

Глава 3.1.12.

ЛЕПТОСПИРОЗ

РЕЗЮМЕ

Определение болезни: *Лептоспироз – трансмиссивная болезнь животных и человека, возникающая в результате заражения любым из возбудителей рода Leptospira.*

Описание болезни: *Острый лептоспироз необходимо подозревать в следующих случаях: резкое появление агалактии (у взрослых дойных коров и овец), желтуха и гемоглобинурия, особенно у молодых животных, менингит и острая почечная недостаточность или желтуха у собак. Хронический лептоспироз необходимо рассматривать в следующих случаях: аборт, рождение мертвого плода, рождение слабого потомства (возможно, недоношенного); бесплодие; хроническая почечная недостаточность и хронический острый гепатит у собак, а также в случаях периодической офтальмии у лошадей.*

Лабораторная диагностика лептоспироза может быть комплексной и включать исследования, которые делятся на две группы. Одна группа исследований предназначена для обнаружения антител к лептоспирам, а другая группа – для обнаружения лептоспир, антигенов лептоспир или нуклеиновой кислоты организмов в тканях животных или жидкостях организма. Выбор определенного режима исследования зависит от его цели (например, наблюдения за стадом или тестирование отдельного животного) и от того, какие исследования или опыт их применения доступны в данном регионе.

Идентификация возбудителя: *Выделение или демонстрация лептоспир:*

- a) в нескольких внутренних органах (таких как печень, легкие, головной мозг и почки) и жидкостях организма (кровь, молоко, спинномозговая жидкость, жидкость из грудной клетки и брюшной полости) у клинически инфицированных животных позволяет определенно диагностировать наличие острой клинической формы болезни или – в случае с исследованием плода – хронической формы болезни его матери.*
- b) в почках, моче или половых путях животных без клинических признаков является диагностическим только в отношении хронического статуса носительства.*

Выделение лептоспир из патологического материала и идентификация изолятов требует много времени и является задачей специализированных референтных лабораторий. Выделение лептоспир у носителей инфекции в почках с последующим типированием штамма является очень важной и полезной задачей для эпизоотического исследования с целью определения, какие серовары присутствуют в данной группе животных, у данного вида животных или в географическом регионе.

В большинстве ситуаций лаборатории предпочитают проводить обнаружение лептоспир с помощью иммунохимических тестов (иммунофлуоресценция и иммуногистохимия). Однако эффективность этих тестов зависит от количества организмов, присутствующих в ткани, поэтому таким методам исследования не хватает чувствительности. Кроме случаев применения специально приготовленных реактивов иммунохимические тесты не способны идентифицировать серовар возбудителя, поэтому интерпретацию результатов необходимо проводить в совокупности с результатами серологических исследований. Реактивы для иммунофлуоресценции лучше всего готовить с использованием сывороток с высокими титрами антилептоспирозного IgG, которых нет в продаже. Для иммуногистохимии можно использовать кроличью сыворотку для титрования лептоспир, её можно получить в референтных лабораториях по лептоспирозу.

Генетический материал лептоспир можно обнаружить в тканях или жидкостях организма с помощью разнообразных анализов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени или в традиционном формате. ПЦР-анализы обладают высокой чувствительностью, но для данных методов большую роль играют процедуры контроля качества и обработка образцов для ПЦР, которые необходимо адаптировать к ткани, жидкости или виду животного. Как и иммунохимические тесты, большинство ПЦР-анализов не могут определить серовар возбудителя, хотя некоторые позволяют идентифицировать его вид.

Серологические тесты. Серологическое тестирование – наиболее широко распространенный способ диагностики лептоспироза, при этом реакция микроагглютинации (МАТ) является стандартным серологическим тестом. Антигены, отобранные для использования в реакции микроагглютинации, должны включать репрезентативные штаммы серогрупп, циркулирующих в данном конкретном регионе, а также штаммы, встречающиеся у данного хозяина в других регионах.

Реакция микроагглютинации используется для тестирования отдельных животных и стад. В качестве метода исследования отдельного животного реакция микроагглютинации очень полезна для диагностики острой инфекции: диагностическим является четырехкратное повышение титра антител в парных образцах сыворотки от животных с острой формой болезни и переболевших животных. Для оценки стада следует протестировать, как минимум, десять животных или 10% стада, в зависимости от того, какое значение выше, и задокументировать историю вакцинации животных.

Реакция микроагглютинации имеет определенные ограничения при диагностике хронической инфекции у отдельных животных и при диагностике эндемичных инфекций в стадах. Инфицированные животные могут abortировать или являться носителями инфекции в почках/половых путях, но при этом титры антител в реакции микроагглютинации у них могут быть ниже повсеместно принятого минимального значимого титра в 1/100 (конечное разведение).

Для обнаружения антител к лептоспирам также можно использовать твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). Разработано множество методов, которые используют, главным образом, для обнаружения недавних инфекций, скрининга экспериментальных животных, используемых в исследованиях с контрольным заражением, а также для схем здоровья для оценки уровня заражения сероваром Hardjo у КРС – в пробах крови или молока от отдельных животных или в сборном молоке в цистерне. Животные, которые были вакцинированы против соответствующего

серовара, могут быть положительными в некоторых ИФА-тестах, усложняя, таким образом, интерпретацию результатов.

Требования к вакцинам: Ветеринарные вакцины чаще всего представляют собой суспензии одного или нескольких сероваров *Leptospira*, инактивированных таким способом, который позволяет сохранить иммуногенную активность. Хотя в настоящее время проводятся исследования ряда экспериментальных вакцин, основанных на клеточных экстрактах, доступные коммерческие вакцины представляют собой препараты на основе цельных клеток. Лептоспиры выращивают в подходящей культуральной среде, часто содержащей сыворотку или сывороточные белки, которые нужно удалять из готовых продуктов. В состав вакцины могут входить подходящие адьюванты.

