательной средой. Применяют стерильные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

Очистка на плотной питательной среде достаточно продолжительна. Колонии лептоспир при посеве на плотные питательные среды появляются на 7-20 сутки термостатирования при 28°C. Загрязненную культуру высевают на несколько чашек Петри при помощи шпателя. Если культура слишком сильно контаминирована, то перед посевом ее разводят несколько раз стерильным физиологическим раствором и высевают в несколько чашек петри каждое полученное разведение. Очищаемый микроорганизм является строгим анаэробом, для создания оптимальных условий чашки перед термостатированием заклеивают лейкопластырем или парафилмом. Колонии лептоспир образуются в толще среды или на ее поверхности. Они имеют вид прозрачных мелких дисков с четко очерченными или размытыми краями. Колонии могут достигать до 2 см в диаметре, матовые точки до 2 мм. Колонии переносят в пробирку с жидкой питательной средой при помощи бактериологической петли или пастеровской пипетки. Пробирки после посева остаются в термостате до появления роста.

Для постановки биологической пробы используют золотистых хомячков, крольчат-сосунов, морских свинок. Предъявляются определенные требования к возрасту животных, хомяки от 20 до 30 сут., крольчата 10-20 суток, морские свинки 21-35 суток. Стоит учитывать гостальную специфичность возбудителя. Так, морские свинки в большей степени чувствительны к *L. Icterohaemorrhagiae*, и меньше к *L. Pomona*, малочувствительны к иным серологическим группам. [2, с.15]

Для заражения животных используют кровь, сперму, мочу или суспензию из паренхиматозных органов больных животных. Исследуемый материал вводят внутривентрально или подкожно хомякам от 0,3 до 1 см, крольчатам - от 2 до 3 см. Пробу исследуют на 2х животных, первого убивают при подъеме температуры на 4-5 сутки, второго на 14-16 сутки после заражения, если он не погибает самостоятельно. Его кровь исследуют в реакции микроагглютинации в разведении 1:10 и далее с 15 серологическими группами лептоспир. Если реакция положительна хоть с 1 их штаммов, это говорит о наличии возбудителя в патологическом материале. От убитых или павших животных для посева отбирают материал из сердца, печени, почки, и каждый высевают в 2-3 пробирки с питательной средой. Содержимое мочевого пузыря, кусочек печени, второй почки, околосердечную жидкость микроскопируют.

Микроорганизм чаще выделяется от животных с клинической картиной лептоспироза. Наблюдается конъюнктивит, лихорадка и пожелтение видимых слизистых, животное вялое, аппетит отсутствует, шерсть взъерошена. [59]

#### **1.6.4 Диагностика лептоспироза методом ПЦР**

Лабораторная диагностика в последние годы развивается, силы направлены на поиски молекулярно-биологических методов исследования и диагностики инфекционных болезней. [26]

Для выявления и анализа ДНК лептоспир в настоящее время применяют полимеразную цепную реакцию (ПЦР), анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ), мультилокусное секвенирование. [9]

Изучая лептоспир на молекулярно-генетическом уровне, исследователи вывели новую для нас генетическую классификацию. Стоит отметить, что эта

классификация отличается от существующей серологической. Так, штаммы, генетически относимые к разным видам лептоспир, могут быть идентичными с точки зрения серологии. [46]

На основании анализа ДНК и 16S рРНК род *Leptospira* подразделяется на 19 видов, из них 8 патогенных, 6 промежуточных и 5 сапрофитических. [47]

Метод полимеразной цепной реакции применяют для идентификации различных видов лептоспир и для их выявления в патологическом материале. Для исследования отбирают пробу крови, мочи, кусочки паренхиматозных органов, воды или смывов, образцы почвы. [33]

Наиболее специфичными участками ДНК для лептоспир являются гены, кодирующие липопротеин наружной мембраны лептоспир Lip L32 и 16S РНК патогенных геновидов возбудителя. [58]

Широко используется стандартная полимеразная цепная реакция с электрофоретической детекцией, ее применяют для увеличения количества фрагментов генетического материала и дальнейшего их детального исследования, определения последовательностей нуклеотидов. Более высокой чувствительностью отличается метод полимеразной цепной реакции с флуоресцентной регистрацией накопления ДНК. Он обеспечивает специфическую детекцию продуктов реакции и позволяет производить количественную оценку в реальном времени. [60]

Метод отличается высокой диагностической эффективностью начиная с 1ых суток заболевания и применяется с целью ранней экспресс-диагностики. ПЦР высокоспецифичная и чувствительная к минимальным концентрациям антигена. Возбудитель может быть выявлен даже в процессе антибиотикотерапии.

Если мы имеем дело с острой формой лептоспироза ПЦР может применяться совместно с иными методами лабораторного анализа, обеспечивая своевременное лабораторное подтверждение клинического диагноза. Но стоит помнить, что отрицательный результат при ПЦР-диагностике еще не говорит об отсутствии лептоспирозной инфекции, это

может быть связано со сроками забора патологического материала, условиями транспортировки и иными факторами. Наиболее эффективным считается применение ПЦР-диагностики совместно с реакцией микроагглютинации для выявления антител к возбудителю.

Метод полимеразной цепной реакции позволяет на сегодняшний день идентифицировать вид возбудителя, типировать его. С этой целью применяют мультилокусное секвенирование. Фрагмент ДНК отбирается, проходит множественное копирование, после чего тестируется. Происходит своего рода чтение генома, представляемое в текстовом формате согласно последовательности мономеров в его первичной структуре. Эту последовательность сравнивают с базой данных. [52]

Существует еще одна зарекомендовавшая себя методика: MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight). Это масс-спектрометрия с время-пролетной матрично-активированной лазерной десорбцией или ионизацией. [7] Метод основан на получении ионов из твердой фазы и учета скорости дрейфа частиц в пространстве. Как и вышеописанный метод, он отличается высокой чувствительностью и относительной дешевизной, позволяет быстро идентифицировать различные микроорганизмы. Но не совсем удобен при диагностике лептоспироза, т.к. для его проведения требуется 7-дневная культура, выращенная на искусственной питательной среде, а выделение культуры связано с большими временными затратами. [54]

Еще один метод диагностики - MLPA - Multiplex Ligase Probe Amplification, мультиплексная лигазная реакция с гибридизацией позволяет определить вид возбудителей лептоспироза. Это технология check-points с определением до 25 нуклеотидных замен (SNP) в формате ДНК-микрочипа. Более простым считается MLPA ПЦР в реальном времени. При этом анализируется не один, а несколько фрагментированных участков ДНК возбудителя, которые нарабатываются полимеразной цепной реакцией. [50]

Проводя эпидемиологический анализ, специалисты обращаются к ПДРФ - анализу полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Метод позволяет произвести типизацию изолятов, например, при изучении их географического распространения. После получения однородной популяции возбудителя, из ее биомассы экстрагируют ДНК, на нее воздействуют ферментами -рестриктазами, после чего проводят электрофорез полученных участков в агарозном геле. [61] Как и иные методы с применением ПЦР, он отличается высокой чувствительностью и специфичностью. Полученные в результате такого анализа данные сравнивают с рестрикционными картами различных штаммов лептоспир и буквально определяют их на молекулярном уровне. Стоит отметить большую трудоемкость и длительность проведения идентификации этим методом. [10]

При всем разнообразии разработанных методов лабораторной диагностики лептоспироза многие из них на практике не применяются. Бактериологический анализ довольно сложен, трудоемок и далеко не всегда успешен. Для изоляции чистых культур наиболее эффективен метод биопробы, однако он технически выполним исключительно в лабораториях, имеющих специализированные помещения для работы с животными. Метод микроскопии в темном поле сравнительно прост и дает наиболее быстрый результат, но при малом количестве бактерий в исследуемом материале он не информативен. Метод ПЦР хорошо зарекомендовал себя на практике, но многие имеющиеся высокочувствительные тест-системы до сих пор не сертифицированы. [11]

Для достижения наилучших результатов в диагностике лептоспироза необходимо усовершенствовать имеющиеся на вооружении лабораторные методы.

### 1.6.5 Применение серологических методов при работе с возбудителем лептоспироза

Серологический метод основан на взаимодействии специфического антитела с антигеном. В случае лептоспироза применяют реакцию микроагглютинации (РМА) и реакцию иммунной адсорбции (РИА). В реакции микроагглютинации антигеном служат бактериальные культуры различных штаммов лептоспир. Основные штаммы, применяемые для постановки РМА, постоянно поддерживаются в лаборатории, Таблица 1.

Таблица 1. Антигены - живые культуры штаммов лептоспир.

Серогруппа	Серовар	Рекомендуемые штаммы*
Pomons	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 Dataviae 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 качестве материала для серологического исследования может отбираться кровь, моча, органы и целые трупы мелких животных. У крупных животных: сердце, почки, перикардальная жидкость, трансудаты, мочевого пузыря с содержимым, спинномозговая жидкость, кусочки паренхиматозных органов.[15]

Кровь отбирают на 5-7 сутки после появления клинических признаков болезни. В случае вакцинации, кровь от крупного рогатого скота отбирают через 90 суток, а от свиней и иных видов животных, через 60 суток.

Для реакции в качестве патологического материала берут сыворотку крови, она может быть свежей, замороженной или высушенной на фильтровальной бумаге. Для этого на бумагу размером 5\*5см наносят по 3-5 капель (0,05 см каждая) сыворотки. Высушивание проводят при комнатной температуре или в термостате при температуре (37±1) °С. Образцы пригодны для постановки реакции 1 месяц.

Также для сохранения сыворотки, ее консервируют фенолом, добавляя 5%-й раствор из расчета 0,05 см (1 капля) на каждый миллилитр сыворотки, при постоянном помешивании.

Для консервации применяют борную кислоту. Ее вносят в сыворотку до получения насыщенного раствора и образования небольшого осадка кристаллов. Кристаллы кислоты при постановке реакции не должны попадать в пипетку во время постановки реакции. Сыворотку нельзя использовать для постановки реакции, если в ней наблюдается гемолиз, посторонняя микрофлора в виде плесневых грибов и иного роста, признаки загнивания.

Перед постановкой реакции сыворотку необходимо подготовить. Если сыворотка была высушена на фильтровальной бумаге, из бумаги аккуратно вырезают 1 или 2 капли, в зависимости от требуемого начального разведения. Полученные кусочки измельчают при помощи ножниц, после чего помещают в пробирку. В пробирку доливают 2,45 или 4,9 мл физиологического раствора

и помещают в термостат на 37°C на 60 мин. Полученный экстракт принимают за начальное разведение сыворотки 1:25 или 1:50.

При работе со свежей или консервированной сывороткой, ее разбавляют физиологическим раствором в объемном отношении 1:25, если сыворотка получена от невакцинированных животных, и 1:50, если от вакцинированных. Стоит учитывать, что это разведения без учета объема антигена, и при его внесении значения удвоятся до 1:50 и 1:100 соответственно.

Есть ряд требований к срокам отбора крови и подготовке проб для постановки реакции в зависимости от вида животного, сроков вакцинации, ввозе или вывозе из хозяйств, при импорте и экспорте. Кровь от вакцинированного крупного рогатого скота отбирают не раньше, чем через 3 месяца после вакцинации. От вакцинированных свиней и иных видов животных - через 2 месяца.

Если животное ввозят или вывозят из хозяйства с целью воспроизводства, сыворотку таких животных разводят в 25 раз и исследуют в разведении 1:50.

При исследовании проб, полученных от импортного скота или с целью выявления этиологической структуры лептоспироза, сыворотки крови проверяют с антигенами серогрупп: *Grippotyphosa*, *Hebdomadis*, *Sejroe*, *Mini*, *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Bataviae*, *Javanica*, *Australis*, *Autumnalis*, *Ballum*, *Pyrogenes*, *Cynopteri*, *Pomona*, *Tarassovi*.

Если этиология лептоспироза известна, то при перевозке животных из конкретного хозяйства по территории страны, его проверяют с антигенами 4-7 серогрупп (*Pomona*, *Tarassovi*, *Canicola*, *Hebdomadis*, *Sejroe*, *Grippotyphosa*, *Icterohaemorrhagiae*).[63]

Ежегодно лаборатории проводящие диагностические исследования на лептоспироз, получают культуры штаммов микроорганизмов во Всесоюзном государственном научно-контрольном институте ветеринарных препаратов.

Полученные штаммы раз в 3 месяца проверяют в реакции микроагглютинации с набором лептоспирозных агглютинирующих сывороток. [51]

Для оценки пригодности культуры-антигена для постановки реакции, его сначала оценивают в проходящем свете осветительного прибора. При встряхивании живая культура определяется по наличию муаровых волн в жидкой питательной среде.

После отбора культуры по факту наличия в среде муаровых волн и отсутствия плесневой и иной микрофлоры, пленок, помутнения среды, механического осадка, ее оценивают просматривая в темном поле микроскопа в виде раздавленной капли на стекле. Учитывают концентрацию микробных клеток, их активность, исключают возможную агглютинацию культуры.

Для постановки РМА используют культуру в возрасте 5-15 суток, без посторонних примесей, без агглютинации или лизиса, концентрацией от 70 до 100 клеток на поле зрения микроскопа, при увеличении 40x1,5x7 или 40x7-10.

