**Методические указания по лабораторной диагностике лептоспироза животных**

**1. Общие положения**

1.1. Лептоспироз представляет собой зооантропонозную природноочаговую инфекцию домашних, промысловых, многих видов диких животных и человека. Лептоспирозом болеют крупный рогатый скот, свиньи, лошади, овцы, козы, олени, собаки, лисицы, песцы и животные других видов.

1.2. Возбудителем болезни являются лептоспиры. Они относятся к семейству спирохет (Spirochetaceae), роду лептоопир (Leptospira), виду патогенных лептоспир (interrogans). Последний включает 124 серологических варианта (серотипа – серовара). Серологические варианты по степени антигенного родства объединены в 18 серологических групп (приложение 1).

Возбудителем лептоспироза сельскохозяйственных животных на территории Советского Союза являются лептоспиры следующих серогрупп (см. табл.).

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Возбудители | Свиньи | Крупный рогатый скот | Мелкий рогатый скот |
| Основные | Pomona Tarassovi | Hebdomadis Pomona Grippotyphosa Tarassovi | Grippotyphosa Pomona j Tarassovi |
| Редко встречающиеся | Hebdomadis Icterohaemorrhagiae Canicola Grippotyphosa | Canicola Icterohaemorrhagiae | Hebdomadis Icterohaemorrhagiae Canicola |

Лептоспироз у сельскохозяйственных животных других видов вызывают лептоспиры этих же серогрупп.

Заражение крупного и мелкого рогатого скота лептоспирами серогрупп Grippotyphosa и Hebdomadis часто массовое, происходит преимущественно при выпасании на территории природного очага от полевок и других видов мышевидных грызунов – основных хозяев лептоспир данных серогрупп. Заразившиеся сельскохозяйственные животные являются источником возбудителя инфекции.

Источником и основными хозяевами лептоспир серогрупп Tarassovi и Pomona (сероварианты manjakov и pomona) являются сельскохозяйственные животные и в первую очередь свиньи и крупный рогатый скот. Природные очаги лептоспир Tarassovi на территории Советского Союза не обнаружены. В природных очагах лептоспир Pomona паразитируют у полевых мышей лептоспиры сероварианта mozdok, который вызывает у сельскохозяйственных животных только спорадические случаи инфекции. Лептоспирами Tarassovi и Pomona в большинстве случаев свиньи заражаются от свиней, крупный рогатый скот от крупного рогатого скота. Может наблюдаться межвидовое заражение.

Лептоспирами Icterohaemorrhagiae и Canicola сельскохозяйственные животные инфицируются от основных хозяев этих лептоспир: серых крыс и собак соответственно. Лептоспироз, вызванный этими возбудителями, протекает спорадически и не поражает больших групп животных.

1.3. Животные – лептоспироносители выделяют лептоспир во внешнюю среду с мочой и инфицируют воду, корма, пастбища, почву, подстилку и другие объекты внешней среды, через которые заражаются здоровые животные.

Наиболее благоприятная среда для сохранения лептоспир вне организма – вода открытых водоемов: невысыхающие лужи, пруды, болота, медленно текущие речки, влажная почва с реакцией, близкой к нейтральной.

Водный путь передачи возбудителя инфекции основной.

Заражение возможно при поедании трупов грызунов – лептоспироносителей или кормов, инфицированных мочой этих грызунов. Промысловые животные при клеточном их содержании заражаются в основном при поедании продуктов убоя больных лептоспирозом животных.

Лептоспиры проникают в организм животных и человека через поврежденные участки кожи (царапины, порезы, раны), слизистые оболочки ротовой полости, носа, глаз, половых путей.

1.4. Лептоспироз у сельскохозяйственных животных протекает остро, подостро, хронически и бессимптомно. Это наблюдается в любое время года, но у животных с пастбищным содержанием преимущественно в пастбищный период. Восприимчивы к лептоспирозу животные всех возрастов. Болезнь характеризуется кратковременной лихорадкой, иногда желтушным окрашиванием и некрозами слизистых и отдельных участков кожи, нарушением функции желудочно-кишечного тракта.

У свиней и подсвинков, взрослого крупного рогатого скота, лошадей, овец и коз лептоспироз протекает преимущественно бессимптомно. У не иммунных свиноматок и реже у коров лептоспироз сопровождается абортами в последний месяц беременности или рождением нежизнеспособного потомства. Аборты у свиноматок в ранее благополучных хозяйствах могут быть массовыми.

При вспышке лептоспироза острое течение инфекции с характерными клиническими признаками имеется у небольшого количества животных, а основная масса их переболевает бессимптомно.

Независимо от течения инфекции и вида животного на 5–7-й день после заражения в крови животного выявляются специфические антитела, а через 10–20 дней у ряда животных развивается лептоспироносительство, которое продолжается в течение нескольких месяцев и до 1–2 лет.

Поголовье лептоспироносителей на неблагополучной по лептоспирозу ферме среди крупного и мелкого рогатого скота составляет 1–5%, на отдельных фермах до 10–20%, среди свиней лептоспироносителями могут быть 30–80% животных и более.

Течение болезни не зависит от серогрупповой принадлежности возбудителя. Однако лептоспироз у крупного рогатого скота, вызванный возбудителями группы Hebdomadis, протекает чаще бессимптомно и только в отдельных случаях сопровождается лептоспироносительством.

1.5. Патологоанатомические изменения у павших от лептоспироза животных характеризуются геморрагическим диатезом и желтушным окрашиванием подкожной клетчатки, увеличением в объеме печени, дряблой ее консистенцией, на разрезе глинистого цвета, увеличением лимфатических узлов, сочных на разрезе и с кровоизлияниями. Мочевой пузырь переполнен мочой часто вишнево-красного цвета. Желтушное окрашивание тканей и кровавая моча не характерны для лептоспироза свиней.