А.ВВЕДЕНИЕ

Определение болезни: Лептоспироз – трансмиссивная болезнь животных и человека, возникающая в результате заражения любым из возбудителей рода *Leptospira*.

Возбудитель: Все патогенные лептоспиры ранее классифицировали как членов вида *Leptospira interrogans*, однако в последнее время данный род подвергся определенному преобразованию. Род *Leptospira* состоит из 20 видов и включает 9 патогенных, 5 промежуточных и 6 сапрофитных видов (Picardaeu, 2013). Большинство патогенных сероваров принадлежат к трем видам, которые распространены по всему миру: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* и *L. kirschneri*. Другие патогенные виды: *L. alexanderi*, *L. alstonii*, *L. kmetyi*, *L. noguchi*, *L. santarosai* и *L. weilii*. Определение вида основано на гомологии ДНК, которую определяют методом ДНК-ДНК гибридизации, но ввиду технических трудностей вместо этого обычно используют методы, основанные на ПЦР (Ahmed et. al., 2012a; 2012b). Существует более 300 отдельных сероваров лептоспир, которые распределены по 25 серогруппам (Picardeau, 2013).

В теории, заражению паразитической *Leptospira* подвержен любой вид животного. К счастью, только небольшое количество сероваров становятся эндемичными в отдельно взятом регионе или стране. Кроме того, лептоспироз – это заболевание с тенденцией к созданию природных резервуаров, при этом каждый серовар как правило тяготеет к определенному хозяину. Следовательно, в одном регионе определенный вид домашнего животного может быть инфицирован сероварами, характерными для данного вида животных, или сероварами, циркулирующими среди других видов животных в данном регионе. Сравнительная важность таких случайных заражений определяется вероятностью того, что преобладающие социальные факторы, а также факторы, имеющие отношение к содержанию животных или условиям окружающей среды, создадут условия для контакта и передачи лептоспир от других видов животных. Примером инфекции, поддерживаемой определенным хозяином, считается заражение КРС сероваром Hardjo. Благодаря ограниченному диапазону хозяев возможна разработка планов по контролю/искоренению болезни.

Описание болезни: Использование, интерпретация и значимость процедур лабораторной диагностики лептоспироза могут различаться в зависимости от клинической истории животного или стада, продолжительности инфекции и серовара-возбудителя. Острый лептоспироз следует подозревать в следующих случаях: резкое появление агалактии (у взрослых дойных коров и овец), желтуха и гемоглобинурия, особенно у молодых животных, менингит и острая почечная недостаточность (у собак). Хронический

лептоспироз необходимо рассматривать в следующих случаях: аборт, рождение мертвого плода, рождение слабого потомства (возможно, недоношенного); бесплодие, хроническая почечная недостаточность (у собак), а также в случаях периодической офтальмии у лошадей. Сложнее всего диагностировать два хронических состояния, которые являются следствием лептоспирозной инфекции: носительство лептоспир в почках и в половых путях самцов и самок. Хронически инфицированные животные могут оставаться носителями инфекции в течение многих лет или всей жизни и служить резервуарами инфекции для других животных и человека.

Зоонозные риски и требования к биобезопасности: *Leptospira spp.* относится к 2-ой группе риска для человека, и при работе с ними требуется соблюдать соответствующие меры безопасности, описанные в Главе 1.1.4. Биобезопасность и биозащита: Руководство по управлению биологическими рисками в ветеринарной лаборатории и виварии. Меры биобезопасности определяют на основе анализа риска, описанного в Главе 1.1.4.

Дифференциальная диагностика: 1) Болезни, при которых может произойти сильное снижение надоев молока, такие как острые вирусные инфекции и внезапное отсутствие питьевой воды; 2) заболевания, протекающие с почечной или печеночной недостаточностью; и 3) заболевания, для которых характерна перинатальная смертность – аборт, уменьшение размера помета, мертворождение и бесплодие, например, бруцеллез, *Neospora*, ку-лихорадка и инфекционная вирусная диарея крупного рогатого скота, хламидиоз и токсоплазмоз овец, ку-лихорадка у коз и т.д.

В. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Таблица 1. Методы диагностики лептоспироза и их цели

Метод	Цель					
	Популяция Отсутствие инфекции	Отдельное животное Отсутствие инфекции перед перемещением	Содействие политике искоренени я	Подтверж дение клиническ их случаев	Распростр анение инфекции – надзор	Иммунный статус у отдельных животных или в популяциях после вакцинации
Идентификация возбудителя¹						
Выделение и идентифик ация	-	+++	-	+++	-	-
ПЦР	-	++	-	++	-	-
Определение иммунного ответа						
РМА	-	+++	-	++	+++	-

¹ Рекомендуется сочетание методов идентификации возбудителей на одном и том же патологическом образце.

Метод	Цель					
	Популяция Отсутствие инфекции	Отдельное животное Отсутствие инфекции перед перемещением	Содействие политике искоренени я	Подтверж дение клиническ их случаев	Распростр анение инфекции – надзор	Иммунный статус у отдельных животных или в популяциях после вакцинации
ИФА	+++	-	+++	+++	++	+++

+++ = рекомендованный метод; ++ = подходящий метод; + = может применяться в некоторых ситуациях, однако, стоимость, надежность или другие факторы существенно ограничивают его применение; - = не подходит для этой цели.

