**КУРСОВАЯ РАБОТА**

**На тему:**

**"Лептоспиры. Диагностика лептоспироза"**

Нижний Новгород 2010 г.

**1. Историческая справка**

Лептоспироз (лат. – Leptospirosis; болезнь Вейля, тиф собак) – в основном остро протекающая природно-очаговая болезнь животных многих видов и человека, проявляющаяся кратковременной лихорадкой, гемоглобинурией или гематурией, геморрагиями, желтушным окрашиванием и очаговыми некрозами слизистых оболочек и кожи, атонией желудочно-кишечного тракта, абортами, маститами, рождением нежизнеспособного потомства, периодической офтальмией и менингоэнцефалитами, снижением продуктивности животных.

80-е годы 19 века являются чрезвычайно насыщенным периодом микробиологических исследований и открытий. Вейн – врач-клиницист, описал первый реакцию агглютинации при риккетсиозе, сыпном тифе. Он подчеркнул, что это заболевание имеет выраженную вариабельность симптомов, оно может протекать в форме ОПН, с выраженным геморрагическим синдромом, всегда сопровождается желтухой.

В 1888 году Васильев независимо от Вейна описал лептоспироз как самостоятельную желтуху ничего общего не имеющую с болезнью Боткина.
Возбудитель поселяется в желчи, и может закупоривать желчные протоки.

Также лептоспироз называется иктерогеморрагическая лихорадка.
В 1928 году В.А. Башенин описал безжелтушную форму лептоспироза, и назвал ее водной лихорадкой. В 1972 году предложено разделить лептоспироз на две группы: желтушный лептоспироз и безжелтушный лептоспироз.

Возбудитель лептоспироза был обнаружен в 1914 году японскими учеными Инардо и Идо (в 1915 году), они независимо друг от друга выделили возбудителя.

Возбудитель лептоспироза – это спирохета, имеющая закругленный конец, очень тоненькая, со спиралевидным крючком. Назвали микроорганизм по его структуре – «лепто» – тонкий, «спира» – крючок. Таким образом, и всему роду возбудителей было дано название.

**2. Распространение в природе**

лептоспироз заболевание лечение диагностирование

Лептоспирозы относятся к группе заболеваний, которые являются не только зоонозами, но и природно-очагововыми заболеваниями. Основными резервуарами инфекции являются стоячие водоемы, в которых, как правило, сохраняются лептоспиры годами, а дикие грызуны (мыши-полевки, тушканчики и др.) являясь чрезвычайно чувствительными объектами для воспроизведения данной инфекции, поддерживают патологический процесс, болея лептоспирозом, который может протекать у них в различных формах – от бессимптомного носительства до тяжелых генерализованных форм.

Природные очаги лептоспирозов, обусловленные наличием инфекции среди диких животных, имеют ландшафтную стациальную приуроченность. Они располагаются преимущественно в лесной, лесотундровой зонах, а по долинам рек и ирригационным каналам проникают в лесостепную, степную и полупустынные зоны. В пределах своего ареала они встречаются не повсеместно, а в понижениях рельефа, где приурочены главным образом к сырым заболоченным и чрезмерно увлажненным местам. Наивысшей интенсивности лептоспирозного эпизоотического процесса и наибольшего эпидемического потенциала природные очаги достигают в летне-осенний период (июль – октябрь), что связано с пиком численности мелких млекопитающих.

Антропургические очаги, в противоположность природным очагам, не имеют определенной ландшафтной приуроченности и могут возникать повсеместно как в сельской местности, так и в городах. Антропургические очаги имеют важнейшее эпидемиологическое значение, особенно в условиях формирования крупных животноводческих хозяйств. Активность эпизоотического процесса возрастает летом. Манифестность инфекции при этом увеличивается. После острой инфекции через 10 – 20 дней у ряда особей развивается лептоспироносительство, которое продолжается в течение нескольких месяцев и до 1–2 лет, у свиней практически в течение жизни. Все вышеизложенное свидетельствует о том, что для эпизоотического процесса лептоспироза в природных и антропургических очагах характерна саморегулирующаяся смена фаз резервации и эпизоотического распространения возбудителя.

Грызуны выделяют возбудителя с мочой в окружающую среду: почву, инфицируя растения, что приводит к формированию природных очагов, но сформированных дикими животными, которые поедают растения, пьют инфицированную воду. В природе постоянно поддерживается циркуляция лептоспироз. Массивность инфицирования лептоспирами водоема зависит от количества рядом обитающих грызунов, которые являются основными поставщиками инфекции.

Таким образом, можно сказать, что любой район, любая сельская местность, может быть районом обитания грызуном, то есть любая местность может быть опасна с точки зрения формирования очага.

**3. Эпизоотология**

Механизм развития и проявления эпизоотического процесса (резервуар возбудителя).

Хозяевами лептоспир являются мелкие млекопитающие в природных очагах, синантропные грызуны, а также свиньи, крупный рогатый скот и другие домашние животные. Обычно в популяции диких штаммов лептоспир, выделенных от животных, характеризующихся высокой степенью вирулентности, содержатся и невирулентные клетки в 10 7, как и в невирулентной популяции – 107 вирулентных клеток.

У крупного рогатого скота, помимо бессимптомных форм, имеют место проявления иктерогемоглобинурии и желтухи. У супоросных свиноматок и реже у коров заболевание сопровождается абортами. Популяция каждого отдельного серовара лептоспир поражает главным образом популяции определенного вида животных. Этой особенностью определяются основные источники лептоспирозной инфекции. Но у совместно обитающих видов животных наблюдаются и перекрестные заражения.

С экологической точки зрения отдельные серогруппы имеют видовые свойства. Однако по официальной классификации все патогенные лептоспиры объединены пока в один вид L. interrogan в отличие от сапрофитного вида L. biflеха.

Эпидемические лептоспиры в популяции или стаде млекопитающих передаются от особи к особи водным путем.

Наибольшую опасность представляют свиньи, которые бывают поголовно инфицированы. Чрезвычайно опасны собаки как резервуар лептоспир и источник инфекции. Собакам не отводилось должной роли примерно до 1992–93 года, когда резко повысилась роль собачьей лептоспиры в возникновении лептоспироза. Этот лепоспироз, как правило, безжелтушный, протекает не так тяжело, без выраженных геморрагического синдрома, ОПН, но явления менингита есть. К 1995 году эта лептоспира опять стала занимать малый удельный вес в заболевании лептоспирозом. В 1996 года эта лептоспира занимала в структуре 8%.

Особую эпизоотологическую и эпидемиологическую опасность представляют бессимптомно больные животные-лептоспироносители. Количество лептоспироносителей на неблагополучной по лептоспирозу ферме среди крупного и мелкого рогатого скота колеблется от 1–5 до 10–20%; среди свиней – 30–80%. Срок лептоспироносительства после переболевания или скрытого инфицирования довольно продолжительный: у крупного рогатого скота 1,5–6 месяцев; у овец, коз – 6–9 месяцев; у свиней – от 15 дней до 2 лет; у собак – от 110 дней до 3 лет; у кошек – от 4 до 119 дней; у кур, уток, гусей – от 108 до 158 дней.

Выделяющиеся из организма больных животных и микробоносителей лептоспиры инфицируют воду, корма, пастбища, почву, подстилку, и другие объекты внешней среды, через которые заражаются здоровые животные. Среди указанных факторов передачи возбудителя водный путь является основным. Особую опасность представляют невысыхающие лужи, пруды, болота, медленно текущие речки, влажная почва.

Животные заражаются лептоспирозом чаще при водопое, при поедании трупов грызунов – лептоспироносителей или кормов, инфицированных мочей этих грызунов. Промысловые животные при клеточном их содержании инфицируются в основном при поедании продуктов убоя больных лептоспирозом животных; свиньи – во время купания в открытых водоемах, молодняк – при выпойке молока от больных матерей.

Возможно и внутриутробное заражение у крупного рогатого скота, овец и свиней. Доказана возможность передачи возбудителя половым путем.

Лептоспиры проникают в организм животного и человека через поврежденные участки кожи (царапины, порезы, раны, укусы), слизистые оболочки ротовой и носовой полостей, глаз, половых путей и через желудочно-кишечный тракт.

Лептоспироз чаще встречается в местностях, где почва влажная, содержит много гумуса, имеет нейтральную или слабощелочную реакцию.

Болезнь наблюдается в любое время года, но у животных с пастбищным содержанием – преимущественно в летне-осенний период. Так, анализ заболеваемости крупного рогатого скота лептоспирозом в России показывает, что на июнь-сентябрь приходится 77% заболевших животных. Сезонная динамика болезни в различных природно-экономических зонах неодинакова.

Лептоспироз свиней относится к числу болезней без выраженной сезонности, проявляющийся с равной интенсивностью на протяжении всего года. Это объясняется тем, что водный фактор в распространении заболевания среди свиней имеет значительно меньшее значение, чем для животных других видов.

Лептоспироз проявляется в виде небольших эпизоотий и спорадических случаев. Характерная особенность эпизоотии состоит в том, что вначале в течение 5–10 дней заболевает небольшая группа животных, затем вспышка затихает, но через несколько дней снова повторяется. Это обстоятельство связано с накоплением возбудителя инфекции во внешней среде, т. к. длительность паузы примерно равна инкубационному периоду.

Главной эпизоотологической особенностью лептоспироза сельскохозяйственных животных в настоящее время является преобладание бессимптомных форм инфекции в виде лептоспироносительства и лептоспирозной иммунизирующей субинфекции.