При бессимптомном лептоспироносительстве видимые поражения локализуются преимущественно в почках и проявляются изменениями, характерными для острого или хронического паренхиматозного или интерстициального нефрита и дистрофии (мраморная окраска и изменение цвета поверхности, красные инфаркты, точечные серо-белые некротические очажки, кровоизлияния, сглаженность границы между мозговым и корковым слоями).

**2. Диагностика лептоспироза**

2.1. Основанием для подозрения на неблагополучие хозяйства по лептоспирозу служат клинические признаки, патологоанатомические изменения, обнаружение специфических антител в крови отдельных животных и эпидемические показания (заболевание лептоспирозом людей).

2.2. В целях своевременного выявления лептоспироза проводят исследование сыворотки крови животных по РМА или РА:

а) в племенных хозяйствах (фермах) всех производителей и не менее 10% по РМА или 15% по РА коров, нетелей, свиноматок и кобыл один раз в год; мелкий рогатый скот и животных других видов исследуют только при подозрении на заболевание лептоспирозом;

б) на племпредприятиях (станциях, пунктах) искусственного осеменения кровь всех производителей два раза в год;

в) в группах свиней, крупного и мелкого рогатого скота и лошадей – перед вводом (ввозом) и выводом для племенных или пользовательных целей. При этом в группах до 25 голов исследуют всех животных, в группах до 100 голов – не менее 25 животных, а в больших группах – не менее 25% животных по РМА или 35% – по РА;

г) во всех случаях при подозрении на лептоспироз.

2.3. У больных, подозрительных по заболеванию и подозреваемых в заражении животных каждого скотного двора, свинарника, гурта, отары и т.д. исследуют кровь и мочу, а у павших–паренхиматозные органы. Кровь берут не менее чем от 50 животных. Повторное взятие крови производят через 7–10 дней у тех же животных.

Мочу микроскопируют непосредственно в хозяйстве не менее чем от 100 животных. Исследование прекращают после обнаружения лептоспир в одной из проб.

На фермах с меньшим поголовьем исследованию подвергают всех животных.

Взятие материала для исследования и лабораторную диагностику лептоспироза проводят в соответствии с «Методическими указаниями по лабораторной диагностике лептоспироза животных», рекомендованными ГУВ МСХ СССР 15 октября 1975 г.

2.4. По результатам лабораторных исследований диагноз на лептоспироз считают установленным, а хозяйство (ферму, отделение, предприятие, станцию, пункт искусственного осеменения, свинарник, гурт и т.д.) неблагополучными по лептоспирозу в любом из следующих случаев:

а) лептоспиры обнаружены при микроскопическом исследовании в крови или суспензии из органов животных, абортированном плоде, моче «ли органах лабораторного животного, павшего после заражения исследуемым материалом;

б) культура лептоспир выделена из патологического материала или из органов лабораторного животного, зараженного исследуемым материалом;

в) лептоспиры обнаружены в гистологических срезах почек или печени, импрегнированных серебром по Левадити;

г) установлено нарастание титра антител в пять и более раз при повторном исследовании через 7–10 дней сыворотки крови по РМА или при обнаружении антител у ранее нереагировавших животных;

д) специфические антитела обнаружены в сыворотке крови при однократном исследовании по РМА в титре 1: 100 и выше более чем у 25% обследованных животных или по РА (1–4 креста) более чем у 20% животных, а для крупного рогатого скота, реагирующего с лептоспирами группы Hebdomadis, и лошадей по РМА 1: 500 и выше или по РА на 3–4 креста в том же проценте случаев.

2.5. Лептоспироз считают причиной гибели животных при наличии клинических признаков и патологоанатомических изменений, характерных для лептоспироза, подтвержденных обнаружением лептоспир в крови или паренхиматозных органах, или нарастанием титра антител не менее чем в пять раз.

При постановке диагноза на лептоспироз необходимо проводить дифференциальную диагностику и учитывать, что животные – лептоспироносители (особенно свиньи) и животные, имеющие в крови специфические антитела, могут погибать от различных инфекционных и неинфекционных болезней.

2.6. Лептоспироз считают причиной абортов в следующих случаях:

а) при обнаружении лептоспир в органах (тканях) абортированного (мертворожденного) плода;

б) при нарастании титра антител у абортировавшей матки не менее чем в пять раз;

в) при высоком титре антител (1:2500 и более) в группе абортировавших животных и низком титре (до 1: 500) или отрицательной реакции в группе здоровых животных.

**3. Охрана благополучных хозяйств от заноса лептоспироза**

3.1. Благополучным по лептоспирозу считают хозяйство, отделение, ферму, где нет животных, больных лептоспирозом, нет животных – лептоспироносителей и нет животных, в сыворотке крови которых обнаруживают по РМА или РА специфические антитела.