Хотя не все тесты, перечисленные в категории +++ или ++, прошли формальную валидацию, их рутинный характер и тот факт что, что они широко применяются и не выдают сомнительные результаты, делает их приемлемыми.

ПЦР = полимеразная цепная реакция; РМА = реакция микроагглютинации; ИФА = твердофазный иммуноферментный анализ.

1. Идентификация возбудителя

Диагностическим считается обнаружение лептоспир в крови и молоке животных с клиническими признаками острого лептоспироза. Однако выделение из крови не всегда бывает успешным, поскольку бактериемия, как правило, кратковременна и не всегда сопровождается клиническими признаками. Часто собакам перед отбором проб и тестированием на наличие *Leptospira* проводят лечение антибиотиками, что в дальнейшем снижает вероятность выявления возбудителя в крови. Обнаружение генерализованной лептоспирозной инфекции в ряде органов, отобранных при аутопсии, также считается диагностической. Однако если животное живет достаточно долго или получало лечение антибиотиками, обнаружение интактных организмов на системном уровне может быть затруднено, в таких случаях для обнаружения остаточного антигена лептоспир может быть задействована иммуногистохимия. Выявление лептоспир в половых путях, почках или моче следует интерпретировать только в совокупности с клиническими признаками и результатами серологических тестов, поскольку эти находки могут указывать лишь на то, что животное являлось носителем.

Отсутствие лептоспир в моче животного не исключает возможности того, что животное является хроническим носителем инфекции в почках, это лишь указывает на то, что животное на момент исследования не выделяло лептоспиры в обнаруживаемых количествах. Сбор мочи после введения животным мочегонных средств увеличивает шансы на обнаружение организмов (Nerving & Garrett, 1979). В важных случаях, когда речь идет об отдельном животном (например, лечение инфицированного жеребца-производителя с целью возобновления разведения) отрицательные результаты исследования трех проб мочи, отобранных в течение трех последовательных недель, считаются достаточным подтверждением того, что животное не выделяет лептоспиры с мочой.

Выявление лептоспир в жидкостях организма или во внутренних органах (обычно в почках, печени, легких, головном мозге или надпочечниках) абортированных или мертворожденных плодов является подтверждением хронического лептоспироза матери и свидетельствует об активной инфекции плода.

1.1. Изоляция возбудителя

Для опытного специалиста выделение лептоспир – один из наиболее специфичных методов демонстрации их присутствия при условии отсутствия остатков антибиотиков, интенсивного автолиза тканей, а также немедленной обработки тканей после их отбора для проведения культивирования, а в случае с мочой – при условии поддержания соответствующего уровня рН. Если ткани или жидкости невозможно быстро транспортировать в лабораторию для посева на лептоспироз, образцы следует хранить при температуре от 2°C до 5°C во избежание чрезмерного роста других бактерий и автолиза тканей. В качестве транспортной среды для доставки образцов обычно используют жидкую культуральную среду или 1% раствор альбумина бычьей сыворотки (BSA), содержащий 5-фторурацил в концентрации 100-200 мкг/мл.

Культивирование проводят в жидкой или полутвердой (0,1-0,2% агара) среде, содержащей альбумин бычьей сыворотки и либо Твин 80 (например, ЕМЖ²) (Johnson & Harris, 1967), либо комбинацию Твин 80 и Твин 40 (Ellis, 1986). Контроль контаминации осуществляют посредством добавления разнообразных селективных средств, например 5-фторурацила (Johnson & Rogers, 1964), налидиксовой кислоты (Johnson & Seiter, 1977), фосфомицина (Oie et. al, 1986) и смеси из рифамицина, полимиксина, неомицина, 5-фторурацила, бацитрацина и актидиона (Adler et. al, 1986). Однако использование селективных средств в присутствии небольшого количества жизнеспособных лептоспир может снизить шансы на выделение, а некоторые штаммы лептоспир не будут расти в селективных средах, содержащих несколько антибиотиков. Внесение 0,4-5% кроличьей сыворотки в полутвердую культуральную среду может увеличить шансы на выделение некоторых «прихотливых» сероваров лептоспир.

Культуры следует инкубировать при 29±1°C в течение, как минимум, 16, а лучше 26 недель (Ellis, 1986). Время, необходимое для обнаружения положительной культуры, зависит от серовара лептоспир или количества организмов, присутствующих в образце. С менее «прихотливыми» сероварами (например, Roma и Grippotyphosa) положительные результаты можно получить уже через 7-10 дней после посева; для других сероваров (например, Hardjo и Bratislava) потребуется намного больше времени. Культуры изучают под микроскопом в темном поле каждые 1-2 недели. Важно использовать источник света мощностью 100 Ватт и темнопольный микроскоп хорошего качества.

1.2. Методы на основе иммунохимического окрашивания

Выявление лептоспир также возможно с помощью различных методов на основе иммунохимического окрашивания, например, иммунофлуоресценции (Ellis et. al, 1982a) и различных методов иммуногистохимии (Barnett et. al., 1999; Scanziani, 1991; Wild et. al., 2002). Такие методы очень полезны для диагностики инфекции в патологическом материале, который не подходит для культивирования, или когда требуется быстро поставить диагноз. Поскольку успешность этих методов зависит от количества организмов, присутствующих в образцах, они меньше подходят для диагностирования состояния хронического носительства, при котором количество организмов может быть очень небольшим или обнаруживаемым только в определенных органах. Лептоспиры плохо окрашиваются анилиновыми

² ЕМЖ: Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris

красителями, а методы окрашивания серебром обладают недостаточной чувствительностью и специфичностью, хотя они являются полезным дополнением к методам гистопатологической диагностики (Baskerville, 1986).