**4. Патогенез**

Не смотря на то, что возбудитель выделен, заболевание тяжелое, сопровождается высокой летальностью, патогенез его изучен мало. Очень хорошо знают о том, как лептоспира попадает в организм человека, как она выделяется, а где она размножается и накапливается изучено плохо. Все основано на предположениях. В организм лептоспира проникает через поврежденную кожу, через слизистые оболочки рта, носа, глаз, через ЖКТ. На месте входных ворот не отмечается никаких изменений, и проникновение в организм лептоспир не сопровождается возникновением воспалительной реакции, следовательно, раз нет первичного очага, лептоспира быстро проникает в кровь, и с током крови заносится во все органы и ткани. Некоторые авторы считают, что размножение лептоспир происходит в лимфатических узлах, в клетках РЭС. Некоторые полагают, что лептоспиры с током крови поступают в печень, и там происходит накопление лептоспир для формирования инфектомы – минимальной дозы достаточной для соответствующей реакции организма.

Накопившись до патогенных количеств, лептоспира выбрасывается в кровь, что сопровождается повышением температуры и характеризует начальный период заболевания, которое проявляется и как фаза кратковременной первичной бактериемией, с первичной диссеминацией возбудителя в организме. В инкубационном периоде возбудитель поступает в кровь и не оставляет следа что говорит о том что наличие иммуногенности у лептоспиры не велика. То есть эта фаза не сопровождается сенсибилизацией, и иммунокомпетентные клетки не имеют иммунной памяти, а следовательно, в эту фазу нет гиперэргического воспалительного ответа. Возникает лихорадка, которая длится 5–7 дней. Далее возбудитель с током крови проникает в различные органы, в том числе костный мозг, проявляя свое гематотоксическое воздействие, в почки оказывая нефротоксическое действие, в печень, спинной мозг, серозные оболочки головного мозга (вызывает серозный менингит). Часть возбудителей оседает в тканях, часть погибает вследствие бактерицидного действия крови. При гибели возбудителя высвобождается токсин, который оказывает токсическое влияние на эндотелий капилляров – повышение проницаемости, повреждение сосудистой стенки, а следовательно, и побуждает к формированию тромбов, которые могут служить первой фаза начинающегося ДВС-синдрома. В органах и тканях лептоспиры опять размножаются и накапливаются, а следовательно, после недельной лихорадки, температура понижается. Но в этом периоде самочувствие не улучшается, а напротив в этом периоде будет продолжаться токсемия и лептоспирозный токсин оказывает эффект, что может проявляться развивающимися мышечными болями, вследствие того, что повреждается капилляры мышц (пропотевание крови рядом с нервными стволами). Эти мышечные боли на фоне нормальной температуры заставляет обратиться пациента к врачу, и ему ставят что угодно, но только не лептоспироз.

Имеющийся конъюнктивит (следствие повреждения сосудов) также расценивается как вирусный. После накопления возбудителя в органах и тканях наступает следующая фаза – фаза вторичной бактериемии. Вновь возбудитель попадает в кровь, происходит повторная диссеминация возбудителя во все органы и ткани. Клинически эта фаза проявляется повышением температуры, таким образом, начинается лихорадка, так как в крови циркулируют лептоспиры, которые очень быстро гибнут. Первичная бактериемия создала условия для выработки и накопления антител, и при вторичной бактериемии происходит быстрая гибель микробов.

Взаимодействие антигена и антитело приводит к образованию комплексов, которые адсорбируются на шоковых органах – почки, печень, сердце, мягкие оболочки головного мозга, что приводит к формированию гипертермической воспалительной реакции (возбудитель в этой реакции уже не участвует).

Вторая фаза – фаза вторичной лептоспиремии, логично переходит в третью фазу патогенеза – фаза наивысшей степени токсинемии с развитием универсального капилляротоксикоза. Не смотря на то что лихорадки нет, симптоматика нарастает как снежный ком, так как заболевание приобретает аутоиммунный характер. Больше всего комплексы адсорбируются на эндотелии капилляров. Комплекс антиген-антитело способствуют выработки гистамина, брадикинина что приводит к некрозу капиллярам – возникает капилляротоксикоз. Если комплексы образовались в клубочково-канальцевом аппарате почек, то у больного развивается ОПН (олигоурия, повышение остаточного азота).

Если эти комплексы образовались преимущественно на эндотелии капилляров, то у больного начинается массивное кровотечение, и больной умирает от ДВС-синдрома. если оседают комплексы на оболочках головного мозга, то возникает менингит (серозный, гнойный). Если комплексы оседают на гепатоцитах, то возникает гепатит. Редко бывает поражение какого-либо одного органа, как правило, поражаются все органы и ткани, но с преимущественным поражением какого-либо одного органа.

Отмечается извращенная реакция костного мозга. Токсин лептоспир сам по себе способствует гемолизу эритроцитов. В крови повышается свободный (непрямой) билирубин. Моча вследствие геморрагического синдрома розовая, на фоне желтухи кожных покровов.

5. Течение и клиническое проявление

Инкубационный период 5–13 дней (по данным больницы Боткина 15–18 дней).

Лихорадочный период 6–7 дней, желтушный период 1–2 недели, рецидив болезни на 2–5 недели. Выздоровление через месяцы. То есть начало лептоспироза острое – лихорадка, с ознобом, интоксикацией, нарушением сна. В первые дни болезни характерным является наличие конъюнктивита, тошноты, рвоты (диспепсических расстройств), появление мышечных болей. Лихорадка всегда носит реммитирующий характер, особенно в первой фазе. После снижения температуры, у больных, как правило, появляется желтуха, которая усиливается появлением новой лихорадочной волны. Поэтому дифференциально – диагностическим признаком желтухи вызванной лептоспирозом и вирусным гепатитом А является этот признак, так как при вирусной гепатите А с появлением желтухи состояние больного, как правило, улучшается. С появлением желтухи появляется геморрагический синдром разной степени выраженности, и вовлекаются в процесс почки (нарастают явления ОПН).

Рецидивы болезни наблюдаются у 30% больных. Иногда при лептоспирозе отмечается появление розеолезной, папулезной, и даже эритематозной сыпи в третий период болезни, когда образуются комплексы, которые могут откладываться в лимфатических сосудах кожи и на лептоспиру будет реакция клеточных элементов. Сыпь может быть такая же, как при брюшном тифе (даже патогенез ее появления).

**5.1 Осложнения**

1. Серозный менингит, гнойный менингит (40% случаев). Чаще является осложнением безжелтушного варианта. Характерной особенностью является поздняя санация ликвора. Цитоз держится месяцами.

2. Поражение глаз – иридоциклит (7%).

3. Уремия (ОПН).

4. Пневмонии

5. Анемии

6. Геморрагический синдром

7. Инфекционно-токсический шок

8. Гепатит

5.2 Проявления лептоспироза

Безжелтушная форма лептоспироза: инкубационный период – 5–12 суток, резкий подъём температуры тела до 39–40°С, мышечные и головные боли, конъюнктивит, покраснение склер. На 3–5 сутки возможно появление ярко-розовой сыпи на конечностях и туловище. Возможны тошнота, рвота (иногда с кровью), боли в животе. В некоторых случаях отмечают двустадийное течение заболевания – в первой доминируют гриппоподобные проявления; для второй (через несколько суток или недель) характерна типичная клиника безжелтушного лептоспироза. Прогноз безжелтушного лептоспироза благоприятный. Осложнения безжелтушного лептоспироза – воспаление почек, легких, глаз.

Желтушный лептоспироз (болезнь Васильева–Вейля) – наиболее злокачественная форма лептоспироза. Инкубационный период – 2–19 суток (в среднем 7–13 суток). Желтушный лептоспироз начинается остро, температура тела повышается до 39–40°С. Лихорадка держится 5–7 суток и затем снижается до нормальных величин. Одновременно с падением температуры тела (иногда со 2–4 дня заболевания) появляется желтушное окрашивание кожи и слизистых оболочек. Приблизительно у 30% больных животных наблюдают повторный, обычно укороченный, подъём температуры тела (вторая неделя болезни); в начале 2 недели желтуха становится более интенсивной. Присутствуют мышечные и головные боли, конъюнктивит, тошнота, рвота (часто с кровью) и боли в животе. Могут быть герпетические высыпания на безшерстной части туловища животных. Практически у всех больных выявляют увеличение печени и селезёнки. В благоприятных случаях с конца второй недели и в течение последующих 5–6 недель наступает постепенное выздоровление. Осложнения желтушного лептоспироза: поражения органов зрения – парезы наружных мышц глаз, радужки, воспаления глазного нерва. Выздоровление сопровождается выработкой стойкого иммунитета.

6. Патологоанатомические признаки

Патологоанатомические изменения характеризуются анемией, желтухой, геморрагическим диатезом, некрозами кожи и слизистых оболочек, дегенеративно-воспалительными изменениями паренхиматозных органов.

Печень в большинстве случаев увеличена и перерождена. Цвет ее от глинисто-красного до желтого, консистенция упругая, дряблая или ломкая. Иногда в паренхиме обнаруживают мелкие некротические очажки и кровоизлияния. Желчный пузырь растянут и переполнен густой тягучей желчью темно- или буро-зеленого цвета; на слизистой оболочке единичные или множественные кровоизлияния.

Почки также увеличены, дряблые; в зависимости от степени кровенаполнения, дегенеративных изменений и пигментации окрашены в вишнево-глинистый, серовато-красный или темно-коричневый с зеленоватым оттенком цвет. Околопочечная клетчатка отечная. Фиброзная капсула серого цвета, обычно легко снимается. В паренхиме почек обнаруживают единичные или множественные сероватые очажки различной величины. Граница коркового и мозгового слоев сглажена. Корковый слой расширен, бледно окрашен, иногда содержит мелкие кровоизлияния. Лоханка часто заполнена желеобразной массой красноватого цвета.

