

Ж. Р. АРЗУМАНЯН

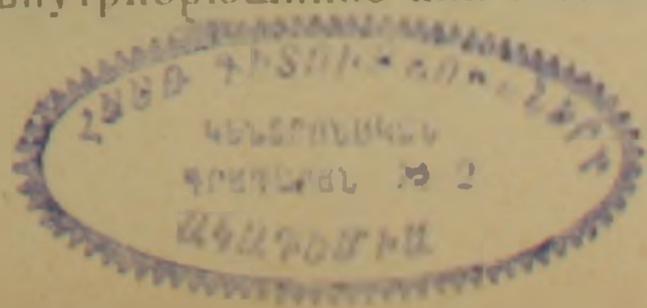
НЕКОТОРЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ВЫДЕЛЕНИЮ И КУЛЬТИВИРОВАНИЮ ЛЕПТОСПИР

Лептоспироз, или инфекционная желтуха—остро инфекционное заболевание. Им заболевают дикие и синантропные грызуны, домашние и промысловые животные, а также человек. Вызываются лептоспирозы различными видами своеобразных спирохет, объединенных в род лептоспир. Впервые это заболевание описали А. Вейль (1886 г.) и Н. П. Васильев (1888 г.). В Советском Союзе первые сообщения о лептоспирозе у крупного рогатого скота, овец, лошадей, лисиц и собак относятся к 1934—1939 гг. Иктерогемоглобинурия (инфекционная желтуха) крупного и мелкого рогатого скота в Армении впервые описана Г. А. Шакарян, А. Агароняном [7] и М. М. Мамиконяном [5]. Наиболее обстоятельные же исследования по изучению лептоспироза сельскохозяйственных животных проведены проф. В. С. Газаряном. Еще в 1942—1944 гг. ему удалось выделить культуры лептоспир из почек коровы и крови больных телят и ягнят [1].

В настоящее время лептоспироз сельскохозяйственных животных наблюдается довольно часто и причиняет определенный ущерб животноводству. В Армении это заболевание за последние годы зарегистрировано среди мелкого и крупного рогатого скота и в отдельных случаях среди свиней.

При клиническом осмотре больного бычка, доставленного в октябре 1963 г. из совхоза Воротан Сисианского района, обнаружена: желтушность всех видимых слизистых оболочек и кровавая моча, температура тела 40,5. Через несколько дней у него появились некротические участки на коже в области спины, шеи и ушей. Сыворотка крови по реакции микроагглютинации-лизиса при исследовании дала положительную реакцию с лептоспирами серотипа «гриппотифоза». При микроскопическом исследовании кровавой мочи, вначале ни одной лептоспиры мы не обнаружили. Через 2—3 дня цвет мочи стал нормальным и при ее исследовании в темном поле зрения микроскопа обнаруживались в большом количестве лептоспиры, которые, однако, в моче в течение нескольких часов погибали.

Наши многочисленные попытки получить культуры посевом непосредственно из мочи этого животного успехом не увенчались. Поэтому для выделения культуры лептоспир мы прибегли к помощи биологического метода, т. е. заражения 15—20-дневных крольчат. От указанного бычка собирали мочу в пробирки и после обнаружения в ней лептоспир брали 2 мл ее и вводили крольчонок внутрибрюшинно или подкожно. В



течение 4—5 дней у зараженных крольчат мы никаких отклонений от нормы не обнаружили. На 5 день эти крольчата были забиты и сейчас же, непосредственно из внутренних органов (сердце, печень, селезенка, почки), производились высевы на искусственные питательные среды Уленгута и Терских. Одновременно посевы на такие же среды производились суспензией из внутренних органов этих же крольчат. Засеянные пробирки инкубировались в термостате при 26—28°C. Рост лептоспир начался с 7—10 дня инкубирования.

Выделенные нами лептоспиры оказались патогенными для молодых крольчат. Часть зараженных крольчат болела тяжело (повышение температуры тела до 40°C, желтушность слизистых оболочек, конъюнктивит, кровавая моча и пр.). Они пали на 7—12-й день и при вскрытии обнаружена желтушность всех органов и тканей, геморрагическое воспаление желудочно-кишечного тракта и пр.