1.3. Методы выделения нуклеиновой кислоты

Благодаря своей чувствительности и возможности ранней постановки диагноза анализы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР), все чаще применяют для выделения лептоспир в тканях и жидкостях животных. Метод ПЦР в реальном времени быстрее обычного метода ПЦР и менее чувствителен к контаминации (Picardeau, 2013). Данные методы можно разделить на две категории в зависимости от того, позволяют ли они выделять гены, которые обязательно присутствуют в бактериях, например, *gryB*, *rrs* (16S рРНК ген) и *secY* или гены, характерные для патогенных лептоспир, например, *lipL21*, *lipL32*, *lipL41*, *ligA* и *ligB* (Thaipadunpanit et. al., 2011). С помощью таких методов идентифицировать серовар-возбудитель невозможно, хотя некоторые наборы праймеров позволяют провести дополнительную идентификацию до вида или штамма при условии секвенирования ампликонов ПЦР. Такой дополнительный анализ не является стандартным диагностическим методом. Разработано много наборов праймеров для ПЦР, которые прошли оценку для исследования образцов патологического материала, отобранного у человека, а не у животных, и пока по вопросу использования ПЦР праймеров для исследования проб от животных общего понимания не достигнуто, хотя чаще всего упоминаются праймеры на основе гена *lipL32*. Одним из неразрешенных вопросов, связанных с применением ПЦР в диагностике лептоспироза животных, остается валидация (см. Таблица 1), при этом частные лаборатории отвечают за валидацию только того анализа, который они применяют для исследуемой ткани, жидкости или вида животного. К настоящему времени только три метода ПЦР в реальном времени прошли полную валидацию (Ahmed et. al., 2009; 2012b; Slack et. al., 2007; Thaipadunpanit et. al., 2011). Наличие ингибиторов амплификации в клинических пробах может стать причиной ложноотрицательных результатов, особенно при исследовании таких образцов животных, которые подвержены контаминации испражнениями или повреждены в результате автолиза. При контроле качества методов ПЦР для диагностики лептоспироза необходимо обращать пристальное внимание на дизайн лаборатории и организацию рабочего процесса с точки зрения предотвращения контаминации реагентов и наличия соответствующих контрольных проб (Dragon et. al., 1993; McCreedy & Callawayth, 1993). Кроме того, для ПЦР важное значение имеет обработка проб, которая должна соответствовать исследуемой ткани, жидкости и виду животного.

1.4. Идентификация изолятов лептоспир

Идентификация изолятов лептоспир – это задача специализированных референтных лабораторий. Для полной идентификации необходимо использовать комбинацию процедур, позволяющих определить: 1) является ли изолят патогеном или сапрофитом; 2) вид *Leptospira*, к которому принадлежит изолят, и 3) серогруппу и серовар изолята. Принадлежность чистой культуры лептоспир к патогенному или сапрофитному виду определяют с помощью различных тестов: по способности инфицировать животных, относительной резистентности к 8-азагуанину; липазной активности; толерантности к соли и температурной устойчивости (Johnson & Faine, 1984; Johnson & Harris, 1967), а также содержанию G + C в ДНК (Johnson & Faine, 1984).

Вид организма определяют с помощью метода ДНК-ДНК гибридизации (Brenner et al., 1999), хотя в последнее время актуальность приобрели другие, более быстрые молекулярные методы (Ahmed et al., 2012a), самым надежным из которых считается мультилокусное типирование-секвенирование (MLST) (Ahmed et al., 2006). Разные изоляты, принадлежащие к одному серовару, почти всегда относятся к одному и тому же виду.

Хотя определение принадлежности штамма *Leptospira* к определенной серогруппе с помощью реакции перекрестной агглютинации больше не имеет таксономической ценности, данный предварительный этап остается полезным инструментом для идентификации и выбора антигена для вакцин и серологических тестов (Dikken & Kmetz, 1978). Дальнейшую дифференциацию до уровня серовара раньше проводили путем перекрестной агглютинации-абсорбции, хотя для большинства изолятов этот процесс теперь выполняют с использованием методов, не требующих такого большого количества времени, например, с применением моноклональных антител (МАТ) (Terpestra et al., 1985; 1987). Многие молекулярных методов могут иметь отношение к серотипированию. Эти методы не подходят для выявления новых сероваров, однако, они могут подсказать направление идентификации и предоставить полезную молекулярно-эпидемиологическую информацию на уровне субсеровара. К таким методам ПЦР относятся мультилокусный анализ тандемных повторов с переменным числом звеньев (Slack et al., 2006; Zuerner & Alt, 2009), амплификация вставочных последовательностей (Zuerner & Bolin, 1995; 1997), полиморфизм длин амплифицированных фрагментов (ПДАФ) и флуоресцентно-меченный ПДАФ (Vijaychari et al., 2004), а также произвольно праймированная ПЦР (Perolat et al., 1994). Рестрикционный анализ BRENDA оказался очень полезным для эпизоотологического исследования лептоспир сельскохозяйственных животных (Ellis et al., 1991; Thiermann et al., 1986).

2. Серологические тесты

Серологическое исследование – лабораторная процедура, наиболее часто используемая для подтверждения клинического диагноза, для определения превалентности инфекции в стаде и для проведения эпизоотологических исследований. Антитела к лептоспирам появляются в течение нескольких дней после возникновения заболевания и сохраняются в течение нескольких недель или месяцев, а в некоторых случаях и лет. К сожалению, при хронической инфекции титры антител могут падать до необнаруживаемого уровня. Для решения данной проблемы необходимы чувствительные методы обнаружения организма в моче или половых путях хронических носителей.