3.2. В целях недопущения заноса в благополучные хозяйства лептоспироза необходимо:

а) карантинировать в течение 30 дней всех поступающих в хозяйство животных;

б) комплектовать хозяйства (фермы) только клинически здоровыми животными, при серологическом исследовании сыворотки крови которых получены отрицательные результаты; для комплектования откормочных хозяйств (отделений, ферм) разрешается вводить клинически здоровых животных без исследования на лептоспироз, но с обязательной вакцинацией их против лептоспироза в период карантинирования;

в) не допускать ввода (ввоза) в племенные хозяйства (отделения, фермы) животных или продуктов убоя из неблагополучных хозяйств, независимо от результатов серологического исследования;

г) исключить контакт животных хозяйства с животными, находящимися в личном пользовании, бродячими собаками и т.д.;

д) запретить совместный выпас и использование общего водопоя животных благополучных и неблагополучных групп;

е) использовать для поения животных воду артезианских скважин или водопроводной сети (качество воды должно постоянно контролироваться);

ж) запретить эксплуатацию производителей, сыворотка крови или сперма которых дает положительную РМА или РА;

з) устраивать летние лагеря на возвышенных сухих участках с хорошим стоком дождевых вод, без доступа животных к воде открытых водоемов (пруд, озеро, река, ручей);

и) содержать в надлежащем ветеринарно-санитарном состоянии пастбища, водопоя, животноводческие помещения, выгульные площадки, загоны и т.д., осушать сырые и заболоченные участки;

к) систематически уничтожать грызунов в животноводческих помещениях, на территории фермы, в местах складирования грубых кормов и т.д., а также исследовать отловленных зверьков на лептоспироз;

л) вести строгий учет случаев абортов, мертворождения, клинических признаков болезни и падежа животных, направлять патологический материал для исследования в лабораторию. Этот материал должен быть взят и исследован в течение 6 часов в летнее время и 10–12 часов в зимнее время или при условии хранения его в охлажденном состоянии;

м) не допускать участия в выставках собак, невакцинированных против лептоспироза;

н) не скармливать пушным зверям и собакам сырые продукты убоя больных лептоспирозом животных и животных – лептоспироносителей;

о) выявлять природные очаги лептоспироза и не выпасать на их территории невакцинированных животных.

**4. Специфическая профилактика, лечение и дезинфекция при лептоспирозе**

4.1. Для специфической профилактики лептоспироза применяют поливалентную феноловую вакцину, изготавливаемую в двух вариантах. Первый вариант вакцины включает лептоспиры: Помона, Тарассови, Гриппотифоза, Иктерогеморрагия и Каникола; второй вариант – лептоспиры Помона, Тарассови, Гриппотифоза и Гебдомонадис. Применяют вакцину с учетом этиологической структуры лептоспироза.

4.2. Вакцинируют против лептоспироза всех восприимчивых животных в следующих случаях:

а) в неблагополучных по лептоспирозу хозяйствах;

б) в откормочных хозяйствах, где поголовье комплектуют без обследования «а лептоспироз;

в) в угрожаемых хозяйствах;

г) при выпасании животных в зоне природного очага лептоспироза;

д) при выявлении в хозяйстве животных, сыворотка крови которых реагирует на лептоспироз по РМА или РА;

е) в районах с отгонным животноводством. Вакцинация профилактирует переболевание, аборты, исключает перезаражение животных и формирование интенсивного очага лептоспироза.

4.3. Вакцинацию проводят в соответствии с Наставлением по применению поливалентной феноловой вакцины против лептоспироза сельскохозяйственных и промысловых животных, утвержденным ГУВ МСХ СССР 22 июля 1974 г. Вакцину вводят двукратно.

Продолжительность иммунитета у поросят и ягнят, вакцинированных в месячном возрасте, не превышает трех месяцев, а у телят, вакцинированных в 14/2–2-месячном возрасте, 4–6-месячных подсвинков, взрослых свиней и овец –• шести месяцев, у крупного рогатого скота, вакцинированного в возрасте от года и старше, – 12 месяцев. После истечения указанных сроков животных ревакцинируют.

Продолжительность колострального иммунитета составляет у поросят и ягнят, полученных от матерей, вакцинированных за 35–75 дней до опороса (окота), – 1 –11/2 месяца, а у телят, полученных от коров, вакцинированных за 1!/2–6 месяцев до отела, – 14/2–2\*/2 месяца.

Телят, полученных от иммунных к лептоспирозу матерей, прививают в возрасте l'/г-2 месяца, а ягнят и поросят– в возрасте 1 –1\*/2 месяца.

Для профилактики абортов лептоспирозной этиологии свиноматок необходимо вакцинировать за 1–2 месяца

до покрытия или в первый месяц после покрытия, а крупный рогатый скот – в первые 1–3 месяца стельности.

При вспышке лептоспироза молодняк, полученный от невакцинированных или вакцинированных в последний месяц беременности маток, обрабатывают в 1–3-дневном возрасте гипврим1мунной сывороткой против лептоспироза в лечебной дозе и вакцинируют в месячном возрасте.

4.4. Для лечения больных животных используют гипериммунную сыворотку и стрептомицин.

Сыворотка содержит специфические антитела к лептоспирам шести серогрупп: Помона, Тарассови, Гебдомонадис, Гриппотифоза, Иктерогеморрагия и Каникола.

Животные, подвергнутые лечению сывороткой при остром течении лептоспироза, выздоравливают, но остаются лептоспироносителями. Сыворотка не профилактирует аборты.

Сыворотка является хорошим дифференциально-диагностическим средством. Отсутствие лечебного эффекта после ее введения свидетельствует о нелептоспирозной этиологии болезни.

Применяют сыворотку в дозах, указанных в Наставлении по ее применению или на этикетке флакона с сывороткой.

Стрептомицин используют для лечения животных при клинически выраженном течении лептоспироза и для лечения животных – лептоспироносителей. Его вводят через каждые 12 часов в течение 4–5 дней по 10–12 тысяч единиц на килограмм массы (веса) животного.

Стрептомицинотерапию групп животных, в которых выявлены лептоспироносители, начинают через 7–10 дней после введения второй дозы вакцины.

4.5. Текущую дезинфекцию проводят в неблагополучном по лептоспирозу хозяйстве после каждого случая выделения больного животного и в последующем через каждые 10 дней до снятия ограничений.