Наши данные показали, что для посевов лучше всего пользоваться пастеровскими пипетками и посев производить непосредственно из внутренних органов крольчат. Для этого пипетку мы ломали ближе к основанию и вводили в толщу ткани данного органа, ее концом размозжали ткань, насасывали в пипетку и переносили в питательную среду. Рост лептоспир чаще всего наблюдался при таком методе посева. Напротив при посеве из растертой в фарфоровых ступках суспензии из органов тех же крольчат либо среды загрязнялись, либо рост лептоспир отсутствовал. В большинстве случаев рост лептоспир мы наблюдали в посевах из почек и сердца. Данный штамм лептоспир, названный «СВ», был подвергнут исследованию по реакции микроагглютинации лизиса со стандартной позитивной лептоспирозной сывороткой серологического типа «гриппотифоза» и получен положительный результат.

В дальнейшей работе мы испытали возможность заражения этим штаммом трехдневных крольчат для воспроизведения у них лептоспироза и выделения чистых культур лептоспир. Трехдневные крольчата были заражены под одной маткой—всего 9 гол. Из них 3 гол. подкожно введена культура «СВ» в дозе по 1 мл, 3 гол. та же культура внутрибрюшинно в той же дозе, остальные 3 крольчонка оставлены для контроля. Результаты опыта отражены в таблице.

Из таблицы видно, что при внутрибрюшинном заражении смерть крольчат наступает через 48—51 час., в то время как крольчата, зараженные подкожным методом, пали через 69—74 часа. Все контрольные крольчата остались в живых. Почти во всех случаях от павших крольчат удалось выделить исходную культуру лептоспир, причем последние были свободны от посторонней микрофлоры, в особенности в тех пробирках, в которых посев был сделан из крови сердца крольчат. В аналогичных опытах заражение трехдневных крольчат культурами лептоспир типа *L. icterohaemorrhagiae* и *L. romona* были получены подобные же данные (таблица). При вскрытии трупов павших крольчат обнаруживалась различной интенсивности желтушность слизистых и серозных оболочек, кожи и подкожной клетчатки. Печень увеличена в объеме, темно-корич-

Таблица

Результаты заражения трехдневных крольчат штаммами лептоспир
L. grippotyphosa, *L. icterohaemorrhagiae* и *L. pomona*

Наименование типов и штаммов лептоспир	№ крольчат	Метод заражения	Доза культур (в мл)	Пало через	Посевы из органов павших крольчат. (Дни появления роста лептоспир)
<i>L. grippotyphosa</i> , штамм „СВ“	1	подкожно	1	69 час.	на 10-й день
	2		1	70 .	. 9-й .
	3		1	74 .	. 7-й .
	4	внутрибрюшинно	1	48 час.	на 9-й день
	5		1	50 .	. 7-й .
	6		1	51 .	. 11-й .
	7	контроль	—	жив.	—
	8		—	.	—
	9		—	.	—
<i>L. icterohaemorrhagiae</i> , штамм „Белоусов“	10	подкожно	1	72	на 8-й день
	11		1	74	. 12-й .
	12		1	80	. 10-й .
	13	внутрибрюшинно	1	49	на 13-й день
	14		1	52	. 15-й .
	15		1	54	. 9-й .
	16	контроль	—	жив	—
	17		—	.	—
	18		—	.	—
<i>L. pomona</i> , штамм „Виноградов“	19	подкожно	1	76	на 9-й день
	20		1	78	. 8-й .
	21		1	83	. 11-й .
	22	внутрибрюшинно	1	52	на 8-й день
	23		1	56	. 12-й .
	24		1	50	. 10-й .
	25	контроль	—	жив.	—
	26		—	.	—
	27		—	.	—

невого цвета, почки дряблы, желтоватого цвета. Слизистая желудочно-кишечного тракта геморрагически воспалена.

В тех случаях, когда возникала необходимость очищать культуры лептоспир от посторонней микрофлоры, мы заражали трехдневных крольчат и забивали их через 48—72 часа и из крови сердца пастеровской пипеткой делали посевы. Во всех этих случаях мы получали чистые, свободные от посторонней микрофлоры, культуры лептоспир.