Описано большое количество различных серологических тестов с разной степенью специфичности по отношению к серогруппам и сероварам. Для ветеринарной диагностики имеют значение два теста: реакция микроагглютинации (РМА) и твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА).

2.1. Реакция микроагглютинации

Наиболее широко используемым серологическим тестом является реакция микроагглютинации с использованием живых антигенов. Это референтный метод, который применяется для сравнительной оценки других серологических тестов и для тестирования при импорте/экспорте. Для достижения оптимальной

чувствительности необходимо использовать антигены, репрезентативные для всех серогрупп, существующих в регионе, в котором выявлены зараженные животные, и лучше использовать штаммы, представляющие все известные серогруппы. На присутствие серогруппы обычно указывает частая реакция в серологическом скрининге, хотя точно ее можно определить только путем выделения серовара у клинически пораженных животных. Чувствительность теста можно повысить за счет использования местных изолятов, а не справочных штаммов, однако справочные штаммы помогают при интерпретации результатов между лабораториями.

Реакции микроагглютинации характеризуются хорошей специфичностью, как правило, антитела к другим бактериям не вступают в выраженную перекрестную реакцию с антителами к *Leptospira*. Однако между сероварами и серогруппами *Leptospira* существует значительная серологическая перекрестная реактивность, и животное, инфицированное одним сероваром, по всей вероятности, будет иметь антитела против серовара-возбудителя, а также показывать реакцию (обычно с более низкими титрами) к другим сероварам в реакции микроагглютинации. Следовательно, с помощью серологической реакции невозможно с точностью определить серовар-возбудитель в случае отдельной инфекции или вспышки – для этого требуется выделение возбудителя. Однако в областях, в которых присутствующие серовары *Leptospira* хорошо описаны в исследованиях с выделением патогена, результаты серологического исследования инфицированного животного могут указать, но не точно идентифицировать серовар-возбудитель. Кроме того, у животных, ранее вакцинированных против лептоспироза, могут быть антитела к сероварам, присутствующим в вакцине. В связи с этим, крайне важно учитывать историю вакцинации тестируемых животных. Два способа проведения данного исследования подробно описаны (Faine et al., 2000; USDA, 1987).

2.1.1. Процедура исследования

- i) Отобранные штаммы выращивают в жидкой среде для культивирования лептоспир (например, ЕМЖН или в другой подходящей среде) при $29\pm 1^\circ\text{C}$, возраст культуры должен составлять, как минимум 4 дня, но не более 8 дней. В качестве антигенов используют живые культуры с плотностью лептоспир около 2×10^8 на мл. Плотность культуры можно определить прямым подсчетом клеток в камере для подсчета бактерий и темнопольного микроскопа. Иным образом количество клеток можно определить путем измерения коэффициента пропускания с использованием спектрофотометра с фильтром 400 нм или нефелометра. В случае применения непрямых методов, количество бактериальных клеток, подсчитанное прямым способом, должно коррелировать с результатами, полученными с использованием специального оборудования.
- ii) Определяют необходимое количество антигенов и проводят скрининговый тест с разведением сыворотки 1/50 (или другого стартового разведения, исходя из цели теста).
- iii) В каждую лунку добавляют каждый антиген в объеме, равном объему разведенной сыворотки, то есть конечное разведение сыворотки в скрининговом тесте становится 1/100.

- iv) Титрационные микропланшеты инкубируют при $30 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 1,5-4 часов.
- v) Планшеты изучают под темнопольным микроскопом.

Конечной точкой считают разведение сыворотки, при котором наблюдается 50% агглютинация при 50% свободных клеток по сравнению с контрольной культурой, разведенной $\frac{1}{2}$ в фосфатно-буферном растворе. Результат теста записывают в виде конечного разведения сыворотки (например, 1/100 или 1/400) или в виде титра, который представляет собой обратный показатель конечного разведения сыворотки (например, 100 или 400).

2.1.1. Контроль качества антигенов, использованных в РМА

Подлинность антигенов является решающим фактором при проведении реакции микроагглютинации. Подлинность антигенов оценивают с использованием гипериммунных кроличьих сывороток, моноклональных антител или молекулярного метода, подтверждающего пассажи с течением времени, лучше каждый раз, когда проводится тест, но не менее двух раз в год. Гипериммунную кроличью сыворотку для данной цели можно получить из референтной лаборатории или приготовить, следуя протоколу, составленному Подкомитетом по таксономии *Leptospira* (Международный комитет по систематической бактериологии, 1984 г.). Вкратце, отбирают здоровых кроликов с массой тела 3-4 кг, у которых отсутствуют обнаруживаемые антитела к лептоспирам. Каждому кролику вводят внутривенно в краевую вену уха хорошо растущую живую или обработанную формалином культуру с плотностью организмов приблизительно 2×10^8 лептоспир/мл. Возможно, потребуется включить этап промывки, так как альбумин бычьей сыворотки может вызвать шок. Культуру выращивают в среде, содержащей твин 80 и альбумин бычьей сыворотки, или в другой соответствующей среде. Каждому животному вводят пять инъекций по 1, 2, 4, 6 и 6 мл с интервалами в 7 дней. Через неделю после последней инъекции определяют гомологичный титр антител в реакции микроагглютинации. Если титр составляет 1/12800 и более, 7 дней спустя (т.е. через 14 дней после последней инъекции) кролика усыпляют и берут пробу крови посредством пункции сердца. Если титр ниже 1/12800, вводят дополнительную инъекцию культуры в объеме 6 мл; через 7 дней после инъекции снова определяют гомологичный титр. Если величина титра $\geq 1/12800$, процедуру повторяют с другим кроликом. Для приготовления одной антисыворотки используют двух кроликов. Если титры у двух кроликов удовлетворительные, сыворотки можно объединить. Для сохранения активности антисыворотку лиофилизируют аликвотами по 2 мл и хранят при $2-5^\circ\text{C}$. Сыворотку также можно хранить аликвотами по 1 мл при температуре от -15 до -70°C . Все манипуляции с животными должны быть утверждены и проводиться в соответствии с действующими стандартами по уходу за животными и их использованию. Возможно применение других протоколов иммунизации в зависимости от предполагаемого использования антисыворотки, а также с целью сократить количество используемых кроликов.