Морфологическая картина по всем органам характеризуется лимфогистиоцитарными воспалительными инфильтратами, что позволяет считать эти изменения специфическими для лептоспироза.

7. Экономический ущерб

Экономический ущерб обусловливается высокой летальностью крупного рогатого скота и свиней (25–45% и более), снижением удоя (на 22–37%), потерей массы тела (на 18–28%), замедлением роста молодняка, понижением работоспособности у волов и буйволов, гибелью потомства (до 90%), абортами (у 15–20% коров и свиноматок у 100%), снижением товарных качеств кож переболевших животных и выбраковкой продуктов животноводства на мясокомбинатах, нарушением воспроизводительной функции, а также затратой значительных средств на диагностические, профилактические, лечебные и карантинно-ограничительные мероприятия (С.Я. Любашенко, 1948, 1962; М.А. Мусаев, 1959). Общая сумма ущерба, причиняемого лептоспирозом свиноводческим хозяйствам колеблется в пределах 12–47 тыс, рублей в год (в доперестроечных ценах), или в среднем 14,6 руб. на одно заболевшее животное (И.И. Дукачев, 1972).

8. Возбудитель болезни. Диагностика лептоспироза

Спирохеты – извитые подвижные бактерии, относящиеся к порядку Spirochaetales, семейству Spirochaetaceae. Патогенные спирохеты принадлежат к трем родам: Borrelia, Treponema, Leptospira.

**8.1 Классификация**

Возбудитель лептоспироза относится к **группе 1** – спирохеты**, семейство** Leptospiraceae, **род** Leptospira, который включает в себя 10 видов:

**Типовой вид: L. interrogans**

L. biflexa (сапрофит)

**L. borgpetersenii**

**L. inadai**

L. meyeri (сапрофит)

**L. noguchii**

L. parva (сапрофит)

**L. santarosai**

**L. weilii**

L. wolbachii (сапрофит)

Наиболее изучен вид **L. Interrogans,** по антигенным свойствам он разделен на 25 серогрупп, которые включают 180 сероваров. Таксономическим критерием для классификации штаммов Leptospira на внутривидовом уровне служит антигенный состав клеток. Патогенные лептоспиры разделены на 38 серогрупп и 65 сероваров.

Установлена выраженная видовая чувствительность животных к лептоспирам определенных серологических групп и вариантов. Так, основными возбудителями лептоспироза свиней являются Pomona и Tarassovi, крупного рогатого скота – Hebdomadis, Pomona и Grippotyphosa, мелкого рогатого скота – Grippotyphosa, Pomona и Tarassovi. Крупный и мелкий рогатый скот заражаются лептоспирами Grippotyphosa и Hebdomadis преимущественно при выпасании на территории природного очага от полевок и других видов грызунов – основных резервуаров лептоспир данных серогрупп. Основными хозяевами лептоспир серогрупп Pomona и Tarassovi являются чаще свиньи и крупный рогатый скот. В природных очагах лептоспир Pomona у полевых мышей выявляют серовариант mozdok, который вызывает у сельскохозяйственных животных только спорадические случаи инфекции. Природные очаги лептоспир Tarassovi на территории России и стран СНГ не обнаружены.

Лептоспирами Tarassovi и Pomona в большинстве случаев свиньи заражаются только от свиней, а крупный рогатый скот – только от крупного рогатого скота. Может наблюдаться межвидовое заражение. Лептоспирами Icterohaemorrhagiae и Canicola сельскохозяйственные животные инфицируются от основных хозяев этих лептоспир: серых крыс и собак. Лептоспироз, вызванный этими возбудителями, протекает спорадически и не поражает больших групп животных.

У сельскохозяйственных животных в разных местах обнаруживают лептоспиры одних и тех же серологических групп: Pomona, Tarassovi, Hebdomadis, Icterhaemorrhagica, Canicola. У мелких млекопитающих, кроме названных, выделяют лептоспиры Australis, Javanica, Autumnalis, Cynopteri, Batoviae, Pyrogenes. Эти серогруппы у сельскохозяйственных животных не находят.

**8.2 Устойчивость к факторам внешней среды**

Лептоспиры неустойчивы к воздействиям внешних факторов. Прямые солнечные лучи убивают их в течение 0,5–2 ч. Высушивание на лептоспир действует также губительно. В воде открытых водоемов **лептоспиры** выживают от нескольких часов до 30 сут.

При кипячении культуры они гибнут моментально, а при нагревании до 56°С – через 30 мин. Очень устойчивы лептоспиры к низким температурам. Выживаемость микроорганизмов в пищевых продуктах зависит от рН среды. Кислая реакция губительно действует на лептоспиры. Так, в кислом молоке они гибнут в течение 10 мин. Мясо от больных животных обеззараживается при содержании в нем соли 4,8% в течение 10 сут. 20%-ный этиловый спирт, 2%-ная хлористоводородная кислота, 0,5%-ный раствор фенола, 0,5%-ный раствор едкого натра, 0,25%-ный формалин убивают лептоспир в течение 5 мин.

**8.3 Отбор патматериала**

Для прижизненной диагностики, для бакисследования берут кровь из вены (в первые 7 суток при повышении температуры тела больного животного, 5 мл для бактериологического и 5–10 мл для серологического исследований). Для серологической диагностики кровь отбирают не ранее 5–7 суток после начала заболевания. Обязательно нужно брать пробу крови от абортировшего животного. В крови можно обнаружить живые лептоспиры. Можно брать мочу, которую собирают в стерильные емкости во время естественного мочеиспускания утром (во время кормления). Абортированный плод посылают целиком или его желудок с содержимым (перевязывая его с двух сторон), паренхиматозные органы плода (отдельно от желудка).

Для посмертной диагностики – трупы мелких животных целиком, от крупных животных – сердце с перевязанными сосудами, кусочки органов, почку, селезенку, перевязанный мочевой пузырь, транссудаты из грудной и брюшной полостей. Материал должен быть исследован не позднее 6 часов летом, 10–12 часов – зимой, мочу – в течение 3 часов (то есть сроки выживания лептоспир в данных условиях).

Помимо материала от больных (павших) животных, в лабораторию могут быть направлены для исследования пробы воды (редко корм, навоз).

Для бакисследования предварительно готовят материал: мочу – центрифугируют (при 10–15 тыс. об/мин 30 мин) и исследуют осадок и надосадочную жидкость; кровь (цитратную) отстаивают, исследуют плазму; готовят из проб органов суспензию в стерильном физрастворе, исследуют в нативном состоянии или после центрифугирования.

**8.4 Диагностика**

Бактериологическая диагностика основана на обнаружении лептоспир в исследуемом материале путем микроскопии или выделения культур. Она складывается из следующих этапов: микроскопия в темном поле микроскопа, выделение культур лептоспир путем посева присланного материала от сельскохозяйственных животных или органов, зараженных этим материалом, лабораторных животных (биопроба) на специальные питательные среды, идентификация и дифференциация выделенных культур.

Одним из самых быстрых, простых и доступных для выполнения в практических условиях методов бактериологической диагностики является **микроскопическое исследование**. Микроскопию свежевыделенной мочи, околосердечной жидкости, грудного и брюшного экссудата, а также крови и суспензий паренхиматозных органов проводят в темном поле микроскопа. Морфология и характер движения лептоспир – настолько типичны, что в случае их обнаружения дается право ставить окончательный диагноз.

– Морфология

Клетка спирохеты имеет цилиндрическую извитую форму, содержит цитоплазму, отграниченную цитоплазматической мембраной, снаружи которой расположена клеточная стенка со слабовыраженным пептидогликановым слоем. Патогенные спирохеты имеют длину 3–20 мкм и толщину 0,1–0,5 мкм. Представители отдельных родов различаются по длине и толщине, числу и характеру завитков (табл. 2; рис. 21). Спирохеты грамотрицательны. Боррелии в отличие от трепо-нем и лептоспир хорошо окрашиваются анилиновыми красителями. Морфологию трепонем и лептоспир изучают путем микроскопии живых микроорганизмов в препаратах «раздавленная» или «висячая» капля в темнопольном или фазово-контрастном микроскопе, а также в мазках, окрашенных по Романовскому–Гимзе или специальными методами, например серебрением.

Лептоспиры различных серологических групп имеют одинаковые морфологические свойства. В препарате «раздавленная капля» в темном поле микроскопа лептоспиры имеют вид тонких серебристо-белых нитей с нежной спиральной структурой. Длина их 5–18 мкм, диаметр 0,05–0,14 мкм. Лептоспира имеет тонкую ригидную центральную осевую нить, вокруг которой равномерными завитками обвита цитопламатическая спираль. Тело лептоспиры, состоящее из правильных, почти соприкасающихся завитков спирали, постепенно утончается к концам, которые в большинстве случаев загнуты под углом и имеют пуговчатые утолщения (рис. 8). Помимо первичных завитков у лептоспир обнаруживают более крупные вторичные завитки, обусловливающие изгибы ее тела, вследствие чего микроорганизмы приобретают форму букв S, С, X. В старых культурах преобладают более длинные особи. Установлено наличие фильтрующихся форм **лептоспир**. Осевая нить служит органом движения. Характерная подвижность, лептоспир является их диагностическим признаком. Лептоспиры плохо окрашиваются анилиновыми красками, но хорошо импрегнируются серебром по методу Лёвадити.