Как известно, для поддержания культур лептоспир в лабораторных условиях, а также для посевов из патологического материала от больных животных, обычно применяются жидкие питательные среды—Любашенко, Ферворт-Вольфа, Терских, Уленгута и др. Неотъемлемой частью этих сред является сыворотка крови кролика или овцы, добавляемая в количестве 5—10 и даже 30%. Рост лептоспир обычно появляется с 5—7 дня, а иногда лишь через 20—30 дней и позже. Однако культиви-

рование лептоспир связано с большими трудностями, что и вынуждает продолжать поиски новых питательных сред. По мнению некоторых авторов [2, 8], скудный рост лептоспир в посевах объясняется большим содержанием сыворотки в средах (5—10%). Кроме того, изготовление сред, содержащих большое количество сыворотки, связано с определенными затруднениями. Учитывая все это, при изготовлении искусственных питательных сред мы добавляли 1% сыворотки; полученная при этом от овцы сыворотка добавлялась в среды после их автоклавирования.

Помимо среды Уленгута и Терских, в качестве питательной среды была использована дистиллированная вода с сывороткой крови или среда № 199, изготовленная Московским научно-исследовательским институтом вирусных препаратов и широко применяемая для выращивания культуры тканей. Среда готовилась следующим образом:

1. Дистиллированная вода разливалась в чистые пробирки в количестве по 15 мл и автоклавировалась. Затем в каждую пробирку добавлялось по 0,2 мл сыворотки крови овцы. После этого среды в пробирках двукратно инактивировались в водяной бане при 60°C в течение 30 мин., с 24-часовым промежутком.

2. К стерильной дистиллированной воде по 15 мл в пробирке добавлялось по 0,2 мл среды № 199.

В опытах были использованы 18 штаммов лептоспир, относящихся к 9 серологическим типам: *L. pomona*—3 штамма, *L. icterohaemorrhagiae*—2, *L. grippotyphosa*—5, *L. canicola*—2, *L. tarassowi*—1, *L. kazachstanika*—2, *L. hebdomadis*—1, *L. bataviae*—1 и *L. saprofiti*—1 штамм. Посевы выращивались в термостате при 26—28°C.

Как показали наши наблюдения, во всех использованных средах наблюдался рост лептоспир. В использованных же нами в качестве питательных сред—дистиллированной воде с добавлением среды № 199 и в среде, состоящей из дистиллированной воды с 1% овечьей сывороткой, не только ускорялся рост лептоспир (рост появлялся на 3—4 день), но и обеспечивалась густота культуры почти во всех пробирках (до 200 и более особей в поле зрения микроскопа). В то же время в других использованных нами средах (Уленгута и др.) в пробирках на 6—7 день количество лептоспир в поле зрения микроскопа не превышало 100—150 особей. Эти данные показывают, что наиболее интенсивный рост лептоспир наступает в тех пробирках, в которых содержалось около 15 мл питательной среды. Максимум роста лептоспир наблюдается на 10—12 день.

В ы в о д ы

1. Выделенный нами лептоспирозный штамм отнесен к серологическому типу «гриппотифоза» и назван «СВ».

2. Для выделения культур лептоспир следует брать 15—20-дневных крольчат и их можно заражать внутрибрюшинным или подкожным ме-

тодом—мочой от больного лептоспирозом животного. Посевы на искусственные питательные среды проводить непосредственно из внутренних органов этих крольчат, забитых не позже 4—5 дня после их заражения.

3. Для воспроизведения экспериментального лептоспироза и очищения загрязненных культур лептоспир от посторонней микрофлоры, мы считаем целесообразным использовать трехдневных крольчат.

4. Использованные в нашей работе среды: а) состоящая из стерилизованной дистиллированной воды с 1% сывороткой крови овцы, и б) состоящая также из дистиллированной воды со средой № 199 (из расчета по 0,2 мл на 15 мл дистиллированной воды) оказались пригодными для выращивания лептоспир.

Армянский институт животноводства
и ветеринарии

Поступило 26.IV 1964 г.