Следует регулярно проверять чистоту антигенов, используемых в реакции микроагглютинации, путем культивирования на кровяном агаре или в тиогликолевом бульоне. Исходные культуры антигенов можно хранить при температуре от -70°C до -80°C или в жидком азоте. После лиофилизации

выживаемость лептоспир может быть низкой. Повторный пассаж антигенов в жидкой среде приводит к снижению антигенных свойств. В этом случае из исходной культуры получают новую жидкую культуру.

Международное общество изучения лептоспироза³ ежегодно проводит квалификационные испытания по РМА.

2.1.2. Интерпретация результатов и ограничения РМА

Титр 1/100 считается положительным титром для целей международной торговли, но учитывая высокую специфичность РМА, более низкие титры могут свидетельствовать о перенесенной ранее лептоспирозной инфекции.

При исследовании отдельного животного реакция микроагглютинации может быть полезной для диагностики острой инфекции: диагностическим считается выявление четырехкратного изменения в титрах антител в парных образцах сыворотки от животного с острой инфекцией и переболевшего животного. Кроме того, лептоспирозную инфекцию диагностируют в случае обнаружения очень высоких титров у животных с характерной клинической картиной. Данный метод имеет ограничения при диагностике хронической инфекции у отдельных животных, как при исследовании абортированных плодов (Ellis et al., 1982b), так и при выявлении носителей инфекции в почках и половых путях (Ellis, 1986). Это особенно верно в отношении адаптированных к носителю лептоспирозных инфекций, например, при поражении КРС сероваром Hardjo: при значимом титре 1/100 и выше чувствительность теста составляет только 41%, а при снижении минимального значимого титра до 1/10 чувствительность теста составит всего 67% (Ellis, 1986). Выявление антител в крови плода является диагностическим, но титры часто очень низкие, 1/10, то есть в данном случае большинству лабораторий потребуется модифицированная процедура тестирования.

Поскольку лептоспироз является проблемой на уровне всего стада, то реакция микроагглютинации будет намного полезнее в качестве теста для стада. Для получения полезной информации Cole et al. (1980) предложили отбирать образцы, как минимум, у 10 животных или у 10% голов, в зависимости от того, что больше. Во время изучения инфекции сероваром Hardjo у КРС, Hathaway et al. (1986) обнаружили, что исследование образцов от 10 коров обычно позволяет установить наличие или отсутствие инфекции в стаде. Увеличение объема выборки может существенно повысить качество эпизоотологических данных, исследования клинической формы болезни и результатов отслеживания источника инфекции органами здравоохранения.

Серологическая диагностика лептоспироза должна осуществляться с учетом серовара-возбудителя и клинической картины. В случае абортов у КРС, вызванных заражением сероваром Romona, высокие титры обычно обнаруживают во время абортирования, поскольку это событие происходит относительно скоро после заражения. Абортирование у КРС вследствие заражения сероваром Hardjo является хроническим явлением; в этом случае серологический ответ на момент аборта может быть существенно варьировать: то есть у некоторых животных антитела будут отсутствовать, а у других будут

³ Доступно на: <http://www.med.monash.edu.au/microbiology/staff/adler/ils.html#Otherinfo>

наблюдаются высокие титры антител. Во время острой фазы заражения сероваром Hardjo у КРС может наблюдаться снижение надоев, и данный клинический признак ассоциируется с наличием высоких титров. При интерпретации результатов реакции микроагглютинации следует также учитывать историю вакцинации, поскольку широко применяемая вакцинация в значительной мере обуславливает присутствие большого количества сероположительных животных и может маскировать наличие хронической инфекции в стаде, особенно при заражении сероваром Hardjo.

2.2. Твердофазный иммуноферментный анализ

Разработан твердофазный иммуноферментный анализ для обнаружения антилептоспирозных антител с использованием ряда различных антигенов, протоколов и платформ, включая тесты на пластинах и тест-полоски. Антигены обычно представляют собой либо цельноклеточные препараты или препараты на основе наружного белка мембраны (НБМ); в последнее время также разрабатывались тесты на основе рекомбинантного НБМ. Используемый антиген обуславливает специфичность ИФА. ИФА на основе рекомбинантного НБМ активно реагируют на антитела ко всем патогенным лептоспирам и бесполезны для эпизоотологических исследований. И наоборот: ИФА на основе липополисахаридного антигена специфичны к определенным серогруппам и могут быть полезны для эпизоотологических исследований и стратегий борьбы с инфекцией. Иммуноферментный анализ антител IgM эффективен для диагностики острой инфекции (Cousins et al., 1985; Hartman et al., 1984; 1986). Иммуноферментный анализ всех Ig подходит для выявления полностью восприимчивых животных, подходящих для экспериментов с контрольным заражением (Ellis & Zygraich, 1986). Также разработаны ИФА для исследования молока от отдельных коров и для исследования сборного молока в цистернах с целью обнаружения антител к серовару Hardjo. Эти тесты помогли выявить стада, инфицированные сероваром Hardjo, а также использовались в программах по контролю и искоренению серовара Hardjo (Pritchard, 2001). Однако стада, вакцинированные против серовара Hardjo, будут также положительными в таких ИФА, что снижает их полезность в регионах, где вакцинация является стандартной практикой. Методы на основе НБМ пока широко не распространены. Несмотря на то что они играют важную роль для диагностики случайных инфекций, они вряд ли будут иметь большое значение для программ борьбы с инфекциями, характерными для определенного хозяина, таких как инфекция сероваром Hardjo, при которой у естественно инфицированных животных отсутствует или наблюдается только слабый иммунный ответ на наружные белки мембраны патогена, а ярко выраженный серологический ответ направлен против липополисахаридных антигенов (Ellis et al., 2000).