Для постановки РМА разведенную сыворотку разливают мерной пипеткой или аппаратом Флоринского, начиная с большего разведения, в лунки агглютинационных пластин или пробирки по 0,1 см в каждую. Количество лунок зависит от количества штаммов-антигенов, применяемых для постановки конкретной реакции (от 4 до 15). После внесения разведений сыворотки, в лунки вносят 0,1 см культуры-антигена по 1 на каждое разведение сыворотки. Пластины осторожно встряхивают, закрывают крышкой или пленкой и оставляют в термостате при 30-37 °С в течение 1 ч.

Для контроля культуры разливают по 0,1 см физиологического раствора в число лунок, соответствующее количеству штаммов-антигенов. В эти лунки вносят культуру лептоспир, по 1 лунке на каждый штамм.

По истечению времени термостатирования можно приступать к учету реакции по средством микроскопии капель из каждой лунки методом темнопольной микроскопии при увеличении 20x10 или 40x7x1,5. Сначала оценивают контрольные разведения, лептоспиры в этих лунках должны сохранять подвижность, не иметь признаков агглютинации или лизиса.

Капли из каждой лунки наносят на предметное стекло от большего к меньшему разведению. При учете этой реакции покровные стекла не используются. Для нанесения капель используют бактериологическую петлю, которую прокаливают перед взятием каждого нового антигена.

При наличии иммунитета у животного, чью сыворотку проверяют в реакции, лептоспиры в лунках будут агглютинировать. Агглютинация проявляется в склеивании лептоспир на манер паучков. Каждый паучок включает от 3 до нескольких сотен лептоспир, один конец их притянут к центру конгломерата, а второй свободно размещается на внешней его части и сохраняет подвижность. В зависимости от процента агглютинировавших лептоспир от общего их числа производят учет реакции в крестах:

++++	-	агглютинированы 100% лептоспир;
+++	-	"75% "
++	-	"50% "
+	-	"25% "
-	-	агглютинация отсутствует.

В первых разведениях сыворотки лептоспиры могут лизировать, данная реакция проявляется в обездвиживании бактерий, распада их клеток или появления в них зернистости, набухания.

Если в контрольных разведениях не выявлено лизиса или агглютинации, а культура сохранила подвижность, начинают учитывать разведения с сывороткой крови. Положительной считается реакция, прошедшая на 2 креста и более, когда прореагировало не меньше 50%

лептоспир. При появлении 2х-крестовой реакции в разведении 1:50 для невакцинированных и 1:100 у вакцинированных можно говорить об инфицировании особи лептоспирозом и или лептоспиросителем.

Реакция микроагглютинации высокоспецифичная, и наличие реакции в любом разведении говорит о контакте животного с возбудителем. Возбудителем лептоспироза в случае реагирования сыворотки на различные штаммы считается тот, антитела к которому выявлены в большем титре.

Некоторые виды животных в ряде случаев реагируют на штаммы, которые не были выделены от этих видов. Проявление такой реакции считается следствием межгрупповых связей. Так, среди лошадей, мелкого рогатого скота и свиней случаются реакции с серогруппами: Autumnalis, Synopteri, Bataviae, Pyrogenes, Australis. Но не стоит отрицать возможности заражения животных лептоспирами этих серогрупп. Однако, для подтверждения потребуется выделить живую культуру конкретного возбудителя.

Если сыворотка крови животного реагирует с лептоспирами серогруппы не свойственной для данного вида животного, сыворотку крови повторно исследуют в РМА через 10-12 суток.

Диагноз на лептоспироз подтверждается после получения результатов серологического исследования. Хозяйство или ферму признают неблагополучной по лептоспирозу при выявлении в поголовье вакцинированных животных при положительной реакции в титре 1:100, а у невакцинированных 1:50 более чем 20% обследованных животных.

Лептоспироз считают причиной абортос 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.

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

## 1.7 Заключение к литературному обзору

L. Interrogans широко распространены: В настоящее время, лептоспироз регистрируется во многих странах мира, таких как Австралия, США, Германия, страны Африки и т.д. В Российской Федерации нет регионов благополучных по лептоспирозу крупного рогатого скота. По лептоспирозу свиней благополучна только Чувашская республика.

Возбудителям лептоспироза свойственна тенденция к расширению рамок гостальной специфичности и ее относительный характер. Этим обусловлена необходимость постоянного контроля этиологической структуры лептоспироза, для выявления адаптации возбудителя к новым хозяевам, и коррекции планов лечебных и профилактических мероприятий.

Ухудшение эпид. обстановки наблюдается в годы с нормальным количеством осадков, которым предшествовал засушливый год. Подъем происходит каждые 5-6 лет, держится на протяжении 2 лет, после чего приходит спад из-за иммунизации. [31, с.316]

Заболевание приносит серьезный экономический ущерб: высокая смертность животных - до 45%, снижение удоя на 22-37%, потеря массы до 28%, падеж молодняка составляет до 90%, выбраковка сырья животного происхождения на мясокомбинатах, затраты на лечебно-профилактические мероприятия. Для минимизации убытков необходимо своевременное проведение профилактических и противоэпизоотических мероприятий, быстрая и точная диагностика, выявление всех больных и подозрительных животных. [62]

Диагностика лептоспироза затруднена, т.к. заболевание часто проходит в бессимптомной форме. При подозрении на лептоспироз диагноз обязательно подтверждают лабораторными методами, но они несовершенны: микроскопический; бактериологический; биопроба; серологические, куда входят ИФА, РМА, РА; ПЦР. Бактериологический анализ довольно сложен, трудоемок и далеко не всегда успешен. Для изоляции чистых культур

наиболее эффективен метод биопробы, однако он технически выполним исключительно в лабораториях, имеющих специализированные помещения для работы с животными. Метод микроскопии в темном поле сравнительно прост и дает наиболее быстрый результат, но при малом количестве бактерий в исследуемом материале он не информативен. Серологические методы на обнаружение АТ ретроспективны, их применение возможно лишь со второй недели заболевания. Метод ПЦР хорошо зарекомендовал себя на практике, но многие имеющиеся высокочувствительные тест-системы до сих пор не сертифицированы. [24]

Для достижения наилучших результатов в диагностике лептоспироза необходимо усовершенствовать имеющиеся на вооружении лабораторные методы.

## 2. Собственные исследования

Экспериментальная часть данной научно-исследовательской работы выполнялась на базе лаборатории ФГБУ ВГНКИ.

Лабораторные исследования проводили согласно действующей нормативной документации.

### 2.1.1 Материалы и методы исследования

Бактериальные культуры *Leptospirae interrogans*, серогрупп: *Grippotyphosa*, *Hebdomadis*, *Sejroe*, *Mini*, *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Bataviae*, *Javanica*, *Australis*, *Autumnalis*, *Ballum*, *Pyrogenes*, *Cynopteri*, *Pomons*, *Tarassovi*.

Животные лабораторные: Золотистые хомяки 3-5 недельного возраста, вес 50-70г, кролики.

Оборудование: Холодильник с температурным режимом от +4 ДО +8°C, термостат (29°C), термостат (37°C), микроскоп с конденсором темного поля, горелка спиртовая.

Посуда и реактивы: шприцы объемом 3см<sup>3</sup>, пробирки стеклянные, флаконы стеклянные, планшеты полимерные для иммунологических реакций, дозатор механический, пастеровские пипетки, набор агглютинирующих сывороток лептоспирозных, калий фосфорнокислый однозамещенный, натрий фосфорнокислый двузамещенный.

Методы: бактериологический, биологический, серологический, математический, аналитический, измерительный метод, совместно с эмпирическим и аналитическим методами, экспериментальный метод.

### **2.1.2 Изучение влияния концентрации сыворотки в питательной среде на рост бактериальной культуры**

В лаборатории культуры лептоспир поддерживаются на жидкой сывороточно-буферной среде. В соответствии с ГОСТ 25386-91 «Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики лептоспироза», в состав среды входит от 5 до 10% сыворотки кролика или барана. На примере сыворотки кролика определяем оптимальную концентрацию.

В ходе проведения исследования подготовили буфер для сывороточной питательной среды. Использовали калий фосфорнокислый однозамещенный, дистиллированную воду, натрий фосфорнокислый двузамещенный. В соответствии с ГОСТ 25386-91 «Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики лептоспироза», сначала подготовили маточные растворы.

Методика: 9,078 г однозамещенного фосфорнокислого калия растворили в 1 л дистиллированной воды, отдельно в 1 л дистиллированной воды растворили 11,879 г двузамещенного фосфорнокислого натрия. Полученные маточные растворы хранили в холодильнике при температуре 2-4 °С не более 30 суток. Буферный раствор получали смешиванием 79мл маточного раствора двузамещенного фосфорнокислого натрия, 21 мл маточного раствора однозамещенного фосфорнокислого калия и 900 мл дистиллированной воды. рН полученного буфера должен быть в пределах 7,2-7,4.

Фосфатный буфер разлили во флаконы вместимостью 500мл по 250мл во флакон и стерилизовали в автоклаве в течение 30 мин. 120°С.Рисунок 1.



Рисунок 1. Подготовка фосфатного буфера для приготовления жидкой сывороточно-буферной среды.

Сыворотку крови получали путем забора крови от кроликов-доноров, во флаконы вместимостью до 200см<sup>3</sup>. Предварительно во флаконы влили по 2 мл физиологического раствора, укупорили резиновыми пробками и стерилизовали. Кровь кролика брали устройством для взятия крови в бутылку ВК 10-01-"ЛЛ" -"Синтез", из сердца в объеме 30-40 мл. Перед взятием крови и получения сыворотки для питательной среды, доноров проверяют на наличие антител к лептоспирозу путем постановки реакции микроагглютинации.

Рисунок 2, 3.

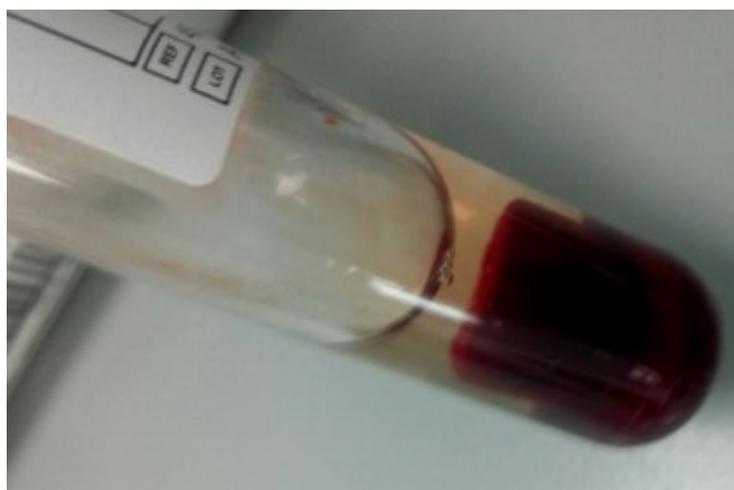


Рисунок 2. Сыворотка кролика-донора, отобранная для постановки РМА.



Рисунок 3. Подготовка донора к взятию крови.

Флаконы с отобранной кровью выдерживали в термостате при температуре  $37 \pm 1$  °С 30-60 минут, после термостатирования, флаконы переместили в холодильник на 24-47ч для отстаивания и осветления сыворотки. Когда сыворотка отстоялась, ее отобрали в стерильные флаконы

объемом 100-200см и инактивировали в течение часа на водяной бане при температуре 56-58°C.

После того, как буфер остыл, в него внесли 5 и 10 % объема инактивированной сыворотки крови. Полученную среду расфасовывали в пробирки и выдержали при (37±1) °С до 5 суток для проверки на стерильность.

Отобрали 15 штаммов лептоспир: *Grippotyphosa*, *Hebdomadis*, *Sejroe*, *Mini*, *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Bataviae*, *Javanica*, *Australis*, *Autumnalis*, *Ballum*, *Pyrogenes*, *Cynopteri*, *Pomons*, *Tarassovi*.

К отбираемой для пересева культуре предъявлялись следующие требования:

- при оценке путем встряхивания в проходящем свете осветительного прибора в пробирке отмечали появление муаровых волн, свидетельствующих о жизнеспособности лептоспир

- не допускали наличия посторонних примесей, пленок, помутнений и посторонней микрофлоры в пробирках с культурой

- при оценке культуры методом темнопольной микроскопии раздавленной капли на стекле, ее концентрация должна быть не менее 100 микробных клеток на одно поле зрения микроскопа, при увеличении 40x1,5x7 или 40x7-10

- лептоспиры должны быть подвижными, без признаков агглютинации или лизиса

- возраст культуры от 10 до 30 суток.

Произвели пересев культуры в пробирки с жидкой сывороточно-буферной средой. Из каждой исходной пробирки переносили по 0,5 мл культуры на 2 пробирки с 5 мл среды с 5% сыворотки, и 2 пробирки с 5 мл среды с 10% сыворотки. Рост культуры учитывали на 7, 10, 14 сутки термостатирования при 29°C, путем встряхивания в проходящем свете осветительного прибора, по наличию муаровых волн, а также микроскопией

в темном поле микроскопа раздавленной капли на стекле. Учитывали подвижность бактерий, отсутствие агглютинации. Таблица 2.

Таблица:2. Наличие роста бактериальной культуры в среде с 5 и 10% сыворотки кролика.