Живые бактерии в жидких средах способны быстро перемещаться (прямолинейно, по кругу или вращением на месте). В полужидких субстратах их движения приобретают змеевидный характер. Периодически они становятся неподвижными, похожими на петлю веревки.

ЛС проявляют хемотаксис по отношению к веществам с повышенной вязкостью, гемоглобину и т.д. Сахара оказывают противоположный эффект и даже снижают их подвижность

Структура клетки лептоспир.



Обозначения: 1-наружная мембрана; 2-периплазматический цилиндр; 3-жгутик: - 1-наружная мембрана (а, б, в-ее слои); - 2-внутренняя мембрана; 3-периплазматическое пространство; 4-жгутики; 5-цитозоль

Структура клеточной стенки лептоспиры аналогична таковой других спирохет. 3–5-слойная наружная мембрана окружает протоплазматический цилиндр, покрытый гибким пептидогликановым слоем, тесно ассоциирванным с внутренней цитоплазматической мембраной, как у грамположительных бактерий. В этих слоях отсутствуют гликолипиды. В пептидогликане преобладает орнитин, а не диаминопимелиновая кислота, как считалось ранее.

Наружная мембрана лептоспиры весьма необычна, поскольку является самой жидкой из известных на сегодняшний день. Находящиеся в ней наружные мембранные протеины при движении всегда (даже при изменении направления) смещаются в задний конец клетки. Скорость дрейфа антигенов в мембранах приблизительно составляет 11 мкм/сек.

Оболочка клетки окружает так называемый «протоплазматический цилиндр». Благодаря укорочению закрученных вокруг него осевых нитей последний имеет винтообразную форму.

Два жгутика (осевые нити) диаметром 20–30 нм локализуются в периплазматическом пространстве между наружной мембраной и пептидогликановым слоем оболочки. Их свободный конец уже внутриклеточного. Аксиальная нить состоит из сердцевины диаметром 11,3 мкм, окруженной 2 мембранными слоями толщиной 21,5 и 42 микрон. Она прикрепляется крючком к базальному тельцу на противоположном конце периплазматического цилиндра и идет вдоль оси клетки приблизительно до ее центра. Аксиальные нити не перекрываются между собой, как это имеет место у других спирохет. Структура базальных телец жгутиков такая же, как и у других грамотрицательных бактерий. Аксиальные нити обеспечивают движение и сохранение лептоспир своей формы. В культурах лептоспиры нередко образуют клубки, а по мере старения в них появляются дегенирирующие формы с атипичной морфологией.

Прохождение на питательных средах более 20 пассажей ведет к изменению морфологии лептоспир – увеличению длины и количества завитков спирали, а также уменьшению количества электронно-прозрачных протоплазматических включений.

– Культуральные свойства

Лептоспиры являются аэробами, их культивируют на средах слабощелочной реакции (рН 7,2–7,4) при 24 – 28 °С. Культивирование лептоспир связано с определенными трудностями, обусловленными их низкой способностью к размножению в жидких, полужидких и особенно на плотных искусственных питательных средах. На простых питательных средах лептоспиры не растут. Для их культивирования наиболее часто используют жидкие среды Любашенко, Терских, Ферворт – Вольфа, содержащие 5–10% сыворотки крови кроликов, а также среду ГНКИ с альбумином. Максимальное накопление биомассы лептоспир отмечается по истечении 5–7 сут. культивирования, при этом вид питательных сред не изменяется.

Патогенные лептоспиры являются аэробными (часто микроаэрофильными) спирохетами. In vitro при хорошей аэрации, pH 7,2–7,4 и оптимальных условиях инкубирования (температуре 28– 30°C для большей части сероваров и 30–32°С для L.canicola) они культивируются намного лучше, чем другие спирохеты. Границы температуры инкубации посевов, в пределах которых возможен рост лептоспир, составляют 22–37°С.

Для нормального роста они нуждаются в липидах и ненасыщенных жирных кислотах, а также витаминах В1 и В12. Наличие белка в питательной среде для лептоспир не обязательно. Из числа аминокислот только аспарагин оказывает на них стимулирующее действие. Его можно заменить полисорбатами. Обработка твина поливинилпирролидоном устраняет его токсичность для лептоспир. В средах без протеина, но с обработанным этим способом твином урожай лептоспир достигает 108 кл/мл. Неплохой альтернативой твину-80 является пируват натрия, который добавляют в среды в концентрации 100 мкг/мл. Наличие в субстрате сахаров угнетает их рост.

Наиболее интенсивно лептоспиры растут на жидких и полужидких питательных средах с 5–10% сыворотки крови кролика или барана (вместо сыворотки часто применяют сывороточный альбумин). Время развития одной генерации лептоспир в логарифмической фазе составляет 58–68 ч, поэтому максимальный рост наблюдают на 5–10 дн.

Классической питательной средой для лептоспир является среда Ногуши-Веньона. Наибольшее распространение в работе с ними получили жидкие (Уленгута, Ферворта-Вольфа в модификации Тарасова, Кортхофа и др.) и полужидкие (Флетчера и др.) агаровые среды (ПРЛ 10:2).

На жидких средах эти спирохеты растут медленно – максимальный урожай бактерий обычно получают на 5–10 дн культивирования. При микроскопировании препаратов культур в этот период в одном поле зрения (окуляр х10, объектив х40) обычно обнаруживают около 100 подвижных бактерий. Культуры лептоспир в жидких средах бесцветны, не имеют запаха, при бурном росте опалесцируют. Опалесценция лучше видна в проходящем свете при легком встряхивании пробирки.

В полужидких средах на 1,5-2 см ниже поверхности появляется помутнение в виде кольца, интенсивность которого усиливается по мере роста лептоспир. В средах с 1% агара эти бактерии формируют преимущественно заглубленные колонии, контуры которых могут быть четкими или размытыми. Тенденция к заглубленному росту (феномен Дингера), обеспечивающая некоторое ограничение доступа кислорода, свидетельствует о микроаэрофильности лептоспир.

В средах с 2% агара лептоспиры образуют поверхностные колонии, имеющие разную степень прозрачности вплоть до трудно различимых при обычном освещении. Пассирование изолятов in vivo повышает частоту образования такого типа колоний, в то время, как многократные пересевы in vitro способствуют усилению заглубленного роста. Чем чаще делают пересевы, тем быстрее получают пышный рост культур.

Фосфомицин (400 мкг/мл) в сочетании с 5-флуорацилом (100 мкг/мл) при добавлении в среду ингибируют размножение посторонней микрофлоры, не влияя на рост лептоспир. Это позволяет использовать их в селективных средах. В качестве селективных компонентов сред применяют также мочевину, соли кобальта и антимикробные препараты (неомицин, рифампицин, фурацилин, фурагин, налидиксовую кислоту, комбинации рифампицина, полимиксина В, бацитрацина и актидиона.

В процессе хранении музейных штаммов лептоспир их пересевают не реже 1 раза в месяц. Для длительного хранения культуры заливают слоем стерильного вазелинового масла или запаивают в ампулы, что предупреждает испарение среды и изменение ее рН.

Патогенные лептоспиры в процессе культивирования in vitro постепенно утрачивают свою вирулентность. Последнюю часто удается восстановить посредством заражения чувствительных животных, например, молодых морских свинок (36).

– Биохимические свойства

Лептоспиры – хемоорганотрофы с дыхательным типом метаболизма. Повышенная чувствительность к солям синильной кислоты, а также результаты спектроскопических исследований свидетельствуют об участии в их дыхании цитохромной системы. Они оксидазонегативны, но каталазо- и / или пероксидазопозитивны.

Эти микроорганизмы проявляют выраженную аминопептидазную активность при отсутствии протеолитических свойств. По механизмам синтеза изолейцина разные лептоспирs различаются, что дает основание для разделения их на 3 класса.

• Микроорганизмы класса 1 осуществляют это обычным треониновым путем,

• Представители класса 3 – уникальным (пируватным) способом,

• Остальные лептоспиры, вошедшие в класс 2, обоими способами.

Лептоспиры способны утилизировать азот из мочевины, креатинина и саркозина, что протекает под контролем ферментов микроорганизмов – аланин дегидрогеназы, глютамат дегидрогеназы и глютамат пируват трансаминазы.

В клетках лептоспиры обнаружены следующие липидные компоненты: свободные жирные кислоты (41,8%), мажорный фосфолипид (14,8%), фосфатидилэтаноламин (12,9%), эфир холестерина (CE) (9,3%), липофосфатидилэтаноламин (4,9%) и дифосфатидилглицерин (1,1%). Свободные жирные кислоты представлены гексадеканоиковой (26,9%), гексадеценоиковой (15,4%), октадеценоиковой (26,5%) и октадекадиеноиковой (27,4%) кислотами. В состав мажорного фосфолипида входят тетрадекадиеноиковая (53,6%), тетрадекатриеноиковая (14,0%) и октадектадеканоиковая (13,8%) жирные кислоты. Фосфолипид с полиненасыщенными жирными кислотами и 14 атомами углерода в молекуле выявлен только у вирулентных штаммов и отсутствует у авирулентных.

– Биопроба

Лептоспиры могут быть выделены из патологического материала посредством его инокуляции лабораторным животным: кроликам-сосунам, золотистым хомячкам, степным пеструшкам (10–30-дневного возраста) и сусликам, поскольку перечисленные животные в равной степени чувствительны к возбудителям как «желтушных», так и «безжелтушных» лептоспирозов. Другие виды лабораторных животных проявляют неодинаковую чувствительность к разным сероварам лептоспир. Молодых морских свинок и белых мышей (массой 10–14 г.) используют при подозрении на инфекцию серовара icterohaemorrhagiaee.