Проблемы с валидацией являются основным сдерживающим фактором при оценке большинства методов ИФА. Почти все методы валидировали в сравнении с РМА (используя титры РМА 1/100 или больше), который является недостаточно совершенным тестом с чувствительностью ниже 50% при некоторых хронических инфекциях. Исследователи попытались решить эту проблему за счет использования байесовских моделей анализа латентного класса и мета-анализов по модели случайных эффектов (Limmathurotsakul et al., 2012; Signorini et al., 2013), однако лучший способ валидации – использовать последовательные сыворотки от животных с положительными результатами посева на лептоспироз (Goris et al., 2012). Всего несколько методов ИФА для ветеринарного применения прошли

валидацию с использованием последовательных сывороток от экспериментальных животных, отобранных не позднее чем через 6 месяцев после заражения, в то время как один коммерческий ИФА для анализа на присутствие серовара Hardjo был валидирован против одной сыворотки от КРС, положительной по результатам посева.

С.ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. Общие положения

Ветеринарные вакцины против лептоспироза представляют собой суспензии одного или более штаммов патогенных *Leptospira*, инактивированных таким образом, чтобы сохранить иммуногенную активность. Коммерческие вакцины представляют собой цельноклеточные препараты и доступны по всему миру для КРС, свиней и собак. Лептоспиры выращивают в подходящих культуральных средах, которые могут содержать сыворотку или сывороточные белки. При использовании последних их следует удалять из конечного продукта. Вакцины могут содержать подходящие адьюванты.

Вакцины применяют у животных для защиты как животных, так и людей, контактирующих с ними. Они являются основным инструментом в программах контроля и искоренения. Вакцины не искореняют инфекцию у уже инфицированных носителей, и поэтому должны применяться до заражения. Коммерческие вакцины могут различаться по своей эффективности. Эксперименты показали, что несколько моновалентных препаратов, применявшихся на КРС, обеспечивают клиническую и микробиологическую защиту вплоть до года, в отличие от них ряд моновалентных препаратов индуцирует слабый иммунитет. Программы вакцинации необходимо адаптировать к целевым популяциям с учетом эффективности препарата. В идеале, КРС следует вакцинировать перед возможным заражением, и после этого ежегодно в периоды, предшествующие периодам повышенного риска. Для того чтобы программа вакцинации была успешной, необходимы эпизоотологические исследования для оценки частоты возникновения различных сероваров *Leptospira* в данной конкретной популяции (Adler & de la Pena Moctezuma, 2010).

Руководство по производству ветеринарных вакцин представлено в Главе 1.1.8. Принципы производства ветеринарных вакцин. Руководства, приведенные здесь и в Главе 1.1.8., являются общими по своему характеру и могут быть дополнены требованиями, принятыми в стране или регионе.

2. Основные принципы производства и минимальные требования к вакцинам

2.1. Характеристики посевного вируса

2.1.1. Биологические характеристики исходного посевного вируса

Особую важность имеет правильный выбор производственных вакцинных штаммов. Иммунитет, индуцируемый вакцинацией, является, главным образом, серовар-специфичным (Chen, 1986). Вакцину следует формулировать с целью применения для данного конкретного вида животных в определенном географическом регионе. Она должна содержать только те серовары – и, предпочтительно, те генотипы, – которые поражают данные виды животных, или которые передаются данными видами

животных другим видам животных в этом регионе. Штаммы, отобранные в качестве исходной посевной культуры, клонируют на твердой среде, чтобы гарантировать отсутствие контаминации сапрофитными лептоспирами и однородность культуры.

Подходящие штаммы затем подвергают дальнейшей селекции в зависимости от их способности к эффективному росту в условиях промышленного культивирования.

Каждый штамм, который в качестве компонента будет включен в готовую вакцину, выращивают отдельно в жидкой среде, лучше без содержания белков (Bey & Johnson, 1978; Shenberg, 1967) или с низким содержанием белков (Bey & Johnson, 1978).

Объем каждой исходной посевной культуры увеличивают посредством инкубирования в течение 2-10 дней при $29^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ в серии пересевов до получения объема, достаточного для использования в качестве производственной посевной культуры. Культуры насыщают кислородом и перемешивают по необходимости.

2.1.2. Критерии качества (стерильность, чистота, свобода от внешних агентов)

Каждую субкультуру исходного посевного материала проверяют на чистоту и удовлетворительный рост. Чистоту проверяют посредством внесения культуры в планшеты с кровавым агаром или тиогликолевым бульоном с помощью микробиологической петли с последующим инкубированием при $35-37^{\circ}\text{C}$ в течение 2-5 дней или посредством исследования окрашенного по Грамму мазка осадка культуры. Рост оценивают с помощью темнопольного микроскопа. Каждую производственную посевную культуру также проверяют на чистоту и гомологию с использованием гомологичной кроличьей антисыворотки (Dikken & Kmety, 1978). Для этой цели также можно использовать моноклональные антитела.