Перед снятием ограничений проводят механическую очистку и заключительную дезинфекцию.

При обработке стрептомицином групп животных, среди которых выявлены лептоспироносители, дезинфекцию проводят после второй инъекции антибиотика.

Обеззараживанию подвергаются станки (стойла)', выгульные площадки и другие места содержания животных, которые могли быть инфицированы мочой лептоспироносителей.

4.6. Лептоспиры быстро погибают при воздействии различных дезинфицирующих веществ. Для дезинфекции при лептоспирозе применяют осветленный раствор хлорной извести с 2%-яым содержанием активного хлора, 2%-ный горячий раствор едкого натра, 3%-ный горячий раствор сернокарболовой смеси, 5%-ную эмульсию дезинфекционного (фенольного) креолина, 5%-ную эмульсию нафталина, 2%-ный раствор формальдегида и другие вещества, используемые для дезинфекции животноводческих помещений и объектов внешней среды, инфицированных патогенными неспоровыми микробами.

**5. Мероприятия по оздоровлению неблагополучных хозяйств**

Общие мероприятия

5.1. При выявлении в хозяйстве (на ферме, в отделении, стаде, свинарнике и т.д.) больных лептоспирозом животных или животных – лептоспироносителей ветеринарный специалист, обслуживающий хозяйство, немедленно сообщает об этом руководителю хозяйства, главному ветеринарному врачу района и районной санитарно-эпидемиологической станции; одновременно выясняет источник заноса возбудителя инфекции в хозяйство и организует 'мероприятия по ликвидации инфекции.

5.2. Хозяйство (ферма, отделение, гурт, индивидуальный двор и т.д.), в котором диагностирован лептоспироз, в установленном порядке объявляют неблагополучным.

Главный ветеринарный врач района берет такие хозяйства на учет, разрабатывает совместно с их руководителями и специалистами план оздоровительных мероприятий и осуществляет контроль за их выполнением.

5.3. План оздоровительных мероприятий по лептоспи-розу согласовывают с санитарно-эпидемиологической станцией, районной или областной ветеринарной лабораторией и вносят на утверждение в исполком районного (городского) Совета депутатов трудящихся. В плане предусматривают необходимые диагностические исследования животных, соответствующие ветеринарно-санитарные и организационно-хозяйственные мероприятия, предусмотренные настоящей инструкцией, с указанием сроков их проведения и ответственных лиц.

5.4. В хозяйстве, неблагополучном по лептоспирозу, вводят ограничения, на основании которых запрещается:

а) выводить (вывозить) животных для племенных и пользовательных целей;

б) продавать молодняк рабочим и служащим в личное пользование;

в) вводить (ввозить) невакцинированных против лептоспироза животных;

г) перегруппировывать животных без ведома ветеринарного специалиста;

д) продавать продукты убоя вынужденно убитых животных. Их используют согласно «Правилам ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов»;

е) использовать воду открытых водоемов для поения животных;

ж) водить здоровых животных в помещения, в которых ранее содержались больные животные, до проведения очистки, санитарного ремонта, дезинфекции и дератизации;

з) содержать здоровых невакцинированных животных на пастбищных участках, на которых выпасались больные лептоспирозом животные (сухие участки пастбища в солнечную погоду разрешается использовать через 7 дней; на влажных и заболоченных участках, инфицированных лептоспирами, выпасают только вакцинированных животных);

и) допускать на неблагополучную ферму восприимчивых к лептоспирозу животных других видов.

5.5. Животноводческие помещения и территорию вокруг них содержат в надлежащем санитарном состоянии и улучшают условия содержания и ухода за животными; обезвреживание сточных вод, текущую и заключительную дезинфекцию помещений, загонов, выгульных площадок, оборудования, инвентаря и других объектов, а также дератизацию проводят в соответствии с «Инструкцией по проведению ветеринарной дезинфекции, дезинвазии, дезинсекции и дератизации».

5.6. В неблагополучных по лептоспирозу хозяйствах животных осеменяют искусственно спермой от здоровых производителей.

5.7. Молоко, полученное от больных лептоспирозом животных, нагревают до кипения и используют в корм скоту. Молоко клинически здоровых коров (кобыл), сыворотка крови которых дает положительную РМА или РА без нарастания титра, используют без ограничений.

5.8. Грубые корма, в которых обнаружены зараженные лептоспирозом грызуны, скармливают только вакцинированным против лептоспироза животным.

5.9. Животных, больных или подозрительных по заболеванию лептоспирозом, убивают на санитарной бойне, а при ее отсутствии – в убойном цехе мясокомбината в конце смены, после удаления продуктов убоя здоровых животных, с соблюдением мер личной профилактики. Помещение и оборудование после убоя таких животных дезинфицируют. Продукты убоя используют в соответствии с «Правилами ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов».

Специальные мероприятия

5.10. В неблагополучном по лептоспирозу хозяйстве (ферме, отделении, стаде, свинарнике и т.д.) проводят клинический осмотр всех животных и измерение температуры у подозрительных по заболеванию животных.

Больных и подозрительных по заболеванию животных изолируют, уточняют диагноз и лечат (смотри пункт 4.4.), клинически здоровых. вакцинируют, как указано в пункте 4.3.

5.11. В откормочных комплексах и репродукторных хозяйствах, поголовье которых не имеет племенной ценности, больных и подозрительных по заболеванию животных после лечения и выздоровления также вакцинируют и переводят в общее стадо. Всех животных откармливают и сдают на убой. В ветеринарном свидетельстве указывают, что поголовье здорово, но вышло из неблагополучного по лептоспирозу хозяйства.