Гепаринизированную кровь, мочу, спиномозговую жидкость или суспензию гомогената внутренних органов подозреваемой в заражении ЛС собаки, а также тестируемые корма и воду вводят лабораторным животным подкожно, через скарифицированную кожу, закапыванием в глаза, внутрибрюшинно, внутривенно, интракардиально и перорально.

У молодых кроликов, золотистых хомяков и сусликов инфекция «желтушных» и «безжелтушных» лептоспир вызывает развитие таких же клинических и патоморфологических изменений, как и у других видов лабораторных животных при инфекции L.icterohaemorrhagiaee. После инкубационного периода, составляющего в зависимости от патогенности штамма агента от 2 до 7 дн (реже более) температура тела поднимается до 39–41°С, животные отказываются от корма и быстро теряют в весе. У них развивается инъекция сосудов склеры глаз. На 2–5 дн клинической стадии инфекции на фоне резкого истощения температура их тела снижается ниже нормы, появляется желтушность склеры глаз, видимых слизистых оболочек и кожи. Усиленно выпадают волосы. Заболевшие животные в большинстве случаев погибают на 4–12 дн после заражения.

На их вскрытии обнаруживают желтушность тканей, особенно подкожной клетчатки, кровоизлияния во внутренних органах, коже, подкожной клетчатке, которые наиболее интенсивны в паховой и подмышечной областях. Типичны крупноточечные кровоизлияния в легочной ткани, которые выделяясь на общем ишемическом фоне придают легким сходство с крыльями бабочки. В печени находят красновато-желтые некротические очаги. В следствии острого нефрита почки увеличены, надпочечники гиперемированы.
 В течение инкубационного периода и всей клинической стадии инфекции лептоспиры циркулируют в крови животного. С появлением желтухи их обнаруживают во внутренних органах (особенно часто в печени).

В ходе биопробы по рекомендациям ВОЗ за подопытными животными ведут следующие наблюдения:

**1)** определяют массу тела до опыта и ежедневно в течение всего эксперимента;

**2)** у крупных животных (кроликов, морских свинок) дважды в сутки измеряют ректальную температуру. При ее повышении проводят микроскопию на наличие лептоспир брюшного эксудата. Его собирают стерильной пастеровской пипеткой через надрез кожи, сделанный выше пупка (для избежания травмы мочевого пузыря);

**3)** высевают взятую из сердца кровь в пробирки с питательной средой. За выжиывшими животными ведут наблюдение в течение 1 мес, а затем подвергают эутаназии. Высевают на питательные среды гомогенат коркового слоя почек и проводят его микроскопическое исследование с целью обнаружения лептоспир. Кровь из сердца исследуют на наличие специфических антител в РАЛ.

Для обнаружения патогенных лептоспир в воде и иле водоемов пользуются методом Аппельмана-ван Тиля, сущность которого состоит в купании в течение 1 ч морских свинок со скарифицированной на площади в 10–20 см2 кожей брюшка. Кожу скарифицируют после удаления волос нанесением скальпелем продольных и поперечных штрихов. За животными ведут наблюдение по общим правилам. В связи с легкостью клинического течения лептоспироза у морских свинок, вызванного «безжелтушными» штаммами агента, независимо от состояния животных проводят посевы на питательные среды из крови сердца с 4–5 по 20 дн после заражения и микроскопирование брюшного эксудата.

В случае получения сомнительных результатов биопробы, что может иметь место при плохой сохранности поступившего для исследования патологического материала, низкой патогенности тестируемого штамма лептоспир или вследствии низкой заражающей дозы, прибегают к проведению 1–2 последующих пассажей на лабораторных животных.

– Идентификация вирулентных лептоспир

Патогенные и сапрофитные изоляты лептоспир дифференцируют по результатам биопробы, чувствительности к 8-азагуанину, бикарбонату натрия, солям меди, нитрату серебра, кобальту, сулеме и литию, гемолитической и липазной активности, солевой и температурной толерантности, суммарному содержанию гуанина и цитозина в ДНК.

Вирулентность входящих в состав сероваров штаммов лептоспир варьирует в широких пределах. Поэтому чрезвычайно важным представляется поиск маркеров их вирулентности на штаммовом уровне. 1 из таких маркеров может служить белок с мМас 30кД, входящий в состав гликолипопопротеина вирулентных штаммов лептоспир. У авирулентных штаммов вместо него экспрессируется белок с мМас 20 кД (40). Установлено также, что синтез трансмембранного наружного мембранного протеина у авирулентных штаммов происходит значительно интенсивнее, чем у вирулентных штаммов ЛС, а протеины с мМас 45 и 32–34 кД, наоборот, являются маркерами вирулентности этих спирохет.

– Серотипирование

Разделение лептоспир на серогруппы осуществляют по результатам перекрестной реакции агглютинации-лизиса (РАЛ). Деление серогрупп на серовары проводят в тесте адсорбционной агглютинации (РАА), с помощью антисывороток, моноклональных антител, рестрикционного эндонуклеазного анализа и ПЦР.

Моновалентные антисыворотки к серогруппам и сероварам получают иммунизацией кроликов культурами соответствующих штаммов лептоспир. Перекрестную РА ставят со всеми известными серогруппами и сероварами лептоспир. Сравнение величины титров агглютинации-лизиса музейных и тестируемого штаммов лептоспир моновалентными антисыворотками позволяет установить степень родства между ними. В случае, когда тестируемый изолят не проявляет серологического родства с музейными штаммами лептоспир, его определяют как оригинальный серовар.

РАА основана на адсорбции агглютинирующих антител из моновалентных сывороток формалинизированным бактерином музейного и тестируемого штаммов лептоспир. Их выращивают в жидкой среде с полисорбатом-80 и бычьим сывороточным альбумином при температуре 29 °C. Антиген готовят из 4–8-дневных культур. Смесь (1:9) антисыворотки с титром не более 1:3000 и сконцентрированного центрифугированием в 60–70 раз антигена выдерживают при температуре 37 °С в течение 18 ч, центрифугируют (30 мин при 10000 об/мин) и тестируют в РАА. Снижение первоначального титра сыворотки соответствует ее истощению тестируемым штаммом. Перекрестную реакцию с истощенными сыворотками ставят по обычной схеме в ряде возрастающих разведений (1:100, 1:500 и т.д.).

Оценку результатов проводят по следущим критериям:

а) при идентичности музейного и тестируемого штаммов они полностью сорбируют антитела из гомологичной и гетерологичной антисывороток;

б) сравниваемые штаммы относят к разным серотипам, если 10% или более гомологичного титра антител обнаруживается в каждой из 2 (гомологичной и гетерологичной) истощенных сывороток;

в) сравниваемые штаммы относят к разным подтипам одного серотипа, когда 1 антисыворотка после истощения гетерологичным штаммом сохраняет менее 10% гомологичного титра, а другая -10% или более гомологичного титра.

– Серологическая диагностика

Лептоспироз может быть диагностирован также на основании обнаружения высоких титров специфических антител или сероконверсии. Кроме того, серологические тесты применяют для контроля экспериментальной инфекции лабораторных животных и типирования выделенных изолятов лептоспир. Они позволяют поставить диагноз на лептоспироз в вариабельные сроки после начала болезни, определяемые динамикой антител, выявляеых используемым тестом. Специфические агглютинины и лизины обычно появляются в крови не ранее 7–8 дн после начала болезни.

Наличие противолептоспирозных антител в крови ранее прививавшихся и переболевших лептоспирозом собак не позволяет интерпретировать однократно полученные положительные результаты серологического исследования. Поэтому требуется повторное серологическое исследование больного животного через 3–5 дн и более отдаленные сроки. Диагностическим считается установление 4-кратного изменения титра сывороточных антител при тестировании парных проб сыворотки крови. Необходимо иметь в виду, что у подвергавшихся антибиотикотерапии собак процесс образования антител к лептоспирам может быть заторможен по времени и интенсивности. Антитела к лептоспирам персистируют в крови собак в течение многих месяцев, а порой даже лет. У хронически инфицированных лептоспирозом животных титры специфических антител могут снижаться ниже уровня, выявляемого рутинными методами серологической диагностики.

Для серологической диагностики лептоспироза применяют различные варианты РА (РАЛ, макроагглютинации, микроскопической аггглютинации, РЛА), РСК и ЭЛИЗА.

Реакция Агглютинации (РА)

Для постановки РА необходим набор живых культур патогенных для животных сероваров лептоспир, циркулирующих на данной территории. Важнейшими факторами, определяющими специфичность РА, являются чистота и идентичность антигенов. Последнюю контролируют в лабораториях не реже 2 раз в год с применением гипериммунных кроличьих антисывороток или моноклональных антител. Чистоту антигенов лептоспир регулярно проверяют посевами на кровяной агар или тиогликолевый бульон.

Музейные культуры лептоспир можно хранить в жидком азоте при -70 °C или в лиофилизированном виде. Частые пересевы на жидких средах нередко ведут к потере ими антигенности. В таком случае вновь возвращаются к работе с музейным штаммом.

Основными недостатками РА при лептоспирозе являются значительные затраты времени и труда на ее постановку, необходимость применения большого количества антигенов лептоспир разных серогрупп, вариабельность качества используемых живых лептоспирозных антигенов, потенциальную опасность заражения проводящих серологическое исследование специалистов (при использовании в качестве антигена живых культур лептоспир), субъективность оценки результатов, возможность перекрестных реакций сероваров, относящихся к разным серогруппам и недостаточно высокую чувствительность (например, при исследовании животных, выделяющих возбудителя с мочой, но не имеющих выраженного антительного ответа). Последнее связано с динамикой IgM-агглютининов (IgG в РА не выявляют). Разработано несколько описанных ниже вариантов теста.