Штамм/среда	7 сутки	10 сутки	14 сутки
Grippotyphosa /буфер+5% сыворотки	+	+	+
Grippotyphosa /буфер+5% сыворотки	+	+	+
Grippotyphosa /буфер+10% сыворотки	-	-	+
Grippotyphosa /буфер+10% сыворотки	-	-	-
Pomona /буфер+5% сыворотки	-	+	+
Pomona /буфер+5% сыворотки	-	+	+
Pomona /буфер+10% сыворотки	+	+	+
Pomona /буфер+10% сыворотки	-	-	-
Tarassovi /буфер+5% сыворотки	-	-	-
Tarassovi /буфер+5% сыворотки	+	+	+
Tarassovi /буфер+10% сыворотки	+	+	+
Tarassovi /буфер+10% сыворотки	-	-	+
Ictero. /буфер+5% сыворотки	-	-	+
Ictero. /буфер+5% сыворотки	+	+	+
Ictero. /буфер+10% сыворотки	-	+	+
Ictero. /буфер+10% сыворотки	+	+	+
Canicola /буфер+5% сыворотки	-	-	+
Canicola /буфер+5% сыворотки	+	+	+
Canicola /буфер+10% сыворотки	-	+	+
Canicola /буфер+10% сыворотки	-	-	+
Sejroe /буфер+5% сыворотки	+	-	+
Sejroe /буфер+5% сыворотки	-	+	+
Sejroe /буфер+10% сыворотки	-	-	+
Sejroe /буфер+10% сыворотки	-	-	+

Продолжение таблицы 2.

Штамм/среда	7 сутки	10 сутки	14 сутки
Hebdomadis /буфер+5% сыворотки	-	+	+
Hebdomadis /буфер+5% сыворотки	+	+	+
Hebdomadis /буфер+10% сыворотки	-	+	+
Hebdomadis /буфер+10% сыворотки	-	-	+
Mini /буфер+5% сыворотки	-	-	+
Mini /буфер+5% сыворотки	+	+	+
Mini /буфер+10% сыворотки	-	-	-
Mini /буфер+10% сыворотки	-	-	+
Bataviae /буфер+5% сыворотки	+	+	+
Bataviae /буфер+5% сыворотки	-	-	+
Bataviae /буфер+10% сыворотки	-	-	-
Bataviae /буфер+10% сыворотки	-	-	+
Javanica /буфер+5% сыворотки	-	-	+
Javanica /буфер+5% сыворотки	+	+	+
Javanica /буфер+10% сыворотки	-	-	+
Javanica /буфер+10% сыворотки	+	+	+
Australis /буфер+5% сыворотки	-	-	+
Australis /буфер+5% сыворотки	-	-	+
Australis /буфер+10% сыворотки	+	+	+
Australis /буфер+10% сыворотки	-	-	-
Autumnalis /буфер+5% сыворотки	-	-	-
Autumnalis /буфер+5% сыворотки	+	+	+
Autumnalis /буфер+10% сыворотки	-	+	+
Autumnalis /буфер+10% сыворотки	-	-	-
Ballum /буфер+5% сыворотки	-	-	+
Ballum /буфер+5% сыворотки	+	+	+
Ballum /буфер+10% сыворотки	+	+	+

Продолжение таблицы 2.

Штамм/среда	7 сутки	10 сутки	14 сутки
Ballum /буфер+10% сыворотки	+	+	+
Pyrogenes /буфер+5% сыворотки	+	+	+
Pyrogenes /буфер+5% сыворотки	-	-	+
Pyrogenes /буфер+10% сыворотки	-	-	-
Pyrogenes /буфер+10% сыворотки	-	+	+
Synopteri /буфер+5% сыворотки	-	+	+
Synopteri /буфер+5% сыворотки	+	+	+
Synopteri /буфер+10% сыворотки	-	-	-
Synopteri /буфер+10% сыворотки	-	-	-

### 2.1.3 Изучение влияния рН питательной среды на рост лептоспир

В соответствии с ГОСТ 25386-91 «Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики лептоспироза», значение рН фосфатного буфера для сывороточно-буферной среды должно быть в пределах от 7,2 до 7,4. Сравниваем ростовые свойства сред с различными значениями рН.

Для проведения исследования подготовили буфер для сывороточной питательной среды. Использовали калий фосфорнокислый однозамещенный, дистиллированную воду, натрий фосфорнокислый двухзамещенный. В соответствии с ГОСТ 25386-91 «Животные сельскохозяйственные. рН буфера корректировали добавлением маточного раствора двухзамещенного фосфорнокислого натрия или однозамещенного фосфорнокислого калия, в первом случае до кислотности 7,2, во втором до 7,4.

После того, как буфер остыл, в него внесли 5% объема инактивированной сыворотки крови. Полученную среду расфасовывали в пробирки и выдержали при  $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$  3 суток проверяя на стерильность.

Для посева выбрали 15 штаммов лептоспир: *Grippotyphosa*, *Hebdomadis*, *Sejroe*, *Mini*, *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Bataviae*, *Javanica*, *Australis*, *Autumnalis*, *Ballum*, *Pyrogenes*, *Сynopteri*, *Pomons*, *Tarassovi*. К культуре предъявлялись те же требования, что и в предыдущем опыте.

Из каждой исходной пробирки переносили по 0,5 мл культуры на 2 пробирки с 5 мл среды со значением pH 7,2, и 2 пробирки с 5 мл среды с pH 7,4. Рост культуры учитывали на 7, 10, 14 сутки термостатирования при 29°C, путем встряхивания в проходящем свете осветительного прибора, по наличию муаровых волн, а также микроскопией в темном поле микроскопа раздавленной капли на стекле Рисунок 4, 5. Учитывали подвижность бактерий, отсутствие агглютинации. Таблица 3.



Рисунок 4. Отсутствие посторонних примесей и помутнения среды.

Рисунок 5. Муаровые волны в проходящем свете.

Таблица 3. Наличие роста культуры лептоспир на сывороточной среде с различным рН.

Штамм/среда	7 сутки	10 сутки	14 сутки
Grippotyphosa / рН 7,2	-	+	+
Grippotyphosa / рН 7,2	+	+	+
Grippotyphosa / рН 7,4	-	-	+
Grippotyphosa / рН 7,4	+	+	+
Pomona / рН 7,2	-	+	+
Pomona / рН 7,2	-	+	+
Pomona / рН 7,4	+	+	+
Pomona / рН 7,4	-	-	-
Tarassovi / рН 7,2	-	+	+
Tarassovi / рН 7,2	+	+	+
Tarassovi / рН 7,4	-	+	+
Tarassovi / рН 7,4	-	-	+
Ictero. / рН 7,2	-	+	+
Ictero. / рН 7,2	+	+	+
Ictero. / рН 7,4	-	-	+
Ictero. / рН 7,4	+	+	+
Canicola / рН 7,2	-	-	+
Canicola / рН 7,2	+	+	+
Canicola / рН 7,4	-	+	+
Canicola / рН 7,4	-	+	+
Sejroe / рН 7,2	+	+	+
Sejroe / рН 7,2	+	+	+
Sejroe / рН 7,4	-	+	-
Sejroe / рН 7,4	+	+	+

Продолжение таблицы 3.

Штамм/среда	7 сутки	10 сутки	14 сутки
Hebdomadis / pH 7,2	-	+	+
Hebdomadis / pH 7,2	+	+	+
Hebdomadis / pH 7,4	-	+	+
Hebdomadis / pH 7,4	-	-	+
Mini / pH 7,2	-	+	+
Mini / pH 7,2	+	+	+
Mini / pH 7,4	+	-	-
Mini / pH 7,4	-	-	+
Bataviae / pH 7,2	+	+	+
Bataviae / pH 7,2	-	-	+
Bataviae / pH 7,4	-	-	-
Bataviae / pH 7,4	-	+	+
Javanica / pH 7,2	-	-	+
Javanica / pH 7,2	+	+	+
Javanica / pH 7,4	-	-	+
Javanica / pH 7,4	+	+	+
Australis / pH 7,2	-	+	+
Australis / pH 7,2	-	+	+
Australis / pH 7,4	+	+	+
Australis / pH 7,4	-	-	-
Autumnalis / pH 7,2	-	-	-
Autumnalis / pH 7,2	+	+	+
Autumnalis / pH 7,4	-	+	+
Autumnalis / pH 7,4	-	-	+
Ballum / pH 7,2	-	+	-
Ballum / pH 7,2	+	+	+
Ballum / pH 7,4	+	+	+

Продолжение таблицы 3.

Штамм/среда	7 сутки	10 сутки	14 сутки
Ballum / pH 7,4	-	-	-
Pyrogenes / pH 7,2	+	+	+
Pyrogenes / pH 7,2	-	+	+
Pyrogenes / pH 7,4	-	+	+
Pyrogenes / pH 7,4	+	+	+
Cynopteri / pH 7,2	+	+	+
Cynopteri / pH 7,2	-	-	+
Cynopteri / pH 7,4	-	-	-
Cynopteri / pH 7,4	-	+	+

#### 2.1.4 Изучение выделения лептоспир от животных в зависимости от возраста заражающей культуры

На 12-26 сутки термостатирования бактериальной культуры на сыворочно-буферной среде с 5% сыворотки кролика, пробирки просматривали в проходящем свете осветительного прибора, для определения роста лептоспир. Культуру из каждой пробирки наносили на стекло и просматривали в микроскопе с конденсором темного поля. Было отобрано по 2 пробирки культуры штаммов *Grippotyphosa*, *Sejroe*, *Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Pomons*, *Tarassovi*, с накоплением от 80 до 150 микробных клеток на поле зрения микроскопа, подвижных, без признаков агглютинации. Возраст культуры: 12, 13, 14, 16, 18, 21 сутки. Рисунок 6.



Рисунок 6. Микроскоп с конденсором темного поля.

Заражающий материал вводили внутривенно, в количестве 0,8 мл, золотистым хомякам в возрасте 3-5 недель, весом 50-70г. Через 1 час у животных отбирали кровь и производили посев 0,5 мл крови на 5 мл фосфатно-буферной среды с 5% сыворотки кролика – по 2 пробирки. Рисунок 7.



Рисунок 7. Пробирки с посевом патологического материала.

Через 7, 14, 21 сутки производилась микроскопия для оценки роста культуры. Таблица 4.

Таблица 4. Наличие живых лептоспир в посевах крови при микроскопии капли материала на стекле в темном поле микроскопа.

№	Возраст культуры (сут)	7 сутки	14 сутки	21 сутки
1	12	-	-	+
2	12	-	-	-
3	12	-	-	-
4	12	-	-	+
5	12	-	+	+
6	12	-	-	-
7	12	-	-	-
8	12	-	+	+
9	12	-	+	+
10	12	-	-	-
11	12	-	+	+
12	12	-	-	-
13	13	-	-	-
14	13	-	-	-
15	13	-	-	-
16	13	-	-	-
17	13	-	-	-
18	13	-	-	-
19	13	+	+	+
20	13	-	-	-
21	13	-	-	-
22	13	-	+	+
23	13	-	-	-
24	13	-	-	-

Продолжение таблицы 4.

№	Возраст культуры (сут)	7 сутки	14 сутки	21 сутки
25	13	-	-	+
26	13	-	-	-
27	13	-	-	-
28	13	-	-	+
29	13	-	+	+
30	13	-	-	-
31	13	-	-	-
32	13	-	+	+
33	13	-	+	+
34	13	-	-	-
35	13	-	+	+
36	13	-	-	-
37	13	-	-	-
38	14	-	-	-
39	14	-	-	-
40	14	-	-	-
41	14	-	-	-
42	14	-	-	-
43	14	-	-	-
44	14	-	-	+
45	14	-	-	-
46	14	-	+	+
47	14	-	-	-
48	14	-	-	-

Продолжение таблицы 4.

№	Возраст культуры (сут)	7 сутки	14 сутки	21 сутки
49	14	-	-	-
50	14	-	-	+
51	14	-	+	-
52	14	-	-	-
53	14	+	+	+
54	14	-	-	-
55	14	-	-	-
56	18	+	+	+
57	18	+	+	+
58	18	-	-	-
59	18	-	+	+
60	18	+	-	-
61	18	-	+	+
62	18	-	+	+
63	18	-	+	+
64	18	+	+	+
65	18	+	+	+
66	18	-	-	-
67	18	+	+	+
68	18	+	+	+
69	18	-	-	-
70	18	-	+	+
71	18	-	-	-
72	18	-	-	-

Продолжение таблицы 4.

№	Возраст культуры (сут)	7 сутки	14 сутки	21 сутки
73	18	-	-	-
74	18	-	+	+
75	18	-	+	+
76	18	+	+	+
77	18	+	+	+
78	18	-	-	-
79	18	-	-	-
80	18	+	+	+
81	18	+	+	+
82	20	-	-	-
83	20	-	+	+
84	20	+	-	-
85	20	+	+	+
86	20	-	-	-
87	20	-	-	-
88	20	-	-	-
89	20	-	-	-
90	20	-	-	-
91	20	-	-	+
92	20	-	+	+
93	20	-	-	-
94	20	-	+	+
95	20	-	-	-
96	20	+	+	+

Продолжение таблицы 4.