Ограничения снимают после сдачи на убой всех животных неблагополучного хозяйства (фермы, отделения, свинарника, скотного двора и т.д.), проведения тщательной очистки, санитарного ремонта и заключительной дезинфекции.

5.12. В племенных и пользовательных хозяйствах больных и подозрительных по заболеванию животных изолируют, лечат и сдают на убой.

У остальных животных берут кровь для исследования по РМА или РА и, не ожидая результатов исследования, вакцинируют их, как указано в пункте 4.3.

а. Животных, сыворотка крови которых содержит специфические лептоспирозные антитела, кроме группы Hebdomadis, изолируют откармливают и сдают на убой. Полученный от этих животных молодняк использовать на племенные цели запрещается.

б. В хозяйствах (отделениях, фермах, гуртах), где сыворотка крови крупного рогатого скота реагирует с лептоспирами только группы Hebdomadis, но нет клинически больных лептоспирозом животных и не выявлены лептоспираноситеЛ'И, все поголовье прививают против лептоспироза вакциной второго варианта.

Вывод животных из таких хозяйств для целей откорма не ограничивают.

Для племенных и пользовательных целей выводят животных, сыворотка крови которых не имеет специфических антител или всех клинически здоровых животных независимо от наличия антител после предварительной обработки стрептомицином, как указано в пункте 4.4.

в. Молодняк, родившийся в хозяйстве до проведения противолептоспирозных мероприятий или в течение месяца после их проведения, считают подозреваемым в заражении лептоспирозом. Его вакцинируют, как указано в пункте 4,3., и не используют для племенных целей.

Молодняк, родившийся в более поздние сроки от иммунных к лептоспирозу матерей, вакцинируют, содержат после отъема изолированно от других возрастных групп животных и после снятия ограничений реализуют для племенных целей.

г. Вывод животных для откорма разрешается в пределах данной области (края, республики) через месяц после последнего случая выздоровления больного животного и проведения заключительных ветеринарно-санитарных мероприятий.

Вывод животных для племенных и пользовательных целей разрешается после снятия ограничений.

д. Ограничения снимают в племенных и пользовательных хозяйствах после установления их благополучия по лептоспирозу лабораторными методами исследования. Для этой цели через два месяца после завершения противолептоспирозных мероприятий берут кровь у ремонтного молодняка, как указано в пункте 2.2.в., и исследуют по РМА или РА. У хряков, ремонтных и основных свиноматок и крупного рогатого скота различных возрастных групп, кроме того, берут по 100 проб мочи от каждой тысячи животных, но не менее чем от 100 животных на ферме.

Хозяйство считают благополучным при получении отрицательных результатов исследований у всех обследованных животных.

В случае выявления животных – лептоспироносителей хозяйство (ферму, отделение, стадо, свинарник и т.д.) продолжают считать неблагополучным по лептоспирозу. При выявлении положительных реакций только у отдельных животных проводят дополнительные исследования, как указано в пункте 2.3.

е. Повторные исследования животных на лептоспироз в ранее неблагополучных племенных хозяйствах проводят через 6 месяцев после снятия ограничений, выполняют при этом объем исследований, указанный в пункте 5.12.д.

5.13. На неблагополучных по лептоспирозу предприятиях (станциях, пунктах) искусственного осеменения производителей, у которых при очередном плановом обследовании выявлены специфические антитела, изолируют и прекращают получение от них спермы. Малоценных производителей из числа положительно реагирующих выбраковывают. Проводят 3-кратную микроскопию мочи всех производителей с интервалом в 1–2 дня и повторно исследуют кровь через 7–10 дней после первого исследования.

а. На предприятиях (станциях, пунктах), где все животные клинически здоровы, не выявлены лептоспироносители и не установлено 'нарастание титра антител, все поголовье вакцинируют, как указано в пункте 4.3. У производителей, не имеющих специфических лептоспирозных антител, продолжают получение спермы. Всех производителей обрабатывают стрептомицином, как указано в пункте 4.4., и контролируют на лептоспироносительство путем 3-кратной микроскопии мочи. При отрицательных результатах исследования предприятие продолжают считать благополучным по лептоспирозу.

6. На предприятиях (станциях, пунктах), неблагополучных по лептоспирозу (смотри пункт 2.4), прекращают получение спермы, уничтожают запасы (остатки) спермы, полученной от клинически больных производителей и лептоспироносителей. Больных и подозрительных по заболеванию производителей (были или есть признаки болезни, лептоспиры в моче, положительная РМА или РА) изолируют. Клинически здоровых животных, у которых не выявлены специфические антитела, вакцинируют и обрабатывают стрептомицином в соответствии с пунктами 4.3 и 4.4. Через пять дней после окончания обработки животных стрептомицином от них разрешается получать сперму.

Производителей, у которых установлено лептоспироносительство, и низкопродуктивных животных из числа положительно реагирующих по РМА или РА, выбраковывают.

Высокопродуктивных производителей, сыворотка которых реагирует положительно по РМА или РА, содержат изолированно в течение 3 месяцев. За этот срок у них после вакцинации и обработки стрептомицином исследуют через каждые 5–10 дней мочу путем микроскопии на наличие лептоспир и, кроме того, через два месяца после обработки мочу и сперму биопробой а взрослых кроликах. При отрицательных результатах исследований от таких производителей разрешают получать сперму.

Предприятие (станцию, пункт) объявляют благополучным по лептоспирозу через 3 месяца после последнего случая выздоровления 'больного животного или лептоспироносителя при получении в последующие сроки отрицательных результатов исследования на лептоспироз у каждого производителя.