1. РАЛ

Со времени разработки Мартином и Петтитом в 1918 г. этот тест остается «золотым стандартом» серологической диагностики лептоспироза (ПРЛ 10:3.1). Для получения антигена для РАЛ используют 7–10-дневные культуры лептоспир, выращенные на жидких питательных средах и имеющие пышный рост (не менее 50 лептоспир в поле зрения без спонтанной агглютинации и примесей).

Агглютинация проявляется склеиванием лептоспир в агломераты, размер которых может варьировать от 3–5 бактерий до огромных шаров, занимающих несколько полей зрения микроскопа. Лизис сначала проявляется образованием зернистости у одиночных и агглютинированных лептоспир. Затем бактерии постепенно теряют подвижность и фрагментируются, превращаясь в скопление аморфных зернистых образований. Агглютинация и лизис протекают в первых разведениях сыворотки одновременно, но по мере увеличения разведения сыворотки начинает преобладать агглютинация так, что в конечных разведениях лизис отсутствует).

Специфические агглютинины появляются в крови через 7–10 дн после заражения. У непривитых животных в этот период титр агглютининов обычно невысок (1:100 – 1:200), но в последующем он быстро возрастает до 1:400 и выше, что считают диагностическим уровнем. Обычно к концу второй недели болезни титр антител повышается в 15–40 раз и выше. На этом уровне он сохраняется несколько недель. В последующем отмечают тенденцию постепенного его снижения. На острой стадии инфекции отмечают 4-кратное повышение титра агглютинирующих антител к лептоспир при тестировании парных проб сывороток. Однако при исследовании этим тестом сыворотки хронически больных животных могут быть получены отрицательные результаты из-за низкого титра специфических агглютининов.

При оценке результатов теста необходимо принимать во внимание большую продолжительность персистенции агглютининов у многих переболевших и привитых, а также возможность отсутствия сероконверсии у части инфицированных животных. Стабильные титры антител 1:200 -1:400 выявленные в крови с интервалом в 1–2 нед скорее свидетельствуют о ранее перенесенном заболевании или лептоспироносительстве, чем о текущей инфекции. 4-кратное повышение титра антител считают доказательством последней.

Поскольку на динамику антительного ответа большое влияние оказывает интенсивность репродукции ЛС в организме животного, то первое серологическое исследование необходимо проводить до начала антибиотикотерапии и введения противолептоспирозных антисыворотки /Ig. В случаях неспецифической реактивности пробы сыворотки крови исследуют повторно после обработки 2-меркаптоэтанолом.

В РАЛ может быть тестирована также моча подозреваемых в заболевании лептоспирозомживотных. Однако результаты такого исследования носят ориентировочный характер, поскольку титр специфических антител в моче обычно не превышает 10% титра сывороточных антител.

2. Микроскопическая реакция агглютинации (МРА)

В рутинной лабораторной практике и полевых условиях в настоящее время пользуются не РАЛ, а ее модифицированным вариантом – МРА. Тест проводят в плашках аналогично классической РАЛ, но при учете результатов оценивают лишь степень агглютинации лептоспир (ПРЛ 10:3.1).

С целью снижения риска заражения лабораторных работников разработан также вариант реакции, при постановке которого вместо живых культур лептоспир применяют инактивированные 0,2–0,5% формалина бактерины. При оценке результатов МРА учитывают только агглютинацию, поскольку формалинизированные лептоспир не лизируются сывороткой. Из-за недостаточно высокой чувствительности эта модификация теста не нашла широкого применения.

Вместо набора антигенов разных сероваров патогенных лептоспир при постановке теста может быть использован единственный антиген, которым служит штамм Patoc 1 непатогенного вида L.biflexa. Реакция позволяет лишь установить принадлежность тестируемого изолята к лептоспир.

Испытуемую сыворотку исследуют в разведениях 1:100, 1:500 и 1:2500 (при необходимости разведение готовят 1:100, 1:200, 1:400). Реакцию ставят в пластинах с лунками. Предварительно разведенную ИХН сыворотку разливают по 0,1 мл мерной пипеткой в каждую лунку, начиная с наибольшего разведения сыворотка (ее наименьшей концентрации). Для разлива можно воспользоваться пипеткой Флоринского. Каждое разведение сыворотки вносят в отдельный ряд из 6 или более лунок в зависимости от числа антигенов, используемых для постановки РМА. Каждую из 6 культур лептоспир (антиген) вносят по 0,1 мл в 3 лунки с разведенной сывороткой. В результате конечное разведение сыворотки получается 1:100, 1:500, 1:2500. Пластины осторожно встряхивают, помещают в термостат при температуре 30 С, на 1 час. Одновременно ставят контроли: 0,1 мл культуры + 0,1 мл ИХН (для исключения самоагглютинации лептоспир). Учет реакции проводят микрокопированием в темном поле. Агглютинация проявляется в склеивание лептоспир и образование «паучков», состоящих из нескольких десятков или сотен бактерий. Свободные концы лептоспир сохраняют подвижность. Оценка результатов – по 4-крестовой системе. Диагностически положительной считается агглютинирование лептоспир 4, 3 и 2 креста (при отсутствии агглютинации в контроле) в любом разведении сыворотки. ++++ (четыре креста) – полная агглютинация лептоспир – склеивание лептоспир с образованием скоплений в виде «паучков», состоящего из разного количества лептоспир, +++ (три креста) – 50%, ++ – 25%, (–) минус – агглютинация отсутствует.

3. Реакция макроагглютинации (РМА)

Этот вариант РА проводят с жидкими культурами референтных сероваров лептоспир, в которых рост бактерий проявляется видимой при встряхивании пробирки мутью. После добавления в них разведения (1:10) гомологичной антисыворотки в соотношении 1:5 из агглютинировавших лептоспир быстро образуются хлопья, сохраняющиеся несколько суток и полностью не распадающиеся даже при энергичном встряхивании пробирок.

В модификации Смита-Тулоша (1937 г.) реакцию проводят 3 ч при температуре 37◦С, а затем 30 мин при 55◦С и учитывают результаты с помощью лупы при непрямом освещении.

Старбук и Уорд (1942 г.) предложили проводить тест с формалинизированными культурами ЛС. Обработанные формалином лептоспиры осаждают центрифугированием и окрашивают генцианвиолетом. При постановке реакции смешивают по 1 капле антигенов и тестируемой сыворотки на стеклянной пластинке белого цвета. Ее осторожно покачивают в течение 10 мин и проводят учет результатов. Положительной реакцией считают появление в смеси рыхлых, окрашенных в синий цвет агрегатов.

4. РЛА

По чувствительности РЛА несколько уступает РАЛ, но проще в постановке и позволяет получить результат в более короткий срок. Проводится с помощью латексных частиц, на которых сорбируется антиген лептоспир.

5. РА полимерных частиц с лептоспирозным антигеном.

Этот современный вариант РА пока еще не нашел широкого применения, хотя получил положительные отклики, как медицинских, так и ветеринарных специалистов. В качестве носителя наружных мембранных антигенов лептоспир использованы частицы поли-DL-лактид-полиэтиленгликоля, покрытые антигеном лептоспир. Тест по специфичности соответствует, но несколько уступает по чувствительности РАЛ. Он проще в постановке и позволяет получить результат серологического исследования в течение 3 ч. Кроме того, агглютинины выявляются им в более ранние сроки и в более высоком титре, чем в РА.

6. Реакция Связывания Комплемента (РСК)

РСК редко используют для серологической диагностики лептоспироза собак. Комплементсвязывающие антитела появляются у инфицированных сероварами icterohaemorrhagiaee и canicola животных этого вида через 4 дн после заражения, а через 9–10 нед они исчезают. Тест не позволяет дифференцировать серовары лептоспир.

При постановке РСК большое значение имеет концентрация лептоспир в антигене. Поэтому для приготовления последнего отбирают только те культуры лептоспир, в которых при темнопольном микроскопировании в 1 поле зрения видно не менее 50–100 бактерий. Для получения ориентировочного результата РСК проводят с пулом антигенов разных сероваров (полиантигеном), но при необходимости установления серотипа / серовара лептоспир, вызвавшего инфекцию у животного, для постановки теста пользуются моновалентными антигенами, приготовленными из референтных штаммов, относящихся к определенным серогруппам / сероварам

**8.5 Дифференциальный диагноз**

При постановке диагноза на лептоспироз необходимо проводить дифференциальную диагностику и учитывать, что животные, имеющие в крови антитела, могут погибать от различных инфекционных и неинфекционных болезней.

Лептоспироз крупного и мелкого рогатого скота следует дифференцировать от бруцеллеза, гемоспоридиозов, злокачественной катаральной горячки, кампилобактериоза, трихомоноза, сальмонеллеза, пневмоэнтеритов вирусной этиологии, микотоксикозов и листериоза; нужно также исключить диспепсию, анемию, желтуху, белковый перекорм, гепатит, цистит, гипотонию и атонию преджелудков, гемоглобинурию новорожденных, нефрозы и нефриты незаразной этиологии.

У свиней, кроме бруцеллеза и сальмонеллеза, следует дифференцировать рожу, чуму, дизентерию, белковое, витаминное и минеральное голодания, микозы и микотоксикозы.