№	Возраст культуры (сут)	7 сутки	14 сутки	21 сутки
97	20	-	-	-
98	20	-	-	-
99	20	-	-	-
100	20	-	-	-
101	20	-	-	-
102	26	-	-	-
103	26	-	-	-
104	26	-	+	+
105	26	-	+	+
106	26	-	-	-
107	26	-	-	-
108	26	-	-	-
109	26	-	-	-
110	26	-	-	-
111	26	-	-	-
112	26	-	-	-
113	26	-	-	-
114	26	-	-	-
115	26	-	+	+
116	26	+	+	+
117	26	-	-	-
118	26	-	+	+
119	26	-	-	-
120	26	-	-	-
121	26	+	+	-

### **2.1.5 Изучение ростовых свойств сывороточной буферной среды без сыворотки кролика**

На 14-16 день термостатирования бактериальной культуры на сывороточно-буферной среде с 5% сыворотки кролика, пробирки просматривали в проходящем свете осветительного прибора, для определения роста лептоспир. Культуру из каждой пробирки наносили на стекло и просматривали в микроскопе с конденсором темного поля. Отобрали культуру *L. interrogans*, с накоплением от 80 до 150 микробных клеток на поле зрения микроскопа, подвижных, без признаков агглютинации. Возраст культуры: 14, 15, 16 сутки.

Заражающий материал вводили внутрибрюшинно, в количестве 0,8 мл, золотистым хомякам в возрасте 3-5 недель, весом 50-70г. Через 1 час у животных отбирали кровь и производили посев 0,5 мл крови на 5 мл фосфатно-буферной среды с 5% сыворотки кролика – по 1 пробирке и фосфатного буфера без добавления сыворотки.

Через 7, 14, 21 сутки производилась микроскопия для оценки роста культуры.

Через 2 недели произведен пересев 1 мл культуры на 2 пробирки с фосфатно-буферной сывороточной средой и 2 пробирки с фосфатным буфером без внесения сыворотки кролика. Пробирки поместили в термостат на 29 °С. Таблица 5, 6.

Таблица 5. Результаты микроскопии посевов крови на среду с сывороткой и без сыворотки кролика.

№	Возраст культуры (сут)/наличие сыворотки в питательной среде (+/-)	7 сутки	14 сутки	21 сутки
1	14/+	+	+	+
2	14/+	-	-	-
3	14/+	-	-	-
4	14/+	+	+	+
5	14/+	-	-	-
6	14/+	-	-	-
7	14/+	-	-	+
8	14/+	-	+	+
9	14/+	-	-	-
10	14/-	-	-	-
11	14/-	-	+	-
12	14/-	+	+	+
13	14/-	-	-	-
14	14/-	+	+	+
15	14/-	-	-	-
16	14/-	-	-	-
17	14/-	+	+	+
18	14/-	-	-	-
19	15/+	-	+	+
20	15/+	+	+	+
21	15/+	-	-	-
22	15/+	-	+	+
23	15/+	-	-	+
24	15/+	+	+	+

Продолжение таблицы 5.

№	Возраст культуры (сут)/наличие сыворотки в питательной среде (+/-)	7 сутки	14 сутки	21 сутки
25	15/-	+	+	+
26	15/-	-	+	+
27	15/-	-	-	-
28	15/-	+	-	+
29	15/-	+	+	+
30	15/-	-	-	-
31	16/+	-	-	+
32	16/+	+	+	+
33	16/+	+	+	+
34	16/+	-	-	-
35	16/+	-	+	+
36	16/+	+	-	-
37	16/+	+	+	+
38	16/+	+	+	+
39	16/+	+	+	+
40	16/-	+	+	+
41	16/-	+	+	+
42	16/-	-	-	-
43	16/-	+	+	+
44	16/-	+	+	+
45	16/-	-	-	-
46	16/-	-	+	+
47	16/-	-	-	-
48	16/-	+	+	+

Таблица 6. Рост лептоспир при пересеве на среду с сывороткой кролика и без сыворотки.

Штамм/среда	7 сутки	10 сутки	14 сутки
Grippytyphosa /буфер+сыворотка	+	+	+
Grippytyphosa /буфер+сыворотка	-	+	+
Grippytyphosa /буфер	-	+	-
Grippytyphosa /буфер	-	-	-
Pomona /буфер+сыворотка	+	+	+
Pomona /буфер+сыворотка	-	-	+
Pomona /буфер	-	-	-
Pomona /буфер	-	-	-
Tarassovi /буфер+сыворотка	-	+	+
Tarassovi /буфер+сыворотка	-	-	-
Tarassovi /буфер	-	+	-
Tarassovi /буфер	-	-	-
Ictero. /буфер+сыворотка	+	+	+
Ictero. /буфер+сыворотка	+	+	+
Ictero. /буфер	+	-	-
Ictero. /буфер	-	-	-
Canicola /буфер+сыворотка	+	+	+
Canicola /буфер+сыворотка	-	-	+
Canicola /буфер	-	-	-
Canicola /буфер	+	+	-
Sejroe /буфер+сыворотка	-	-	+
Sejroe /буфер+сыворотка	+	+	+
Sejroe /буфер	-	+	-
Sejroe /буфер	-	-	-

На 10ий день в пробирках без сыворотки наблюдается слабый рост у штаммов Icterohaemorrhagiae и Canicola и отсутствие роста иных культур, при микроскопии на 14 сутки рост Icterohaemorrhagiae и Canicola отсутствует. В пробирках с сывороточной средой наблюдается рост числа микробных клеток

лептоспир. На 14ые сутки выполнен пересев выделенной культуры без признаков агглютинации, с накоплением микробных клеток (50-150) на 2 пробирки с сывороточной средой и последующая типизация культуры с набором агглютинирующих сывороток. Рисунок 8.

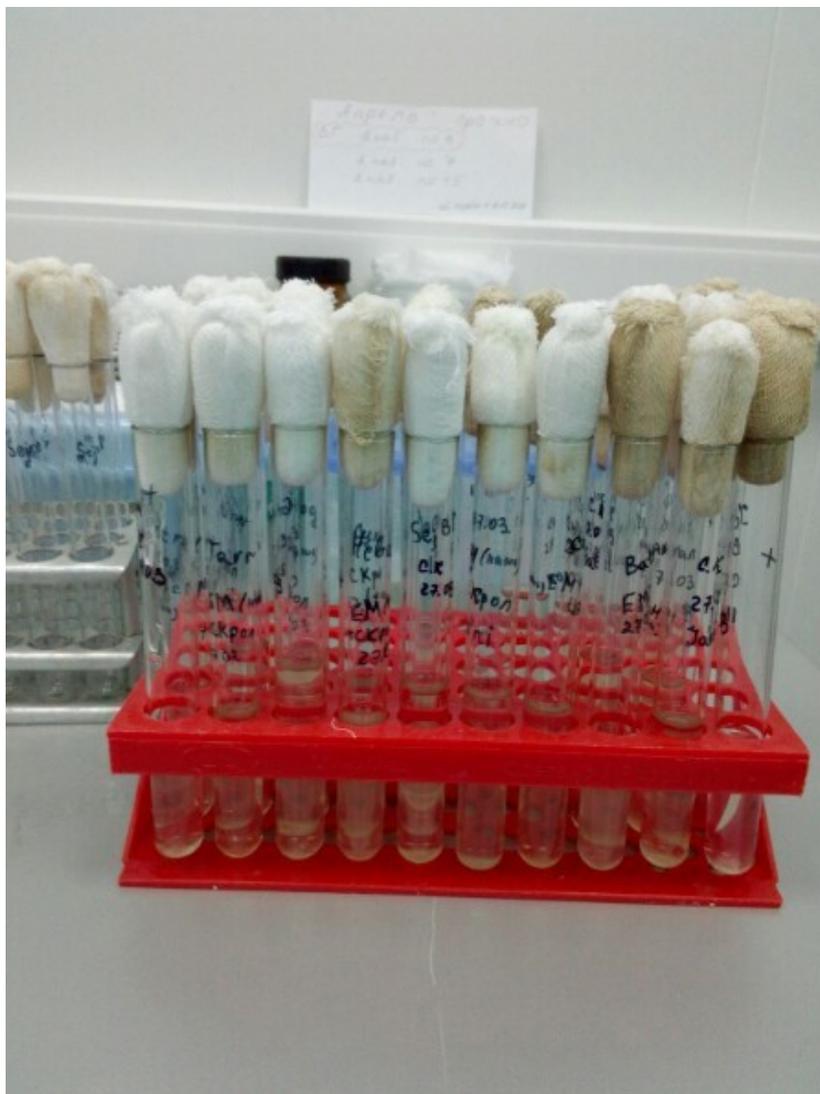


Рисунок 8. Культура, отобранная для типизации.

## 2.1.6 Типизация выделенной культуры в РМА

Серологический метод основан на взаимодействии специфического антитела с антигеном. В случае лептоспироза применяют реакцию микроагглютинации (РМА) и реакцию иммунной адсорбции (РИА). В реакции микроагглютинации антигеном служат бактериальные культуры различных штаммов лептоспир. Основные штаммы, применяемые для постановки РМА, постоянно поддерживаются в лаборатории. (Таблица 7)

Таблица 7. Антигены - живые культуры штаммов лептоспир.

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

Продолжение таблицы 7.

Bataviae	djatzi (bativiae)	HS-26 (Van Tienen)
Javanica	poi (javanica)	Poi (Veldrat Dataviae 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)

Для оценки пригодности культуры-антигена для постановки реакции, его сначала оценивают в проходящем свете осветительного прибора. При встряхивании живая культура определяется по наличию муаровых волн в жидкой питательной среде.

После отбора культуры по факту наличия в среде муаровых волн и отсутствия плесневой и иной микрофлоры, пленок, помутнения среды, механического осадка, ее оценивают просматривая в темном поле микроскопа в виде раздавленной капли на стекле. Учитывают концентрацию микробных клеток, их активность, исключают возможную агглютинацию культуры. Рисунок 9.

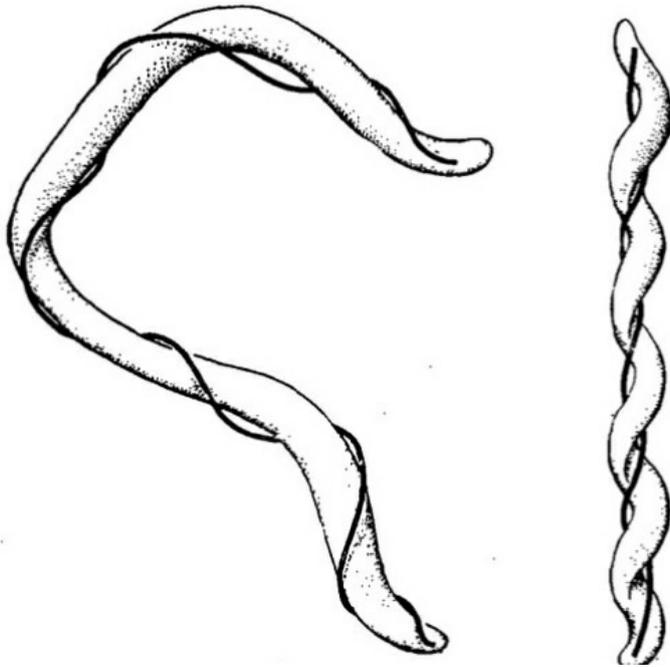


Рисунок 9. Схема строения возбудителя лептоспироза.

Для постановки РМА используют культуру в возрасте 5-15 суток, без посторонних примесей, без агглютинации или лизиса, концентрацией от 70 до 100 клеток на поле зрения микроскопа, при увеличении 40x1,5x7 или 40x7-10.

Для постановки РМА разведенную сыворотку разливают мерной пипеткой или аппаратом Флоринского, начиная с большего разведения, в лунки агглютинационных пластин или пробирки по 0,1 см в каждую. Количество лунок зависит от количества штаммов-антигенов, применяемых для постановки конкретной реакции (от 4 до 15). После внесения разведений сыворотки, в лунки вносят 0,1 см культуры-антигена по 1 на каждое разведение сыворотки. Пластины осторожно встряхивают, закрывают крышкой или пленкой и оставляют в термостате при 30-37 °С в течение 1 ч.

Для контроля культуры разливают по 0,1 см физиологического раствора в число лунок, соответствующее количеству штаммов-антигенов. В эти лунки вносят культуру лептоспир, по 1 лунке на каждый штамм.

По истечении времени термостатирования можно приступать к учету реакции по средствам микроскопии каплей из каждой лунки методом темнопольной микроскопии при увеличении 20x10 или 40x7x1,5. Сначала оценивают контрольные разведения, лептоспиры в этих лунках должны сохранять подвижность, не иметь признаков агглютинации или лизиса.

Капли из каждой лунки наносят на предметное стекло от большего к меньшему разведению. При учете этой реакции покровные стекла не используются. Для нанесения каплей используют бактериологическую петлю, которую прокалывают перед взятием каждого нового антигена.