Ժ. Ռ. ԱՐՁՈՒՄԱՆՅԱՆ

ԼԵՊՏՈՍՊԻՐՆԵՐԻ ԱՌԱՆՁՆԱՑՄԱՆ ԵՎ ԱՃԵՑՄԱՆ
ՄԻ ՔԱՆԻ ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

Ա մ փ ո փ ու մ

Քյուղատնտեսական կենդանիների լեպտոսպիրոզը (վարակիչ դեղնախտը) հաճախ նկատվող հիվանդություններից մեկն է, որը բավական մանրամասն ուսումնասիրվել է ՍՍՌՄ-ում, այդ թվում նաև Հայաստանում, և մշակվել են նրա դեմ պայքարի ու պրոֆիլակտիկայի էֆեկտիվ միջոցառումները: Չնայած դրան, դեռ շատ հարցեր, հատկապես նրա հարուցիչի առանձնահատկություններին վերաբերող, դեռ լրիվ չեն պարզաբանվել:

Մենք ուսումնասիրել ենք դեղնախտով հիվանդ կենդանու մեզից լեպտոսպիրների կուլտուրա ստանալու նպատակահարմարությունը: Դրա համար լեպտոսպիրոզով հիվանդ հորթի մեզով վարակել ենք ճագարի 15—20 օրական ձագեր, այն ներարկելով մաշկի տակ կամ որովայնի խոռոչը: 4—5 օրից հետո ճագարի այդ ձագերը սպանել ենք և անմիջապես ցանք կատարել արհեստական սննդամիջավայրում: Թերմոստատում 27—28° ջերմության պայմաններում 7—10 օր պահելուց հետո ստացել ենք լեպտոսպիրների զուտ կուլտուրա: Բացի դրանից, կողմնակի միկրոբներով կեղտոտված կուլտուրաները մաքրելու համար փորձեր ենք կատարել ճագարի երեք օրական ձագերի վրա, որոնք միանգամայն պիտանի էին որպես փորձակենդանիներ:

Վարակումից 48—72 ժամ հետո նրանց սրտի արյունից ցանք կատարելով՝ ստացել ենք լեպտոսպիրների զուտ կուլտուրա: Որպես արհեստական սննդամիջավայր մենք օգտագործել ենք՝ ա) թորած ջուր՝ 1%-անոց ոչխարի արյան շիճուկի հետ, և բ) նույնպես թորած ջուր № 199 սննդամիջավայրի հետ (որն օգտագործվում է հյուսվածքային կուլտուրա աճեցնելու համար) և ստացել լեպտոսպիրների բավարար աճ:

Մեր հետազոտությունները հիմք են տալիս մեզ անելու հետևյալ եզրակացությունները.

1. Լեպտոսպիրոզով հիվանդ կենդանուց մեր անջատած լեպտոսպիրների կուլտուրան պատկանում է «գրիպսյուտիֆոզա» սերոլոգիական տիպին, որն անվանված է «ՍՎ»:

2. Լեպտոսպիրոզի կուլտուրա ստանալու համար պետք է վերցնել ճագարի 15—20 օրական հասակի ձագեր և նրանց վարակել հիվանդ կենդանու մեզով, այն ներարկելով մաշկի տակ կամ որովայնի խոռոչը: Վարակումից 4—5 օր հետո ճագարի ձագերը պետք է սպանել և անմիջապես ցանք կատարել նրանց ներքին օրգաններից:

3. Փորձնական լեպտոսպիրոզ առաջացնելու և կողմնակի միկրոբներով լեպտոսպիրների կեղտոտված կուլտուրաները մաքրելու նպատակով, մենք նրպատակահարմար ենք գտնում օգտագործել ճագարի երեք օրական ձագեր:

4. Մեր աշխատանքների ընթացքում օգտագործված արհեստական սննդամիջավայրերը՝ ա) ստերիլացրած թորած ջուրը, որին ավելացվում է ոչխարի արյան շիճուկ 1% և բ) նույնպիսի թորած ջուրը № 199 միջավայրի հետ (15 մլ թորած ջրին 0,2 մլ միջավայրի հաշվով) պիտանի էին լեպտոսպիրների աճեցման համար:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Газарян В. С. Лептоспирозы крупного и мелкого рогатого скота в Армянской ССР. Доктор. диссерт. Ереван, 1947.
2. Киктетко В. С. Лептоспирозы человека. М., 1954.
3. Любашенко С. Я. Лептоспироз животных (инфекционная желтуха). Изд-во Междунар. книга, 1948.
4. Любашенко С. Я., Новикова Л. С. ЖМЭИ, 8, 1950.
5. Мамиконян М. М. Тр. Армянского НИВИ, вып. II, 1937.
6. Мусаев М. А. Лептоспироз крупного рогатого скота. Сельхозгиз, 1959.
7. Шакарян Г. А., Агаронян А. Журн. Сов. ветеринария, 2, 1937.
8. Шитов К. А. ЖМЭИ, 3, 1954.