У лошадей – инфекционный энцефаломиелит, инфекционную анемию; у собак и пушных зверей – чуму, инфекционный гепатит, сальмонеллез. Дифференциация указанных болезней и патологических состояний проводится на основании комплекса данных.

При микроскопической диагностике лептоспиры необходимо отличать от нитей фибрина, обломков хвостовых частей спермиев, разрушенных эритроцитов, спирилло- и вибрионо-подобных микроорганизмов и особенно интерспир у хряков.

Чтобы поставить окончательный диагноз такого заболевания как лептоспироз, следует исключить заболевание собаки чумкой. Известно, что в отличие от чумы, лептоспироз не обладает высокой контагиозностью (не происходит заражение при непосредственном общении). Чуме подвержены щенки и молодые животные, лептоспирозом в основном болеют собаки, завершившие половые созревание. При лептоспирозе температура тела повышается в начале заболевания, а потом снижается до нормы и ниже. Чума характеризуется высокой температурой на протяжении всего периода заболевания. При чуме не наблюдается язвенный стоматит и желтуха. Дифференцируя лептоспироз от алиментарного отравления, необходимо учитывать, что отравления – явления спорадические, которые исчезают при смене корма и обычном лечении.

При инфекционном гепатите температура тела в начале заболевания нормальная, а затем повышается до 40–41 °С. Носовое зеркало сухое, собаки испытывают сильную жажду. Болеют, в основном, животные, не достигшие годовалого возраста, большинство из них погибает. При гистоисследовании печени обнаруживаются тельца Рубарта. Парвовирусный энтерит также нельзя спутать с лептоспирозом. Им болеют в основном щенки и молодые животные. Наблюдается рвота и понос на протяжении всего заболевания. Даже глоток простой воды может вызвать неукротимую рвоту. Собаки, больные энтеритом, обезвожены, резко худеют. Слизистые рта, склеры глаз сухие, язык обложен серым налетом. Фекалии имеют характерный зловонный запах. Наблюдаются серьезные изменения в миокарде. Нет желтушности.

**Диагноз** на **лептоспироз** считают установленным в любом из следующих случаев:

1. Культура лептоспир выделена из патологического материала или органов лабораторного животного, зараженного исследуемым материалом;

2. Лептоспиры обнаружены при микроскопическом исследовании в крови, или суспензии из органов животных, абортированном плоде, моче, или органах лабораторного животного, павшего после заражения исследуемым материалом;

3. Антитела обнаружены в сыворотке крови более чем у 20% обследованных животных в титре 1:80 у невакцинироваиных – 1:100 и более у вакцинированных в РМА. При выявлении меньшего числа положительных, реакций проводят микроскопию мочи. Пои отрицательных результатах микроскопии мочи повторное исследование сыворотки крови и мочи у ранее исследованных животных проводят через 15–30 дней. Обнаружение лептоспир или антител при повторном исследовании у животных, не имевших их при предыдущем исследовании или нарастании титра антител в пять и более раз. Лептоспироз считают причиной абортов (мертворождения) при обнаружении:

1. Лептоспир в органах (тканях, жидкостях) плода или околоплодных водах.

2. Антител к лептоспирам в сыворотке крови плода в РМА в разведении 1:5 (с антигеном 1:10) и более.

Лептоспироз считают причиной гибели животных при наличии кливических признаков и паталогоанатомических изменений, характерных для лептоспироза, подтвержденных обнаружением лептоспир в крови или паренхиматозных органах (кроме почек).

9. Иммунитет, специфическая профилактика

Переболевшие лептоспирозом животные приобретают стойкий и напряженный иммунитет, длящийся годами. Но после переболевания у части животных с мочей долгое время выделяются лептоспиры, т.е. иммунитет нестерильный. У другой части животных – иммунитет стерильный.

При лептоспирозе развивается как клеточный, так и гуморальный иммунитет. Макрофаги первыми обезвреживают лептоспир, затем вырабатываются и накапливаются антитела – агглютинины, лизины, преципитины, комплемент связывающие. Поэтому сыворотка крови гипериммунизированных животных и реконвалесцентов обладают высокими терапевтическими свойствами.

Еще в 1934 году профессором С.Я. Любашенко была предложена поливалентная гипериммунная сыворотка против лептоспироза. Наиболее хороший терапевтический эффект сыворотка дает при ее применении в начале заболевания. Кроме того, гипериммунная сыворотка и получаемый из нее гамаглобулин, не предотвращают лептоспироносительства и не профилактируют аборты. Пассивный иммунитет, создаваемый данной сывороткой, кратковременный.

В настоящее время для производства гипериммунной сыворотки используют лептоспиры 8-ми серологических вариантов.

Для специфической профилактики (активной иммунизации) лептоспироза в 1939 году С.Я. Любашенко впервые предложил инактивированную карболовой кислотой вакцину. С 1946 по 1958 гг. в нашей стране применяли хинозолевую вакцину, которая содержала антигены трех серологических вариантов лептоспир Pomona, Grippotyphosa и Icterohaemorrhagiae.

Позднее, когда от больных животных были выделены новые серовары лептоспир, вакцину начали готовить из пяти серотипов, добавив к предыдущим серовары Canicola и Tarassovi.

Сейчас готовят несколько видов вакцин с различным набором серотипов. В различных регионах вакцину подбирают исходя из из циркулируемых здесь серотипов лептоспир.

10. Профилактика и меры борьбы

Согласно действующей инструкции о мероприятиях по борьбе с лептоспирозом животных профилактика болезни осуществляется путем проведения комплекса организационно-хозяйственных, ветеринарно-санитарных и специфических мероприятий.

Этот комплект включает в себя:

1. Меры, направленные на недопущение заноса лептоспироза в благополучные хозяйства;

2. Меры, направленные на выявление природных очагов лептоспироза, и контроль благополучия стад;

3. Меры, направленные на недопущение возникновения лептоспироза в благополучных подразделениях хозяйства, расположенного в зоне природного или антропургического очага.

Хозяйство, в котором диагностирован лептоспироз, объявляют неблагополучным. О выявлении больных животных ветеринарный врач хозяйства немедленно сообщает главному ветеринарному врачу района и районной санитарно-эпидемиологической станции, выявляет источник заноса возбудителя инфекции в хозяйство, организует мероприятия по ликвидации болезни.

Главный ветеринарный врач района разрабатывает совместно с руководителями и специалистами таких хозяйств план оздоровительных мероприятий и осуществляет контроль за их выполнением. В плане указывают необходимые диагностические исследования животных, ветеринарно-санитарные и организационно-хозяйственные мероприятия с указанием сроков их проведения, ответственных и контролирующих лиц.

Больных и подозрительных по заболеванию животных – изолируют и лечат; в последующем их подвергают убою.

Остальных, клинически здоровых взрослых животных исследуют в РМА (или РА) положительно реагирующих изолируют, лечат стрептомицином и либо прививают вакциной, либо переводят на откорм с последующей сдачей на убой. Молодняк вакцинируют и выращивают изолировано. Однако молодняк, родившийся до или через месяц после проведения мероприятий, после вакцинации отправляют на откорм.

Ограничения снимают в племенных и пользовательских хозяйствах после установления их благополучия лабораторными исследованиями через 2 месяца после завершения противолептоспирозных мероприятий. При этом исследуют сыворотку крови от ремонтного молодняка, а у крупного рогатого скота различных возрастных групп, хряков, ремонтных и основных свиноматок, кроме того, берут не менее 100 проб м о ч и от каждой тысячи животных.

Повторные исследования животных на лептоспироз в ранее неблагополучных хозяйствах проводят через 6 месяцев после снятия ограничений.

**10.1 Правила применения и хранения вакцин против лептоспироза**

Вакцина против лептоспироза животных лиофилизированная предназначена для вакцинации сельскохозяйственных животных и пушных зверей клеточного содержания. По внешнему виду это сухая пористая масса от желтоватого до серо-белого цвета в виде таблетки. Вакцина, разведенная физраствором или кипяченой водой, представляет собой однородную взвесь с быстровыпадающим незначительным осадком, легко разбивающимся при встряхивании.

Вакцину выпускают в двух вариантах:

– первый вариант – для иммунизации свиней из штаммов лептоспир серогрупп Иктерогеморрагия, Помона, Тарассови;

– второй вариант для иммунизации крупного рогатого скота, овец и коз из штаммов лептоспир серогрупп Гриппотифоза, Помона, Сейро, Тарассови.
Лошадей, пушных зверей и животных других видов иммунизируют вакциной того варианта, в состав которого входят лептоспиры серогрупп, установленные у животных в данном хозяйстве или в данной местности.

1.3. Флаконы (ампулы) с вакциной должны быть плотно закрыты резиновыми пробками и обкатаны металлическими колпачками, ампулы – запаяны. На каждом флаконе (ампуле) должна быть этикетка с указанием наименования биопрепарата и входящих в его состав серогрупп лептоспир, номера серии, номера контроля, срока годности (месяц, год), обозначения ТУ. На коробке с вакциной должна быть этикетка с указанием на ней: наименования и товарного знака предприятия-изготовителя, полного наименования вакцины, перечня серогрупп лептоспир, входящих в вакцину, номера серии и номера контроля, количества флаконов (ампул) в коробке, объема вакцины во флаконе (ампуле), количества растворителя для одного флакона (ампулы), дозы для животных, даты изготовления (месяц, год), срока годности, условий хранения и обозначения ТУ.

1.4. Вакцина пригодна для применения в течение 12 месяцев со дня изготовления при условии хранения в сухом темном месте при температуре не выше 20С.