При наличии иммунитета у животного, чью сыворотку проверяют в реакции, лептоспиры в лунках будут агглютинированы. Агглютинация проявляется в склеивании лептоспир на манер паучков. Каждый паучок включает от 3 до нескольких сотен лептоспир, один конец их притянут к центру конгломерата, а второй свободно размещается на внешней его части и сохраняет подвижность. В зависимости от процента агглютинировавшихся лептоспир от общего их числа производят учет реакции в крестах:

++++	-	агглютинированы 100% лептоспир;
+++	-	"75% "
++	-	"50% "
+	-	"25% "
-	-	агглютинация отсутствует.

В первых разведениях сыворотки лептоспиры могут лизировать, данная реакция проявляется в обездвиживании бактерий, распаде их клеток или появления в них зернистости, набухания.

Если в контрольных разведениях не выявлено лизиса или агглютинации, а культура сохранила подвижность, начинают учитывать

разведения с сывороткой крови. Положительной считается реакция, прошедшая на 2 креста и более, когда прореагировало не меньше 50% лептоспир. Рисунок 10, 11.



Рисунок 10. Агглютинация культуры.

Рисунок 11. Контрольный образец без признаков агглютинации.

Лептоспиры – это подвижные спиралевидно-закрученные нитевидные бактерии, концы которых могут быть загнуты с одной или нескольких сторон, бывают и бескрючковые формы. Характер движения бактерий в жидкой питательной среде прямолинейный, поступательный, вращательный.

## 2.2 Результаты исследования

### 2.2.1 Влияние концентраций сыворотки в питательной среде на рост бактериальной культуры

В соответствии с ГОСТ 25386-91 «Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики лептоспироза», подготовили буфер для сывороточной питательной среды.

Буферный раствор получали смешиванием 79мл маточного раствора двузамещенного фосфорнокислого натрия, 21 мл маточного раствора однозамещенного фосфорнокислого калия и 900 мл дистиллированной воды. рН полученного буфера 7,3. После автоклавирования, в него внесли 5 и 10 % объема инактивированной сыворотки крови. Полученную среду расфасовывали в пробирки и выдержали при  $(37\pm 1)$  °С до 5 суток для проверки на стерильность.

Отобрали 15 штаммов лептоспир, без посторонних примесей, пленок, помутнений и посторонней микрофлоры в пробирках с культурой. При оценке культуры методом темнопольной микроскопии раздавленной капли на стекле, ее концентрация была не менее 100 микробных клеток на одно поле зрения микроскопа, при увеличении 40x1,5x7 или 40x7-10. Возраст культуры от 10 до 30 суток.

Произвели пересев культуры каждого штамма на 4 пробирки с жидкой сывороточно-буферной средой. 2 пробирки с 5 мл среды с 5% сыворотки, и 2 пробирки с 5 мл среды с 10% сыворотки. Рост культуры учитывали на 7, 10, 14 сутки термостатирования при 29°С, путем встряхивания в проходящем свете осветительного прибора, по наличию муаровых волн, а также микроскопией в темном поле микроскопа раздавленной капли на стекле. Жизнеспособной, активной культурой считали культуру без признаков агглютинации, подвижную, с накоплением микробных клеток не менее 50 на поле зрения микроскопа. Результаты представлены на **рисунке 12.**

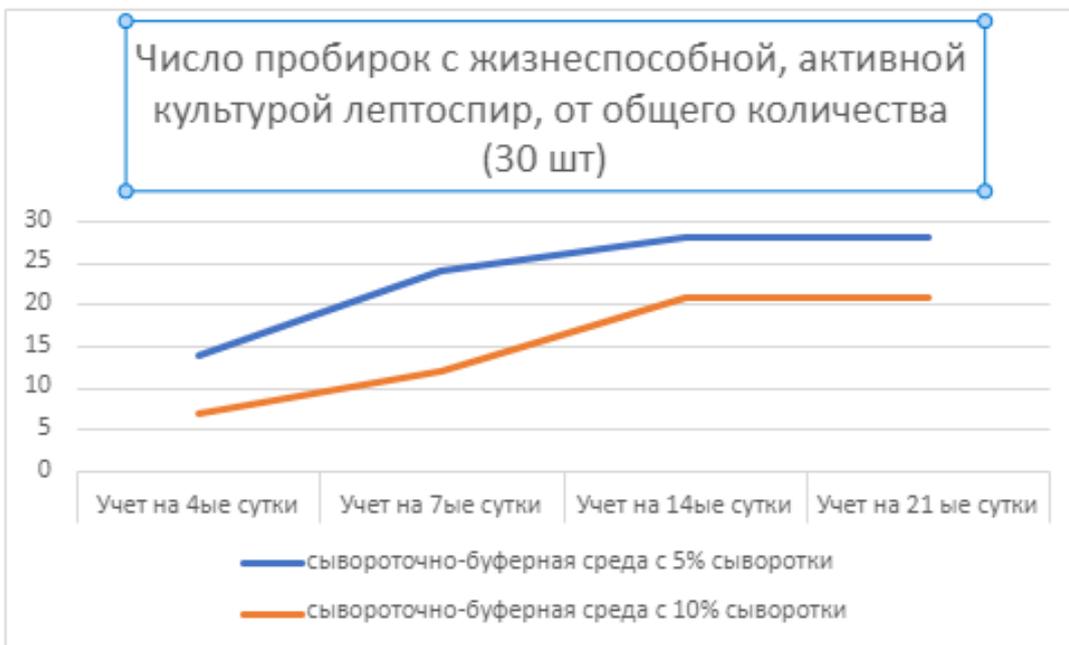


Рисунок 12. Результаты учета жизнеспособности бактериальной культуры в пересевах на сывороточной питательной среде с разной концентрацией сыворотки.

На 4-е сутки муаровые волны, свидетельствующие о наличии лептоспир в пробирке, обнаружены в 7ми из 30-ти пробирок с 10% сыворотки и 14-ти из 30-ти пробирок с 5% сыворотки, что в 2 раза больше, чем при 10% сыворотки. На 7ые сутки учета, активная культура без агглютинации наблюдалась при микроскопии в темном поле в 12-ти пробирках с 10% сыворотки и в 24-ех пробирках с 5% сыворотки. К 14-ым суткам активный рост на среде с 10% сыворотки отмечен в 21-ой пробирке, на среде с 5% сыворотки в 28-ми пробирках. В через 7 дней значения не изменились.

Таким образом, выявлено влияние концентрации сыворотки кролика в сывороточно-буферной среде, на активность роста лептоспир. Повышенное содержание сыворотки кролика в питательной среде сдерживает рост культуры. При 5% сыворотки качество культуры к 14-ым суткам, на 20 %

превосходит показатели лептоспир, выросших на жидкой питательной среде с 10% сыворотки кролика.

### 2.2.2 Влияние рН питательной среды на рост лептоспир

В соответствии с ГОСТ 25386-91 «Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики лептоспироза», значение рН фосфатного буфера для сывороточно-буферной среды должно быть в пределах от 7,2 до 7,4. Сравниваем ростовые свойства сред с различными значениями рН.

Буфер для сывороточной питательной среды подготовили в соответствии с ГОСТ 25386-91 «Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики лептоспироза».

рН буфера корректировали добавлением маточного раствора двузамещенного фосфорнокислого натрия или однозамещенного фосфорнокислого калия, в первом случае до кислотности 7,2, во втором до 7,4.

После автоклавирования в буферный раствор внесли 5% объема инактивированной сыворотки крови. Полученную среду расфасовывали в пробирки и выдержали при  $(37\pm 1)$  °С 3 суток проверяя на стерильность.

Для посева выбрали 15 штаммов лептоспир без посторонних примесей, пленок, помутнений и посторонней микрофлоры в пробирках с культурой. При оценке культуры методом темнопольной микроскопии раздавленной капли на стекле, ее концентрация была не менее 100 микробных клеток на одно поле зрения микроскопа, при увеличении 40x1,5x7 или 40x7-10. Возраст культуры от 10 до 30 суток.

Из каждой исходной пробирки переносили по 0,5 мл культуры на 2 пробирки с 5 мл среды со значением рН 7,2, и 2 пробирки с 5 мл среды с рН 7,4. Рост культуры учитывали на 7, 10, 14 сутки термостатирования при 29°С, путем встряхивания в проходящем свете осветительного прибора, по наличию муаровых волн, а также микроскопией в темном поле микроскопа раздавленной капли на стекле. Учитывали подвижность бактерий, отсутствие агглютинации. Рисунок 13.

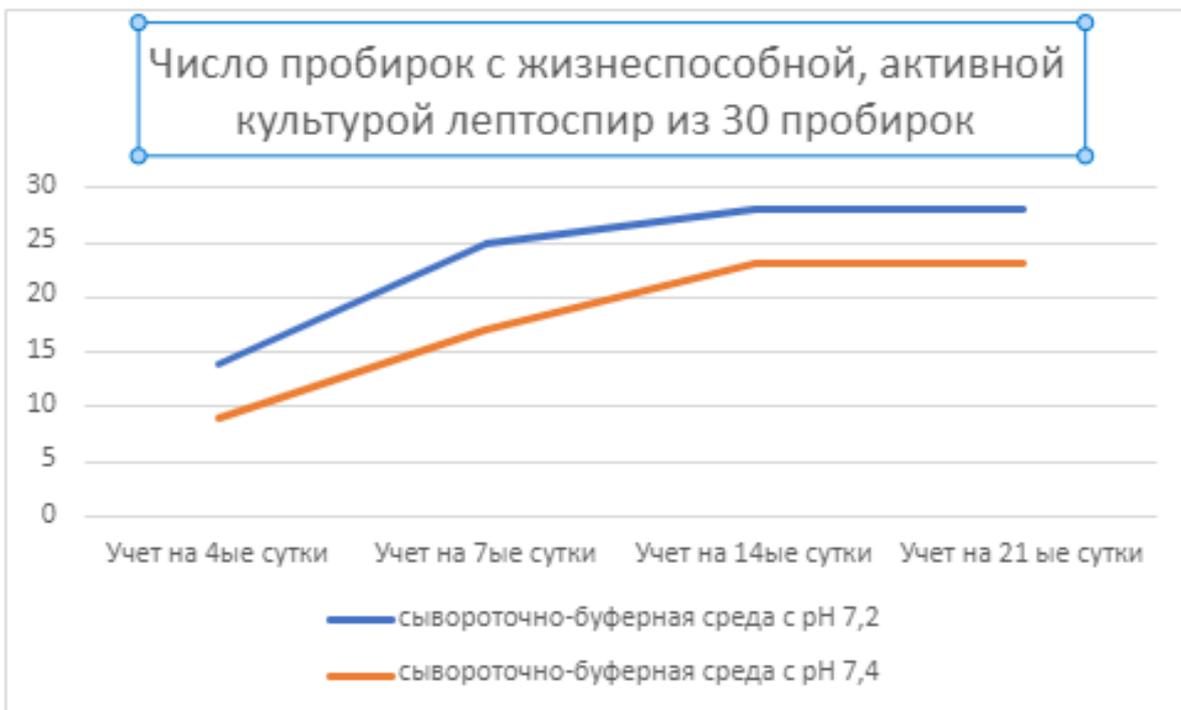


Рисунок 13. Влияние рН питательной среды на рост лептоспир.

На 4-е сутки по муаровым волнам, свидетельствующим о наличии лептоспир в пробирке, рост лептоспир установлен в 9-ти из 30-ти пробирок со средой, рН которой = 7,4 и 14-ти из 30 пробирок с рН среды 7,2. На 7ые сутки учета, активная культура без агглютинации наблюдалась при микроскопии в темном поле в 17-ти пробирках с рН 7,4 и 25-ти пробирках с рН 7,2. К 14-ым суткам активный рост на среде с рН 7,4 отмечен в 23-х пробирках, на среде с рН 7,2 - в 28-ми пробирках. На 21-е сутки учета значения не изменились.

Экспериментально установлено влияние рН среды на активность роста лептоспир в жидкой сывороточно-буферной среде. При показателе кислотности 7,4 набор биомассы на 14-е сутки идет на 13 % менее активно, чем при значении рН 7,2.

### **2.2.3 Зависимость выделения лептоспир из крови животных от возраста заражающей культуры**

Зачастую, при выделении лептоспир из патологического материала, посев оказывается контаминирован посторонней микрофлорой. Для очистки такой культуры применяют биологический метод, который заключается во внутрибрюшинном введении загрязненной культуры лабораторным животным, и дальнейшим выделением их при посеве крови или гомогенизированных органов на жидкие питательные среды. Культуру удается выделить в 20-30% случаев. Изучена возможность влияния различных факторов на выделяемость лептоспир от лабораторных животных.

На 12-26 сутки термостатирования бактериальной культуры на сывороточно-буферной среде с 5% сыворотки кролика, пробирки просматривали в проходящем свете осветительного прибора, для определения роста лептоспир. Культуру из каждой пробирки наносили на стекло и просматривали в микроскопе с конденсором темного поля. Было отобрано по 2 пробирки культуры 6 различных штаммов возбудителей лептоспироза, с накоплением от 80 до 150 микробных клеток на поле зрения микроскопа, подвижных, без признаков агглютинации. Возраст культуры: 12, 13, 14, 16, 18, 21 сутки.

Заражающий материал вводили внутрибрюшинно, в количестве 0,8 мл, золотистым хомякам в возрасте 3-5 недель, весом 50-70г. Через 1 час у животных отбирали кровь и производили посев 0,5 мл крови на 5 мл фосфатно-буферной среды с 5% сыворотки кролика. 1 пробирка питательной среды на 1 хомяка.