в. Повторное серологическое исследование крови и микроскопию мочи всех производителей на ранее неблагополучных по лептоспирозу предприятиях проводят через 3 месяца и при получении отрицательных результатов – в сроки, указанные в пункте 2.2.6.

г. На предприятиях (станциях, пунктах) искусственного осеменения, расположенных в неблагополучной или угрожаемой по лептоспирозу зоне, всех производителей вакцинируют против лептоспироза.

**6. Порядок ветеринарной обработки племенных и пользовательных животных, выводимых из хозяйств**

6.1. Вывод животных (свиньи, крупный и мелкий рогатый скот, лошади), отобранных к продаже или переводу в другие хозяйства для племенных или пользовательских целей, разрешается только из благополучных по лептоспирозу хозяйств (ферм, отделений и т.д.).

6.2. Для племенных и пользовательных целей продают животных, сыворотка крови которых не дает положительной реакции. Обследование животных проводят перед выводом путем однократного исследования у них сыворотки крови по РМА или РА в 'количестве, указанном в пункте 2.2.в.

6.3. Вывод животных разрешается без ограничений при отрицательных результатах исследований по всей группе.

При выявлении хотя бы одного животного, сыворотка крови которого положительно реагирует по РМА или РА, всю группу задерживают в карантине и решают вопрос о благополучии хозяйства по лептоспирозу, для чего проводят исследования, как указано в пункте 2.3. Если хозяйство благополучно по лептоспирозу, то всю группу, в которой выявлены положительно реагирующие животные, обрабатывают стрептомицином (пункт 4.4). Животных, не имеющих специфических антител к лепто-спирам, выводят без дополнительных исследований, а положительно реагирующих оставляют в хозяйстве для дополнительных исследований или откорма с последующим убоем.

Крупный рогатый скот, реагирующий с лептоспирами группы Hebdomadis, обрабатывают стрептомицином и выводят без ограничений. В случае признания хозяйства неблагополучным по лептоспирозу руководствуются при выводе животных пунктами 5.12.6., 5.12.в., 5.12.г.

**7. Охрана людей от заражения лептоспирозом**

7.1. Руководители хозяйства обязаны:

а) обеспечить всех работников животноводства спецодеждой и спецобувью, включая резиновые сапоги, халаты, прорезиненный фартук, нарукавники, перчатки, косынку или чепчик;

б) обеспечить инструктаж обслуживающего персонала о мерах личной гигиены и промсанитарии при лептоспирозе;

в) иметь в каждом животноводческом помещении (скотном дворе, свинарнике, кошаре и т.д.) умывальник, мыло, полотенце, аптечку первой помощи, емкости с дезратвором (пункт 4.6), а также помещения, оборудованные для хранения спецодежды и спецобуви;

г) иметь в хозяйстве санитарный журнал для записи указаний «предложений специалистов ветеринарно-санитарного надзора и органов здравоохранения, обеспечить выполнение сделанных указаний и предложений;

д) при появлении заболевания лептоспирозом среди животных немедленно принять меры по предупреждению заражения людей и оказанию помощи по выявлению источников возбудителя инфекции.

7.2. Лица, обслуживающие животных в неблагополучных по лептоспирозу хозяйствах, должны выполнять правила личной профилактики и быть вакцинированными против лептоспироза.

**Методические указания по лабораторной диагностике лептоспироза**

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

**1. Бактериологическая диагностика лептоспироза**

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

– взятие патологического материала;

– микроскопия в темном поле микроскопа;

– выделение культур лептоспир посевом в специальные среды или биологической пробой на лабораторных животных;

– идентификация и дифференциация выделенных культур.

1.1. Порядок взятия материала для лабораторного анализа

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

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

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

1.1.3. Кровь в количестве 3–5 мл берут для бактериологического исследования в период лихорадки на 1–7-й день болезни, для серологического исследования – 5–10 мл и не ранее чем через 5–7 дней после проявления клинических признаков болезни или через 60 дней после введения вакцины.

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

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

1.1.6. Воду из водоисточника для обнаружения лептоспир берут в объеме 1,5–2 л в стерильные колбы с ватно-марлевыми пробками.

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

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

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

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

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

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

1.2. Микроскопическое исследование

1.2.1. Для микроскопического исследования на лептоспироз необходимы:

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

– конденсор темного поля (ОИ-7, ОЙ-13 и др.);

– осветитель (ОИ-19, ОИ-21 и др.) с точечной лампой;

– предметные стекла толщиной не более 0,8–1,1 мм;

– покровные стекла стандартные.

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

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

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

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

Микроскопируют исследуемый материал при увеличении 40X7–10 и 20X1,5X7, а для более детального рассмотрения препарата–при увеличении 40ХЮ-15 или 40X1,5X10.

1.3. Характеристика лептоспир

1.3.1. Лептоспиры при рассмотрении в темном поле микроскопа представляют собой спиралеподобные тонкие серебристые нити, – концы которых, оба или один, загнуты и булавовидно утолщены. Встречаются и бескрючковые формы лептоспир. Лептоспиры подвижны. В жидких средах обычными формами движения являются: вращательное, прямолинейное поступательное с одновременным вращением вокруг собственной оси и круговые. Одна и та же особь может совершать и вращательные и поступательные движения.

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

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

1.4. Микроскопия мочи

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

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

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

1.4.2. Лептоспир с активной подвижностью обнаруживают примерно в 50% положительных проб, в остальных случаях они неподвижны и довольно часто имеют измененную морфологию. Количество их также бывает различным. В моче примерно у 30% животных – лептоспироносителей содержатся по 1–2, реже по 5–7 и очень редко по 10–15 лептоспир в каждом поле зрения, в 30 – 35% ' случаев удается обнаружить 1–2 лептоспиры в 5–'10 полях. В остальных случаях выявляют 1–2 лептоспиры в 20–50 и более полях зрения.