1.5. Флаконы (ампулы) с вакциной, содержащие плесень, посторонние механические примеси, следы оттаивания, с нарушенной укупоркой, а также остатки вакцины, не использованные в течение 4 часов после растворения утилизируют.

**10.2 Биологические свойства препаратов**

2.1. Вакцина изготавливается из биологически активных клонированных штаммов лептоспир пяти серологических групп.

2.2. Вакцина при однократном внутримышечном введении вызывает формирование активного иммунитета против лептоспироза. Вакцинация профилактирует клинические проявления лептоспироза, включая аборты, лептоспироносительство и образование интенсивного очага лептоспироза.

2.3. Иммунитет у животных наступает через 14–20 дней после введения вакцины и продолжается у телят, ягнят свиней всех возрастных групп, молодняка, пушных зверей – до 6 месяцев, а у овец, коз и пушных зверей, вакцинированных в возрасте 6 месяцев и старше, крупного рогатого скота и лошадей, вакцинированных в возрасте 12 месяцев и старше – до года.

**10.3 Порядок применения вакцины**

3.1. Вакцину применяют в неблагополучных по лептоспирозу хозяйствах; в откормочных хозяйствах, где поголовье комплектуют без обследования на лептоспироз; в угрожаемых хозяйствах; при выпасании животных в зоне природного очага лептоспироза; при выявлении в хозяйстве животных, сыворотка крови которых реагирует на лептоспироз в реакции микроагглютинации (РМА); в районах с отгонным животноводством.

3.2. Крупный рогатый скот, верблюдов, лошадей, ослов, мулов вакцинируют в возрасте от 1,5 месяцев и старше, а животных других видов – одного месяца и старше.

3.3. Вакцинации не подлежат животные в последний месяц беременности и в первую неделю после родов, а также в течение 7 дней после дегельминтизации и 14 дней после обработки хлор-фосфорсодержащими препаратами, этих животных вакцинируют по истечении указанных сроков.

3.4. Сухую вакцину перед применением растворяют физиологическим раствором или охлажденной кипяченой водой при температуре 30–35о С в соотношении 1:4 на 4 см2 сухой вакцины 16 см2 растворителя, на 5 см2 сухой вакцины – 20 см2 растворителя, на 10 см2 сухой вакцины – 40 см2 растворителя. Соблюдая правила асептики, флаконы (ампулы) вскрывают и вносят в них растворитель. Растворившуюся вакцину тщательно встряхивают и используют не больше 4 часов после растворения.

Перед применением и в процессе применения флаконы (ампулы) с вакциной необходимо постоянно встряхивать для поддержания однородной взвеси, исключая выпадение антигена в осадок.

3.5. Вакцину вводят внутримышечно через иглу, диаметром не менее 1,0 мм, пропускающую мелкие хлопья, однократно (за исключением поросят в возрасте от 1 до з месяцев, которых вакцинируют двухкратно и ревакцинируют через 3 месяца

3.6. В целях профилактики абортов лептоспирозной этиологии сельскохозяйственных животных вакцинируют за месяц до покрытия или в первой трети беременности.

3.7. С целью образования колострального иммунитета у молодняка рекомендуется вакцинировать супоросных свиноматок за 35–75 дней до опороса, суягных овец – за 1,5 – 2 месяца до окота, стельных коров – за 1,5 – 3 месяца до отела.

Продолжительность колострального иммунитета у поросят и ягнят до 1,5, у телят до 2,5 месяцев. Полученных от вакцинированных матерей поросят и ягнят

Чтобы не допустить заболевания животных лептоспирозом, собственники и владельцы скота, ветеринарные специалисты обязаны:

– осуществлять контроль за клиническим состоянием животных, учитывать число абортов и при подозрении на лептоспироз отбирать патматериал для лабораторных исследований; комплектование племенных хозяйств (ферм), предприятий, станций искусственного осеменения проводить из благополучных по лептоспирозу хозяйств; исследовать всех поступающих в хозяйство животных в период 30-дневного карантина на лептоспироз в РМА в разведении сыворотки 1: 25. Свиней, вводимых в хозяйство для племенных целей, обследуют на лептоспироносительство путем микроскопии мочи независимо от результатов серологических исследований (откормочные хозяйства разрешается комплектовать клинически здоровыми животными без обследования на лептоспироз, но с обязательной вакцинацией их против лептоспироза в период карантинирования);

– не допускать контакта животных со скотом неблагополучных по лептоспирозу хозяйств (ферм), населенных пунктов, на пастбище, в местах водопоя и т.д.; не выпасать невакцинированных животных на территории природных очагов лептоспироза; не устраивать летних лагерей для животных на берегах открытых водоемов; систематически уничтожать грызунов в животноводческих помещениях, на территории ферм, в местах хранения кормов и т.п.

В целях своевременного выявления лептоспироза проводят исследование сыворотки крови животных в реакции микроагглютинации (РМА): на племпредприятиях, станциях (пунктах) искусственного осеменения и в племенных хозяйствах (фермах) всех производителей 2 раза в год; свиней, крупный и мелкий рогатый скот, лошадей – перед вводом (ввозом) и выводом для племенных и пользовательных целей (за исключением животных на откорм) поголовно; во всех случаях при подозрении на лептоспироз.

11. Лечение

В качестве специфического лечебного средства применяют гипериммунные и поливалентные противолептоспирозные сыворотки, которые вводят подкожно (или внутривенно) 1–2 раза.

Из этиотропных средств применяют антибиотики тетрациклинового ряда и стрептомицин. Последний вводят внутримышечно 10–12 тыс. ЕД/кг 2 раза в день, 4–5 дней подряд.

Для симптоматического лечения применяют синтомицин – внутрь 0,03 г./кг массы животного по 3 раза в день, 4 дня подряд; внутривенно 40%-ную глюкозу – до 500 мл взрослым и 200 мл телятам; уротропин с водой – 10,0 – коровам; кофеин, марганцевокислый калий (1:1000); слабительные (глауберовая соль, английская соль); ихтиоловая, борная мазь (наружно). Диета, поение в волю, покой.

При остром и подостром течении лептоспироза применяют сыворотку поливалентную гипериммунную против лептоспироза животных, канамицин, антибиотики тетрациклинового ряда. Для санации лептоспироносителей используют дитетрациклин. При осложнениях после абортов лептоспирозной этиологии проводят симптоматическое лечение. Патогененическая терапия направлена на детоксикацию и лечение осложнений. У мелких домашних животных применяют плазмаферез, гемосорбцию, экстракорпоральный диализ.

12. Меры по охране людей от заражения лептоспирозом

Лептоспироз человека – остро протекающая инфекционная болезнь, характеризующаяся лихорадкой, симптомами общей интоксикации, поражением почек, печени, нервной системы. В тяжелых случаях наблюдают желтуху, геморрагический синдром, острую почечную недостаточность и менингит.

Люди в большинстве случаев заражаются при купании и использовании для хозяйственных и бытовых нужд инфицированной воды из открытых водоемов; при употреблении продуктов питания, инфицированных грызунами, а также сырого молока от больных коров. Заболевания могут иметь профессиональный характер. Профилактика лептоспироза у людей основывается на комплексе плановых медико- и ветеринарно-санитарных мероприятий: уничтожении или лечении животных-лептоспироносителей; разрыве путей передачи возбудителей инфекции (охрана водоема и водоисточников, пищевых продуктов от инфицирования); защите людей, находящихся в эпизоотическом очаге.

Список литературы

1. Ветеринарное законодательство. Т. 2,3,4. Под ред. А.Д. Третьякова. М., «Колос», 1972 г.

2. Клиническая иммунология Земсков В.М., Земсков А, М., Караулов А.В.: под ред. А.М. Земскова. – М., 2008. – 432 с.: ил.

3. Клиническая микробиология полости рта Учебное пособие: М.Г. Чеснокова, Н.В. Рудаков. Омск, 2009. – 232 с.

4. Микробиология и иммунология / Под ред. А.А. Воробьева. – М.: Медицина, 1999 и др. годы издания.

5. Медицинская микробиология / Под ред. В.И. Покровского, О.К. Поздеева. – М.: ГЭОТАР Медицина, 1999 и др. годы издания.

6. Медицинская микробиология: учеб. пособие для студентов мед. вузов Поздеев О.К. / О.К. Поздеев; ред. В.И. Покровский; УМО по мед. и фармац. образованию вузов России. – 3-е изд., стер. – М.: Гэотар-Медиа, 2005. – 768 с.

7. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: учеб. пособие для мед. вузов Коротяев А.И. / А.И. Коротяев, С.А. Бабичев. – 3-е изд., испр. и доп. – СПб.: СпецЛит, 2002. – 580 с.

8. Наглядная иммунология Плейфейер Дж., Чейн Б.М.: уч. Пособие / пер. С англ. Под ред. А.В. Караулова. – 2-е изд. – М., 2008. – 120 с.

9. Организация и экономика ветеринарного дела. Под ред. А.Д. Третьякова. М., «Агропромиздат», 1984 г.

10. Основы клинической иммунологии Чепель Э., Хейни М., Мисбах С.: уч. Пособие / пер. С англ. Под ред. Р.М. Хаитова. – М., 2008. – 416 с.

11. Оценка и коррекция иммунного статуса Никулин Б.А.: уч. Пособие. – М., 2007. – 376 с.

12. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии. Под ред. В.В. Теца. – М.: «Медицина», 2002.

13. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии. – Томск, 2003 и др. издания для практических занятий (под ред. Теца, Борисова и др.).

14. Эпизоотология и инфекционные болезни. Под ред. А.А. Конопаткина. М., «Колос», 1993 г.