Через 7, 14, 21 сутки производилась микроскопия для оценки роста культуры. По результатам учета на 21ые сутки составлен график. Рисунок 14.

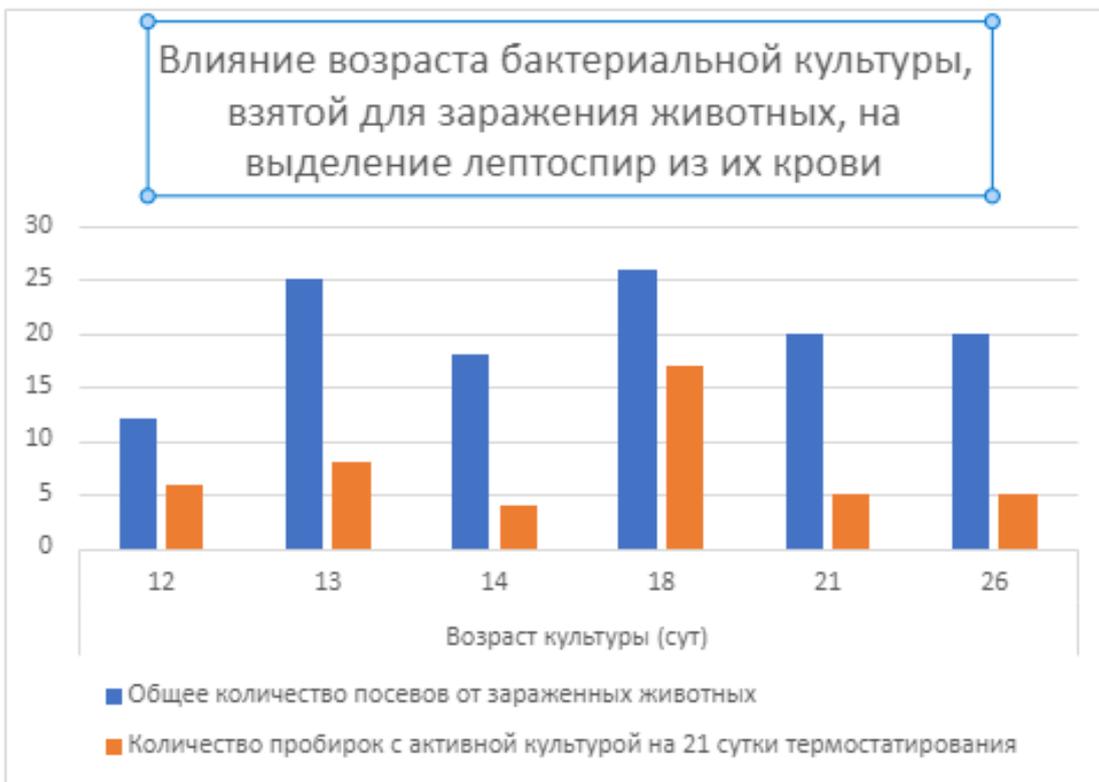


Рисунок 14. Рост культуры лептоспир в жидкой питательной среде на 21ые сутки термостатирования.

От каждого зараженного животного отбирали 0,5 мл крови и высевали на сыворочно-буферную жидкую питательную среду. 12-ти суточной культурой заразили 12 золотистых хомяков. На 21ые сутки из 12 пробирок с посевами жизнеспособными оказались 6 штук. 13-ти суточную культуру ввели 25-ти головам, из 25-ти посевов активные лептоспиры наблюдались в 8-ми пробирках. Из 18-ти пробирок с посевами от животных зараженных 14-ти суточной культурой, на 21-е сутки термостатирования живые лептоспиры были в 4 пробирках. Наибольшее количество жизнеспособной культуры обнаружено в посевах от животных зараженных 18-ти суточной культурой, что составило 17-ть из 26-ти пробирок. При заражении 21-но и 26-ти дневной культурой из 20 посевов активны 5. Полученные данные перевели в проценты.

Рисунок 15.

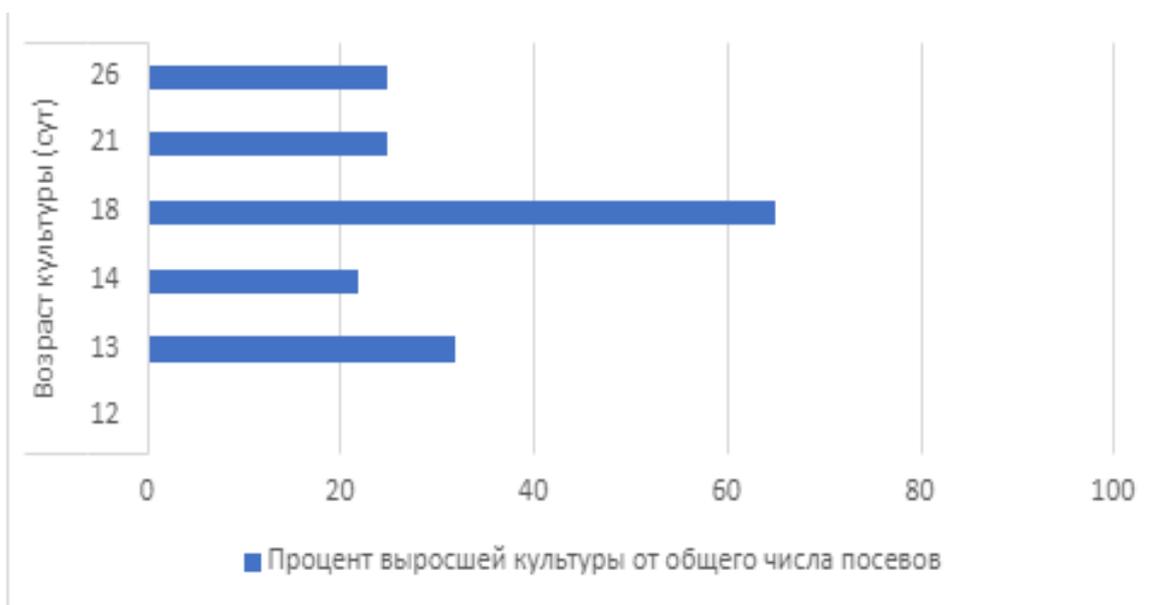


Рисунок 15. Влияние возраста бактериальной культуры на % ее успешного выделения из крови животного после заражения.

Минимальный процент успешного выделения наблюдается при заражении 14-ти суточной культурой и составляет 22%. 25-ти и 26-ти суточная культура, взятая для заражения, выделяется от животных в 25% случаев. При заражении 13-ти суточной культурой бактерий выделили в 32% случаев, лучшие результаты наблюдаются при заражении 12-ти и 18-ти дневной культурой и составляют соответственно 50 и 65%.

Полученные данные проверили математически, применяя следующие формулы:

Если  $n_1 = n_2$

$$td = \frac{|p_1 - p_2|}{\sqrt{\left(\frac{p_1 * q_1}{n_1}\right) + \left(\frac{p_2 * q_2}{n_2}\right)}}$$

(1)

Если  $n_1 \neq n_2$

$$td = \frac{|p_1 - p_2|}{\sqrt{\left(\frac{(n_1 - 1) * (p_1 * q_1) + (n_2 - 1) * (p_2 * q_2)}{n_1 + n_2 - 2}\right) * \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}$$

(2)

td-фактическое значение критерия достоверности Стьюдента

p-%зараженных животных, от которых удалось выделить культуру

q-% зараженных животных, от которых не удалось выделить культуру

n- размер выборки

td сравнивали с tst- стандартным значением критерия достоверности Стьюдента (справочное).

По итогам математического анализа результат в 50% при выделении возбудителя от животных зараженных 12-ти дневной культурой признан недостоверным. Процент успешного выделения лептоспир при заражении животных 18-ти суточной культурой достоверно выше при уровне доверительной вероятности  $p < 0,05$ .

Обнаружена полиномиальная регрессионная зависимость между возрастом бактериальной культуры и ее выделяемостью от животного при заражении животных с целью очистки и идентификации возбудителя лептоспироза. Достоверность результатов подтвердили математически, при высшем уровне доверительной вероятности.

#### **2.2.4 Ростовые свойства сывороточной буферной среды без сыворотки кролика**

На 14-16 день термостатирования бактериальной культуры на сывороточно-буферной среде с 5% сыворотки кролика, пробирки просматривали в проходящем свете осветительного прибора, для определения роста лептоспир. Культуру из каждой пробирки наносили на стекло и просматривали в микроскопе с конденсором темного поля. Отобрали культуру *L. interrogans*, с накоплением от 80 до 150 микробных клеток на поле зрения микроскопа, подвижных, без признаков агглютинации. Возраст культуры: 14, 15, 16 сутки.

Заражающий материал вводили внутрибрюшинно, в количестве 0,8 мл, золотистым хомякам в возрасте 3-5 недель, весом 50-70г. Через 1 час у животных отбирали кровь и производили посев 0,5 мл крови на 5 мл фосфатно-буферной среды с 5% сыворотки кролика – по 1 пробирке и фосфатного буфера без добавления сыворотки.

Через 7, 14, 21 сутки производилась микроскопия для оценки роста культуры.

От 9-ти зараженных 14-ти суточной культурой лептоспир животных на питательной среде с сывороткой кролика жизнеспособными к 21-ому дню термостатирования оказались 4 посева, на среде без сыворотки кролика – 3 пробирки. От зараженных 15-ти суточной культурой кровь внесли в 6 пробирок с сывороточно-буферной средой с 5% сыворотки и 6 пробирок без сыворотки, к 21-ому дню живые лептоспиры выявлены в 5 и 4 пробирках соответственно. Из 9 пробирок с посевом крови от зараженных 16-ти суточной культурой активные лептоспиры находятся в 7-ми пробирках на среде без сыворотки кролика и 6-ти из 9-ти- без сыворотки. Полученные результаты перевели в процентное соотношение. Рисунок 16.

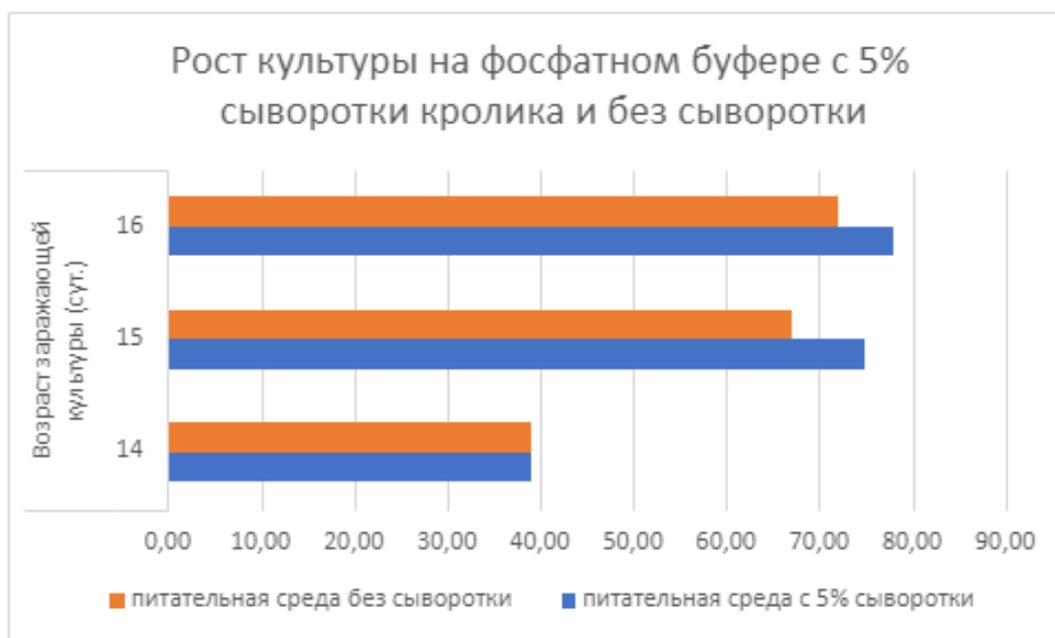


Рисунок 16. Процент успешно выделенной культуры лептоспир от общего числа посевов крови зараженных животных.

От зараженных 14-ти суточной культурой лептоспиры выделены в 39% случаев. От зараженных 15-ти дневной культурой на среде с сывороткой кролика лептоспиры обнаружены в 75% случаев, а на среде без сыворотки в 67%. 16-дневная заражающая культура выделяется из крови животного в 78% и 72% случаев соответственно.

Культура успешно выделяется при посеве на жидкую буферную среду практически одинаково хорошо, как при внесении в среду сыворотки, так и без нее. Это может быть связано с достаточным количеством питательных веществ в крови, вносимой в среду при посеве патологического материала.

Также, полученные данные согласуются с установленной ранее зависимостью от возраста культуры успешного ее выделение из крови зараженного животного.

Через 2 недели произведен пересев 1 мл культуры на 2 пробирки с фосфатно-буферной сывороточной средой и 2 пробирки с фосфатным

буфером без внесения сыворотки кролика. Пробирки поместили в термостат на 29 °С. Рисунок 17.



Рисунок 17. Результаты пересева культуры на фосфатный буфер с внесением сыворотки кролика и без сыворотки.