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

1.5. Микроскопия крови

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

1.6. Микроскопия суспензии из ткани органов

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

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

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

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

1.7. Дифференциальная диагностика

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

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

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

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

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

1.7.6. Интерспиры обитают в препуциальном мешке свиней. В моче, взятой при естественном мочеиспускании, их обнаруживают повсеместно в 50–80% случаев. В моче, взятой из мочевого пузыря, они не содержатся. Интерспиры подвижны. Оба или один конец микробной клетки перемещается судорожными, маятникообразными с широкой амплитудой движениями. После нескольких колебательных движений клетка некоторое время остается неподвижной, а затем снова можно наблюдать несколько очередных движений. Подвижность сохраняется не более 1–2 часов с момента получения мочи. Неподвижная интерспира имеет, так же как и лептоспира, один или два крючка и не преломляет свет, но в отличие от лептоспир у шее видны первичные завитки и тело клетки запоминает нить, состоящую из бусинок. Концы крючков заострены.

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

1.8. Выделение культур лептоспир

1.8.1. Выделение лептоспир из крови при жизни возможно в первые 5–7 дней болезни в период лихорадки. Для этой цели кровь из яремной или ушной вены вносят через стерильную иглу по 3–5 капель в 5–7 пробирок с питательной средой или высевают из пробы крови, присланной в лабораторию (приложения 2 и 3).

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

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

1.8.4. Высевы из других органов делают по общепринятой методике.

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

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

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

1.9. Порядок сохранения культур

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

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

Культуру лептоспир пересевают через каждые 10–15 дней не менее чем в 3–4 пробирки.

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

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

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

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

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

1.10. Очистка загрязненных культур лептоспир

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

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

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

1.11. Постановка биологической пробы

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

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

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

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

1.11.3. Для выделения культур лептоспир животных заражают кровью, мочой, суспензией из паренхиматозных органов животных (абортированного плода) или спермой.

Исследуемый материал вводят подкожно или внутрибрюшинно хомякам от 0,3–0,5 до 1 мл, крольчатам – 2–3 мл.

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

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

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

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

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

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

1.11.10. В качестве биологической модели для обнаружения лептоспир могут быть использованы взрослые кролики и морские свинки. Кровь животных исследуют по РМА на наличие специфических антител. Животных, в крови которых не обнаружены специфические антитела, заражают исследуемым материалом.

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

**2. Бактериологическое исследование воды**

2.1. Вода является основным фактором в передаче возбудителя лептоспироза.

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

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

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

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

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

**3. Импрегнация гистологических срезов из органов серебром по левадити**

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

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

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

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

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

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

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

Время выдержки контролируют приготовлением единичных срезов через каждые 12–16 часов во избежание передержания, так как срезы могут стать черными. Промывают в дистиллированной воде 1–2 часа.

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

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

Из быстро остуженного парафина вырезают блок с кусочком органа и наклеивают на деревянный кубик. Приготавливают тонкие срезы на санном микротоме и наклеивают на предметное стекло, депарафинируют в трех бюксах с ксилолом по 10–15 минут в каждом и заключают под покровное стекло в канадский бальзам, подсушивают и просматривают под микроскопом со светлопольным конденсором при увеличении 90X7–10.

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

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

**4. Серологическая диагностика лептоспироза**

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

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

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

4.1. Порядок постановки и учета реакции микроагглютинации (РМА)

4.1.1. Для постановки реакции микроагглютинации необходимы:

– исследуемая сыворотка крови животных;

– антигены – культуры диагностических штаммов лептоспир;

– электролит – физиологический раствор;

– микроскоп, конденсор темного поля и осветитель те же, что для микроскопической диагностики;

– агглютинационные пластинки или пробирки Флоринского;

– 40–100-гнездные штативы;

– бактериологические пробирки;

– градуированные пипетки на 1, 2, 5 и 10 мл;

– аппарат Флоринокого;

– предметные стекла.

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

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

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

Высушивают сыворотку на квадратах (5X5 см)' белой фильтровальной бумаги по 3–5 капель (0,05 мл каждая) при комнатной температуре или в термостате при температуре 37 °С. Консервированные пробы сыворотки пригодны для исследования в течение месяца. Гемолизированные, загнившие, плесневелые и проросшие сыворотки не исследуют.

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

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

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

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

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

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

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

В реакции используют чистые культуры лептоспир в возрасте 5–15 дней без признаков агглютинации и лизиса (четкообразные, неподвижные клетки) с накоплением 70–100 микробных клеток в поле зрения микроскопа при увеличении 20X10X1,5 или 40X7–10. Культуры, содержащие 150–200 и более лептоспир в поле зрения микроскопа, разводят перед постановкой реакции питательной средой или физиологическим раствором до указанной концентрации.

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

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

4.1.8. Реакцию учитывают путем микроскопии капель из каждой лунки в темном поле микроскопа при увеличении 20X10 или 20X7X1,5. Капли из лунок выносят на предметное стекло бактериологической петлей от большего разведения к меньшему и просматривают их без покровного стекла. Капли можно наносить двумя способами: 1) бактериологической петлей диаметром 3 мм наносят на стекло сразу до 30 капель и затем просматривают их под микроскопом; 2) бактериологической петлей диаметром 1 мм наносят на предметное стекло в освещенный центр поля зрения одну каплю и просматривают ее, передвигают столик на 2–3 мм и рядом с первой наносят и учитывают вторую каплю. В этом случае на одном предметном стекле учитывают 60–80 капель.