На 4-е сутки термостатирования в среде с внесением сыворотки муаровые волны наблюдались в 6 из 12 пробирок, на 7-е сутки лептоспиры встречались в 9-ти из 12 пробирок, к 14-ым суткам количество пробирок с жизнеспособной культурой достигло 11 штук. На среде без добавления сыворотки муаровые волны на 4ые сутки термостатирования замечены в 2-ух из 12-ти пробирок, на 7ые сутки под микроскопом единичные лептоспиры встречаются в 3-ех из 12-ти пробирок, на 14-е сутки живых лептоспир нет ни в одной из пробирок без сыворотки.

Таким образом, буферная среда без сыворотки крови подходит для выделения лептоспир непосредственно из крови животного, но непригодна для дальнейших пересевов.

Установлен оптимальный возраст культуры Лептоспир, который составил 15-18 суток. Достоверность результатов подтвердили математически, при уровне доверительной вероятности  $p=0.05$ . Рисунок 18.

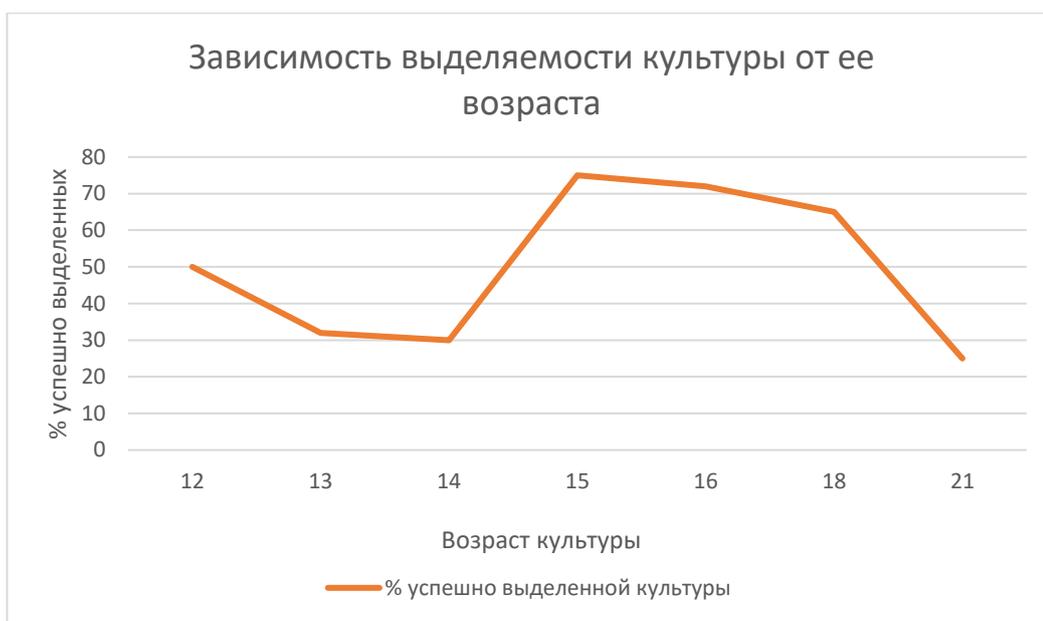


Рисунок 18. Зависимость процента успешно выделенной культуры от возраста заражающего материала.

Для расчетов применялись следующие формулы:

Если  $n_1 = n_2$

$$td = \frac{|p_1 - p_2|}{\sqrt{\left(\frac{p_1 * q_1}{n_1}\right) + \left(\frac{p_2 * q_2}{n_2}\right)}}$$

(3)

Если  $n_1 \neq n_2$

$$td = \frac{|p_1 - p_2|}{\sqrt{\left(\frac{(n_1 - 1) * (p_1 * q_1) + (n_2 - 1) * (p_2 * q_2)}{n_1 + n_2 - 2}\right) * \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}$$

(4)

td-фактическое значение критерия достоверности Стьюдента

p-%зараженных животных, от которых удалось выделить культуру

q-% зараженных животных, от которых не удалось выделить культуру

n- размер выборки

td сравнивали с tst- стандартным значением критерия достоверности Стьюдента (справочное).

### **2.2.5 Типизация выделенной культуры лептоспир реакцией микроагглютинации**

Для постановки РМА используют культуру в возрасте 5-15 суток, без посторонних примесей, без агглютинации или лизиса, концентрацией от 70 до 100 клеток на поле зрения микроскопа, при увеличении 40x1,5x7 или 40x7-10. Культуру в отношении 50:50 смешивают в лунках агглютинационной пластины с раститрованными сыворотками агглютинирующими лептоспирозными различной концентрации.

Пластины оставляют в термостате при 30-37 °С в течение 1 ч.

Для контроля культуры разливают по 0,1 см физиологического раствора в число лунок, соответствующее количеству штаммов-антигенов. В эти лунки вносят культуру лептоспир, по 1 лунке на каждый штамм.

По истечению времени термостатирования можно приступать к учету реакции по средством микроскопии капель из каждой лунки методом темнопольной микроскопии при увеличении 20x10 или 40x7x1,5. Сначала оценивают контрольные разведения, лептоспиры в этих лунках должны сохранять подвижность, не иметь признаков агглютинации или лизиса.

Капли из каждой лунки наносят на предметное стекло от большего к меньшему разведению. При учете этой реакции покровные стекла не используются. Для нанесения капель используют бактериологическую петлю, которую прокалывают перед взятием каждого нового антигена.

При возникновении реакции антиген-антитело, лептоспиры в лунках будут агглютинировать. Агглютинация проявляется в склеивании лептоспир на манер паучков. Каждый паучок включает от 3 до нескольких сотен лептоспир, один конец их притянут к центру конгломерата, а второй свободно размещается на внешней его части и сохраняет подвижность. В зависимости от процента агглютинировавших лептоспир от общего их числа производят учет реакции в крестах:

++++	-	агглютинированы 100% лептоспир;
+++	-	"75% "
++	-	"50% "
+	-	"25% "
-	-	агглютинация отсутствует.

В первых разведениях сыворотки лептоспиры могут лизировать, данная реакция проявляется в обездвиживании бактерий, распада их клеток или появления в них зернистости, набухания.

Если в контрольных разведениях не выявлено лизиса или агглютинации, а культура сохранила подвижность, начинают учитывать разведения с сывороткой крови. Положительной считается реакция, прошедшая на 2 креста и более, когда прореагировало не меньше 50% лептоспир.

По результатам РМА, все штаммы лептоспир, успешно выделенные от животных, не изменили своих серологических свойств. Реакция в зависимости от штамма наблюдалась в титрах от 2000 до 16000, без перекрёстных реакций. Что соответствовало исходным показателям культуры, отобранной для заражения.

## Заключение

L. Interrogans широко распространены. В РФ нет регионов благополучных по лептоспирозу крупного рогатого скота.

Иммунитет, формирующийся при лептоспирозе, обладает высокой специфичностью к конкретному серотипу лептоспир, и несмотря на напряженность и значительную продолжительность, не защищает животное от других серовариантам возбудителя.

Возбудителям лептоспироза свойственна тенденция к расширению рамок гостальной специфичности и ее относительный характер. Этим обусловлена необходимость постоянного контроля этиологической структуры лептоспироза, для выявления адаптации возбудителя к новым хозяевам, и коррекции планов лечебных и профилактических мероприятий.

Ухудшение эпизоотической обстановки наблюдается в годы с нормальным количеством осадков, которым предшествовал засушливый год. Подъем происходит каждые 5-6 лет, держится на протяжении 2 лет, после чего приходит спад из-за иммунизации. Следующий подъем планируется в 2023 году.

Экспериментально установлено влияние рН среды на активность роста лептоспир в жидкой сывороточно-буферной среде. При показателе кислотности 7,4 набор биомассы идет на 13 % менее активно, чем при значении рН 7,2.

Выявлено влияние концентрации сыворотки кролика в сывороточно-буферной среде, на активность роста лептоспир. Повышенное содержание сыворотки кролика в питательной среде сдерживает рост культуры. При 5% сыворотки качество культуры на 20 % превосходит выросшую на жидкой питательной среде с 10% сыворотки кролика.

Впервые проведено исследование влияния возраста культуры лептоспир на результат выделения возбудителя от зараженных лабораторных животных.

Доказано влияние возраста культуры микроорганизмов на % успешного выделения лептоспир от зараженных лабораторных животных. Полученные результаты позволяют на 40% повысить качество работы по применяемой методике.

Доказано, что фосфатно-буферную среду без сыворотки кролика можно эффективно использовать для выделения культуры непосредственно из крови животного.

Установлен оптимальный возраст культуры, пригодный для проведения через биологическую модель. Он составляет 15-18 суток.

Достоверность результатов подтвердили математически, с применением статистических методов, при уровне доверительной вероятности  $p=0.05$ .

Усовершенствована методика очистки штаммов лептоспир.

## ВЫВОДЫ

1. Повышенное содержание сыворотки кролика в питательной среде сдерживает рост культуры. При 5% сыворотки качество культуры на 20 % превосходит бактериальную культуру, выросшую на жидкой питательной среде с 10% сыворотки кролика.
2. Экспериментально установлено влияние рН среды на активность роста лептоспир в жидкой сывороточно-буферной среде. При показателе кислотности 7,4 набор биомассы идет на 13 % менее активно, чем при значении рН 7,2.
3. Обнаружена полиномиальная регрессионная зависимость между возрастом культуры лептоспир и ее выделяемостью от животного при проведении штаммов через животных с целью их очистки и идентификации. Установлен оптимальный возраст культуры Лептоспир, который составил 15-18 суток. Достоверность результатов подтвердили математически, при уровне доверительной вероятности  $p < 0.05$
4. Буферная среда без сыворотки крови подходит для выделения лептоспир непосредственно из крови животного, но непригодна для дальнейших пересевов. При первом пересеве посевов крови на среду без сыворотки, бактерии гибнут в течение недели в связи с нехваткой питательных веществ.
5. По результатам РМА, все штаммы лептоспир, успешно выделенные от животных, не изменили своих серологических свойств. Реакция в зависимости от штамма наблюдалась в титрах от 2000 до 16000, без перекрестных реакций. Что соответствовало исходным показателям культуры, отобранной для заражения.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агузарова М.Х. Источники и пути передачи лептоспирозной инфекции в Северо-Осетинской АССР // Лептоспирозы: Тр. 1У Всесоюзн. конф. по лептоспирозам. - М., 1967. - С. 144.
2. Алиев А.А. Эпизоотологический надзор при зоонозных инфекциях в условиях Северного и Северо-Западного регионов РФ : автореферат дис. ... доктора ветеринарных наук : 16.00.03 / Нижегород. гос. с.-х. акад. - Нижний Новгород, 2005. - 41 с.
3. Аминев Р.М. Современные особенности эпидемических проявлений природно-очаговых инфекций (геморрагической лихорадки с почечным синдромом, лептоспирозов, иксодовых клещевых боррелиозов, туляремии) и оптимизация эпидемиологического надзора за ними : на модели Ульяновской области : автореферат дис. ... доктора медицинских наук : 14.00.30 / Воен.-мед. акад. им. С.М. Кирова. - Санкт-Петербург, 2007. - 37 с.
4. Ананьина В.В. Лептоспирозы людей и животных / Под ред. В.В. Ананьина. - М.: Медицина, 1971. - 352 с.
5. Ананьина Ю.В. Опыт применения бикарбонатного теста для дифференциации патогенных и сапрофитных лептоспир // Матер, симпоз. по лептоспирозу. М., 1975. - С. 3-4.
6. Бахтина В.А. Сравнительная клинико-эпидемиологическая характеристика лептоспироза и геморрагической лихорадки с почечным синдромом на примере Краснодарского края : автореферат дис. ... кандидата медицинских наук : 14.01.09, 14.02.02 / Бахтина Виктория Александровна; [Место защиты: Центр. науч.-исслед. ин-т эпидемиологии МЗ РФ]. - Москва, 2019. - 24 с
7. Бренева Н.В., Афанасьев М.В., Шаракшанов М.Б., Остяк А.С., Киселева Е.Ю., Самсонова А.П., Петров Е.М., Викторова Е.В., Балахонов С.В. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ клеточных белков в

- идентификации представителей рода *Leptospira* // ЖМЭИ. - 2014. - № 4. - С. 36-43.
8. Буаро М.И. Комплексная оценка современной эпидемиологической ситуации в Гвинейской Республике : автореферат дис. ... доктора медицинских наук : 14.02.02 / Буаро Мамаду Иеро; [Место защиты: Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии]. - Москва, 2020. - 48 с.
  9. Ваганова А.Н., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К. Адаптация ПЦР для диагностики лептоспироза и эпидемиологического надзора за лептоспирозной инфекцией // Национальные приоритеты России. -2011. - № 2 (5). - С. 162-164.
  10. Ваганова А.Н., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К. ПДРФ различных генов лептоспир и выбор маркеров для генотипирования лептоспир путем рестрикционного анализа // Национальные приоритеты России. -2009. - № 2. - С. 183-185.
  11. Ваганова А.Н., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К. Разработка ПЦР-тест системы на основе гена *colA* для выявления лептоспир в клиническом материале // ЖМЭИ. - 2011. - № 5. - С. 67-71.
  12. Васина Н.И. Классификация и бактериологический мониторинг инфекционных болезней животных и птиц на территории Омской области : автореферат дис. ... кандидата ветеринарных наук : 06.02.02 / Васина Наталья Игоревна; [Место защиты: Алт. гос. аграр. ун-т]. - Барнаул, 2011. - 22 с.
  13. Викторова Е.В. Полимеразная цепная реакция при диагностике лептоспироза и изучение органотропности лептоспир у сельскохозяйственных животных : автореферат дис. ... кандидата ветеринарных наук : 16.00.03 / Всерос. гос. центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов. - Москва, 2006. – 29

14. Горячева В.Н. Функционирование инфекционной паразитарной системы : на примере природно-очаговой инфекции : автореферат дис. ... кандидата ветеринарных наук : 06.02.02 / Горячева Валентина Николаевна; [Место защиты: Нижегород. гос. с.-х. акад.]. - Нижний Новгород, 2010. - 22 с
15. ГОСТ 25386-91 животные СХ: методы лабораторной диагностики лептоспироза утвержден и введен в действие Постановлением Комитета стандартизации и метрологии СССР от 27.12.91 N 2240
16. Дранкин Д.И., Годлевская М.В. Лептоспироз. -Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1988. - 272 с.
17. Ежов Г.И. ИЗУЧЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА И БИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ЛЕПТОСПИР : автореферат дис. ... доктора биологических наук : 03.00.07 / Ежов Георгий Иванович; [Место защиты: Московский технологический институт мясной и молочной промышленности]. - Москва, 1976. - 30 с.
18. Есипов Е.Н. Сравнительная клинико-эпидемиологическая характеристика лептоспироза, вызванного лептоспирами серогрупп Icterohaemorrhagiae и Canicola : Генотип Leptospira Interrogans : автореферат дис. ... кандидата медицинских наук : 14.00.10, 14.00.30 / Рост. гос. мед. ун-т. - Ростов-на-Дону, 2004. - 22 с.
19. Жарникова И.В. Методологические подходы и разработка биотехнологии иммунобиологических препаратов для диагностики инфекционных особо опасных заболеваний и детекции их возбудителей : диссертация ... доктора биологических наук : 03.00.23. - Ставрополь, 2004. - 313 с.
20. Журавлёв А.Ю. Клинико-патогенетическая значимость дисбиоза кишечника при лептоспирозе : автореферат дис. ... кандидата медицинских наук : 14.01.09 / Журавлёв Алексей Юрьевич; [Место защиты: Рост. гос. мед. ун-т]. - Ростов-на-Дону, 2011. - 21 с.

21. Козыренко О.В. Экспертная оценка доказательных методов противоэпизоотической безопасности современного животноводства : автореферат дис. ... доктора ветеринарных наук : 06.02.02, 03.02.11 / Козыренко Ольга Вячеславовна; [Место защиты: Нижегород. гос. с.-х. акад.]. - Нижний Новгород, 2016. - 48 с
22. Лебедев В.В., Авдеев М.Г., Шубич М.Г., Ананьина Ю.В., Турьянов И.Х., Лучшев В.И. Иктерогеморрагический лептоспироз / Под ред. В.В. Лебедева. - Краснодар: Советская Кубань, 2001. - 208 с.
23. Малахов Ю.А., Панин А.Н., Соболева Г.Л. Лептоспироз животных. - М.: Медгиз, 2000. - 621 с.
24. Матвеева, И.Н. Промышленные технологии изготовления компонентов моно- и комплексных диагностикумов инфекционных заболеваний животных : автореферат дис. ... доктора биологических наук : 03.00.23 / Матвеева Ирина Николаевна; [Место защиты: Всерос. науч.-исслед. и технол. ин-т биол. пром-сти РАСХН]. - Щелково, 2008. - 52 с.
25. Мойсова Д.Л. Система гемостаза при лептоспирозе: патогенетические механизмы нарушений и оптимизация терапии : автореферат дис. ... доктора медицинских наук : 14.01.09 / Мойсова Диана Леонидовна; [Место защиты: Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека]. - Москва, 2020. - 48 с.
26. Онищенко Г.Г. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство; изд. 2-е, перераб. и доп. / Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутыре-ва. - М.: ЗАО «Шико», 2013. - 360 с.
27. Панова Н.В. Разработка нового стимулятора роста микроорганизмов и изучение его влияния на их биологические свойства на примере некоторых вакцинных штаммов бактерий : диссертация ... кандидата биологических наук : 03.00.23, 03.00.07. - Ставрополь, 2006. - 173 с.
28. Панова, Н.В. Разработка нового стимулятора роста микроорганизмов и изучение его влияния на их биологические свойства на примере

- некоторых вакцинных штаммов бактерий : автореферат дис. ... кандидата биологических наук : 03.00.23, 03.00.07 / Ставроп. гос. ун-т. - Ставрополь, 2006. - 20 с.
- 29.Петрова Л.А. Особенности эпизоотического процесса лептоспироза лошадей : автореферат дис. ... кандидата ветеринарных наук : 16.00.03 / Кубан. гос. аграр. ун-т. - Краснодар, 2006. - 18 с.
- 30.Пётрушкина Е. С. Энзоотичные инвазионные и инфекционные паразитарные системы в условиях Среднего и Нижнего Поволжья : автореферат дис. ... кандидата ветеринарных наук : 06.02.02, 03.02.11 / Пётрушкина Екатерина Сергеевна; [Место защиты: Нижегород. гос. с.-х. акад.]. - Нижний Новгород, 2013. - 22 с.
- 31.Плешакова, В. И. Инфекционная патология мочеполовой системы и молочной железы бактериальной этиологии у свиней [Текст] : монография / В. И. Плешакова и др. - Омск : Изд-во ФГОУ ВПО ОмГАУ, 2010. - 380 с.
- 32.Роберман М.Г. Синантропизация лептоспироза в условиях мегаполиса и его пригородов : автореферат дис. ... кандидата ветеринарных наук : 06.02.02 / Роберман Мария Гарриевна; [Место защиты: Нижегород. гос. с.-х. акад.]. - Нижний Новгород, 2016. - 22 с.
- 33.Самсонова А.П., Петров Е.М., Лебедев В.В., Ананьина Ю.В. Индикация лептоспир в сыворотках крови больных лептоспирозом *Icterohaemorrhagiae* методом nested-ПЦР // Клин. лаб. диагн. - 2008. -№ 9. - 46
- 34.Саруханова Л.Е., Волина Е.Г., Киктенко В.С., Ежов Г.й. Культивирование лептоспир на жидких бессывороточных питательных средах // Лаб. дело. 1980. - № 7. - С. 439-441.
- 35.Скребнев С.А. Особенности эпизоотического процесса лептоспироза животных в Орловской области : автореферат дис. ... кандидата ветеринарных наук : 16.00.03 / Кур. гос. с.-х. акад. им. И.И. Иванова. - Курск, 2004. - 23 с.

- 36.СП 1.3.2322-08 Безопасность работы с МО 3-4 группы патогенности (опасности) и возбудителями производственных болезней (Постановление от 28 января 2008 года N 4 Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2322-08)
- 37.СП 3.1.091-96 ВП 13.3.4.1310-96 3.1. Профилактика инфекционных болезней профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных 8. Лептоспироз
- 38.Таран А. В. Совершенствование методов лабораторной диагностики лептоспироза и детекции его возбудителя : автореферат дис. ... кандидата медицинских наук : 03.00.07 / Таран Александр Владимирович; [Место защиты: Ставроп. гос. ун-т]. - Ставрополь, 2008. - 24 с.
- 39.Темичев К.В. Совершенствование мер борьбы при бабезиозе собак : автореферат дис. ... кандидата ветеринарных наук : 03.02.11 / Темичев Константин Валерьевич; [Место защиты: Ставроп. гос. аграр. ун-т]. - Ставрополь, 2014. - 22 с.
- 40.Третьяков А.М. Особенности краевой эпизоотологии доминирующих бактериальных инфекций сельскохозяйственных животных в Республике Бурятия : автореферат дис. ... доктора ветеринарных наук : 06.02.02 / Третьяков Алексей Михайлович; [Место защиты: Алт. гос. аграр. ун-т]. - Барнаул, 2011. - 42 с.
- 41.ФЗ №128 О лицензировании. Требования биологической безопасности (Принят Государственной Думой 13 июля 2001 года Одобрен Советом Федерации 20 июля 2001 года)
- 42.ФЗ №53 о санитарном благополучии населения (Принят Государственной Думой 12 марта 1999 года Одобрен Советом Федерации 17 марта 1999 года)
- 43.Чернобай Е.В. Эпизоотология лептоспироза свиней в Ростовской области : автореферат дис. ... кандидата ветеринарных наук : 16.00.03 / Ставроп. гос. аграр. ун-т. - Ставрополь, 2006. - 26 с.

44. Шатрубова Е.В. Особенности эпизоотического процесса лептоспироза в горных районах юга Западной Сибири : автореферат дис. ... кандидата ветеринарных наук : 06.02.02 / Шатрубова Екатерина Владимировна; [Место защиты: Алт. гос. аграр. ун-т]. - Горно-Алтайск, 2016. - 23 с.
45. Шилова Е.Н. Создание и результативность научно-обоснованной системы повышения эффективности вакцинопрофилактики инфекционных заболеваний у животных с выраженным иммунодефицитным состоянием : автореферат дис. ... доктора ветеринарных наук : 06.02.02 / Шилова Евгения Николаевна; [Место защиты: Ур. науч.-исслед. ветеринарный ин-т РАСХН]. - Екатеринбург, 2011. - 42 с.
46. Ahmed A., Grobusch M.P., Klatser P.R., Hartskeerl R.A. Molecular approaches in the detection and characterization of *Leptospira*. *J. Bacteriol. Parasitol.* 2012.
47. Ahmed A., Thaipadungpanit J., Boonsilp S. et al. Comparison of two multilocus sequence based genotyping schemes for *Leptospira* species. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011.
48. Benacer, D., Thong, K. L., Min, N. C., Bin Verasahib, K., Galloway, R. L., Hartskeerl, R. A., . . . Mohd Zain, S. N. (2016). Epidemiology of human leptospirosis in Malaysia, 2004-2012. *Acta Trop*, 157, 162-168.
49. Boonsilp S., Thaipadungpanit J., Amomchai P. et al. A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013.
50. Cerqueira G.M., Picardeau M. A century of *Leptospira* strain typing. *Infect. Genet. Evol.* 2009, 9: 760-768.
51. Chusri, S., McNeil, E. B., Hortiwakul, T., Charernmak, B., Srirairatchai, S., Santimaleeworagun, W., Jarman, R. G. (2014). Single dosage of doxycycline for prophylaxis against leptospiral infection and leptospirosis during urban flooding in southern Thailand: a non-randomized controlled trial. *J Infect Chemother*, 20(11), 709-715.

52. Costa F., Hagan J. E., Calcagno J. et al. Global morbidity and mortality of leptospirosis: A systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015
53. Desai, K. T., Patel, F., Patel, P. B., Nayak, S., Patel, N. B., & Bansal, R. K. (2016). A case-control study of epidemiological factors associated with leptospirosis in South Gujarat region. *J Postgrad Med*, 62(4), 223-227
54. Djelouadji Z., Roux V, Raoult D. et al. Rapid MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Leptospira* organisms. *Vet. Microbiol.* 2012, 6: 142-146.
55. Erohin E.P. New methods identification *Leptospira*. // *Microbiol. immunol.* - 1990. - v.20. - p.160.
56. Gilks, C. F., Lambert, H. P., Broughton, E. S., & Baker, C. C. (1988). Failure of penicillin prophylaxis in laboratory acquired leptospirosis. *Postgrad Med J*, 64(749), 236-238.
57. Lau C.L., Smythe L.D., Craig S.B., Weinstein P. Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2010b, 104:631-638.
58. Leon A., Pronost S., Fortier G. et al. Multilocus sequence analysis for typing *Leptospira interrogans* and *Leptospira kirschneri*. *J. Clin. Microbiol.* 2010, 48 (2): 581-585.
59. Levett P.N. Leptospirosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001, 14: 296-326.
60. Matsuo K., Isogai E., Araki Y. Control of immunologically crossreactive leptospiral infection by administration of lipopolysaccharides from a nonpathogenic strain of *Leptospira biflexa*. *Microbiol. Immunol.* 2000, 44: 887-890.
61. Rettinger A., Krupka I., Grunwald K. et al. *Leptospira* spp. strain identification by MALDI TOF MS is an equivalent tool to 16S rRNA gene sequencing and multi locus sequence typing (MLST). *BMC Microbiology* 2012, 12: p.185.
62. Stoyanova N., Tokarevich N., Gracheva L. et al. Leptospirosis in North-West Russia. *EpiNorth.* \* 2004, 2: 29-32.

63. Voronina O.L., Kunda M.S., Aksenova E.I. et al. The characteristics of ubiquitous and unique *Leptospira* strains from the collection of Russian centre for leptospirosis. *BioMed Res. Int.* 2014
64. Xiao D., Zhang C., Zhang H. et al. A novel approach for differentiating pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* based on molecular fingerprinting. *J. Proteomics.* 2015, 119: 1-9.