После каждого антигена петлю прокаливают и охлаждают.

4.1.9. Результаты реакции оценивают в крестах по четырехбалльной системе:

+ + + +агглютинированы 100% лептоспир;

+ + + – агглютинированы 75% лептоспир;

+ + – – агглютинированы 50% лептоспир;

+ – – – агглютинированы 25% лептоспир;

– (знак минус) агглютинация отсутствует. Агглютинация проявляется в склеивании лептоспир и образовании паучков. Паучок включает от 3–5 до нескольких десятков и даже сотен лептоспир. Свободные концы лептоспир сохраняют подвижность.

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

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

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

4.2. Порядок постановки и учета реакции макроагглютинации (РА)

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

4.3. Оценка показаний РМА и РА

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

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

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

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

4.3.3. Животных (кроме лошадей и реагирующего с лептоспирами группы Hebdomadis крупного рогатого скота) с титром сыворотки в РМА 1: 500 и более или в РА на 3–4 креста и крупный рогатый скот, реагирующий с лептоспирами группы Hebdomadis и лошадей, реагирующих с лептоспирами любой серогруппы при титре в РМА 1:2500 и более или в РА на 3–4 креста, рассматривают как возможных лептоспироносителей.

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

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

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

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

4.4. Методика постановки реакции иммуноабсорбции при исследовании проб сыворотки

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

4.4.2. Для проведения абсорбции выращивают в 0,2 – 0,5 – литровых флаконах все штаммы лептоспир, с которыми данная проба сыворотки дала реакцию агглютинации. К 5–7-суточным культурам добавляют 0,3% формалина и выдерживают 10–12 часов. Затем лептоспиры осаждают центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 30 минут. Сливают надосадочную жидкость, а осадок суспензируют в объеме 0,9 мл среды или физиологического раствора, 0,1 мл исследуемой сыворотки смешивают с 0,9 мл концентрированного антигена и выдерживают в течение 48 часов при температуре 1–5 °С. Абсорбированную сыворотку проверяют в РМА на наличие остаточных антител к штамму-абсорбенту, а затем исследуют с лептоспирами групп, с которыми реагировала сыворотка до абсорбции.

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

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

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

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Серологическая группа | Серологический вариант | Типовой штамм |
| Icterohae-morrhagiae | icterohaemorrhagiae copenhageni mankarso naa'm mwogolo dakota sarmin birkini smithi ndambari ndahambukuje budapest weaveri | RGA M-20 Mankarso Naam Mwogolo Grand River Sarmin Birkin Smith Ndambari Ndahambukuje PV-1 GZ-390-U |
| Javanica | javanica poi sorex-jalna coxi sofia | Veldrat Batavia 46 Poi Sorex Jalna Cox Sofia 874 |
| Celledoni | celledoni whitcombi | Celledoni Whitcombi |
| Canicola | canicola bafani kamituga jonsis sumneri broomi bindjei schnueffneri benjamin malaya | Hond Utrecht IV Bafani Kamituga Jones Sumner Patane Bindjei Vleermuise 90-C Benjamin H-6 |
| Ballum | ballum castellonis arboreae | MUS-127 Castellon-3 Arboreae |
| Pyrogenes | pyrogenes Zanoni myocastoris abramis biggis hamptoni alexi robinsoni rnanilae | Salinem Zanoni LSU-1551 Abraham Biggs Hampton HS-616 Robinson LT-398 |
| Cynopteri | cynopteri canalzoniae butembo | 3522-C Cz-188k Butembo |
| Autumnalis | autumnalis rachmati fortbragg sumatrana bulgarica bangkinang erinaceiauriti mooris sentot louisiana Orleans djasiman gurungi | Akiyama A Rachmat Fort Bragg Sapulette Nikolaevo Bangkinang-1 Erinaceus auritus 670 Moores Sentot LSU-1945 LSU-2580 Djasiman Gurung |
| Australis | australis lora muenchen jalna bratislava fugis bangkok peruviana pina nicaragua | Ballico Lora Munchen C-90 Jalna Jez Bratislava Fudge Bangkok D-92 Lt-941 LT-932 Lt-990 |
| Pomona | pomona kennewieni monjakov mozdok tropika proechimys | Pomona Lt-1026 Monjakov 5621 CZ-299U LT-796 |
| Grippotypho-sa | grippotyphosa valbuzzi | Moskva-V Valbuzzi |
| Hebdomadis | hebdomadis nona kambale kremastos worsfoldi jules maru borincana kabura mini | Nebdomadis Nona Kambale Kremastos Worsfold Jules CZ-285– В HS-622 Kabura Sari |
| Hebdomadis | szwajizak georgia perameles wolffi  hardjo recreo medanensis trinidad seiroe balcanica polonica nero haemolytica ricardi | Szwajizak LT-117 Bandicoot-343 3705 Hardjoprajitno LT-957 Hond-HC LT-1098 M-84 1627 Burgas 493-Poland Qamsulin March Richardson |
| Bataviae | bataviae  paidjan djatzi kobbe balboa claytoni brasiliensis | Van Tienen Paidjan HS-26 CZ-320-K LT-761 LT-818 LT-996 |
| Tarassovi | tarassovi bakeri atlantae guidae kisuba bravo atchafalaya chagres rama gatuni | Perepelicin LT-79 LT-81 RP-29 Kisuba Bravo LSU-1013 LT-924 LT-955 LT-839 |
| Panama | panama | CZ-214-K |
| Sherman! | shermani | LT-821 |
| Semaranga | semaranga patoc sao-paulo | Veldrat Semarang-173 Patoc I Sao Paulo |
| Andamana | andamana | CH-11 |