2.1.3. Валидация в качестве вакцинного штамма

Эффективность вакцин против лептоспироза описана в большом количестве литературы. В большинстве случаев вакцины обеспечивают высокий уровень защиты от болезни, вызываемой заражением гомологичным штаммом в полевых условиях.

Вакцины менее эффективны для профилактики инфекции у животных: часть вакцинированных животных будет инфицирована соответствующим сероваром и будет выделять организм в среду с мочой при отсутствии клинических признаков болезни.

Испытания для оценки эффективности и валидацию вакцины проводят на целевых видах животных, для которых предназначена вакцина. Вакцину вводят согласно указаниям на этикетке, уровень иммунитета проверяют посредством естественного контрольного заражения вирулентными полевыми штаммами каждого серовара, т.е. через конъюнктиву и/или вагинальным путем. Валидационные испытания часто проводят путем контрольного заражения лептоспирами внутривенным или

внутримышечным путем. Вакцины, валидированные таким образом, не всегда обеспечивали защиту от заражения в полевых условиях, которое происходит путем проникновения лептоспир через слизистые оболочки глаз, рта и половых путей. Следует отметить, что коммерческие вакцины против лептоспироза, содержащие серовар Hardjo, не всегда обеспечивали защиту КРС от контрольного заражения сероваром Hardjo через конъюнктиву или в полевых условиях. Подготовлен проект монографии по исследованию эффективности вакцин против серовара Hardjo, предусматривающих использование более естественных путей для контрольного заражения (монография Европейской фармакопеи).

2.2. Методы производства

2.2.1. Процедура

Производство вакцин осуществляется методом серийного культивирования в ферментерах соответствующего размера. Ферментеры должны быть снабжены отверстиями для стерильного внесения посевной культуры, воздуха и дополнительной среды, а также отверстиями для отбора образцов с целью мониторинга чистоты и роста производственной культуры.

В идеале, для производства используют среду с низким содержанием белков или безбелковую среду. Однако некоторым штаммам для высокой производительности требуется присутствие животного белка, который обычно добавляют в виде альбумина бычьей сыворотки. Все компоненты среды, не разрушаемые под действием высокой температуры, подвергают стерилизации путем нагрева. Это снижает риск контаминации сапрофитными лептоспирами, передаваемыми через воду, которые невозможно удалить посредством стерилизации методом фильтрации.

После добавления посевного материала проводят интенсивный мониторинг роста производственной культуры с целью выявления начала лог-фазы роста. Сразу же после обнаружения данной фазы содержимое сосуда перемешивают и аэрируют. Выход конечного продукта можно увеличить, добавив к культуре дополнительный объем твин 80 в момент первого замедления фазы логарифмического роста. Для адекватного роста может потребоваться до 10 дней инкубирования при $29^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Инактивацию обычно осуществляют путем добавления формалина, однако, возможно использование фенола, мертиолята или высокой температуры.

После соответствующего периода инактивации проводят концентрирование культуры и удаляют чуждые белковые материалы методом ультрацентрифугирования. В конечный состав вакцины можно включать различные штаммы в подходящих объемах с последующим перемешиванием и добавлением адьюванта и консерванта, при необходимости.

2.2.2. Требования к ингредиентам

Все продукты биологического происхождения, особенно альбумин бычьей сыворотки, должны происходить из стран с незначительным риском трансмиссивной губкообразной энцефалопатии (см. Главу 1.1.8).

2.2.3. Контроль в процессе производства

Во время производства ежедневно или дважды в день отбирают дополнительные пробы для мониторинга роста лептоспир и отсутствия контаминантов. Мониторинг роста производится либо путем подсчета лептоспир в счетной камере под темнопольным микроскопом, либо с помощью нефелометра. Отсутствие контаминации проверяют путем изучения под микроскопом окрашенных по Граму препаратов центрифугированной культуры.

Непосредственно перед инактивацией отбирают пробу для проверки против гомологичных антител в РМА. Инактивированные культуры необходимо проверять на отсутствие жизнеспособных лептоспир. Для этого аликвоты инактивированной культуры вносят в соответствующую ростовую среду, например, в среду Johnson & Harris (1967), инкубируют при $29^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ в течение, как минимум, 4 недель с еженедельным изучением под темнопольным микроскопом на наличие жизнеспособных лептоспир.

После смешивания концентрация свободных инактивирующих агентов, минералов, присутствующих в адьювантах (например, алюминия), и консерванта (например, тиомерсала) не должна выходить за пределы установленных значений.

2.2.4. Контроль серии конечного продукта

i) Стерильность

Отобранные образцы готовой вакцины тестируют на отсутствие жизнеспособных бактерий и грибов (Британская фармакопея [Ветеринарная], 1985b; Европейская фармакопея, 2002a; 2002b; 9CFR 113.26). Тесты биологического материала на стерильность и свободу от контаминации описаны в Главе 1.1.9.

ii) Тестирование на подлинность

Проверку подлинности продукта проводят перед инактивацией, обычно с использованием соответствующих антисывороток.

iii) Безопасность

Образцы готового продукта тестируют на безопасность. Методы таких испытаний описаны в других работах (Британская фармакопея [Ветеринарная], 1985a; Европейская фармакопея, 2002a; 9CFR 113.38). Тест проводят для каждого способа введения, указанного на этикетке, и на двух здоровых животных каждой категории (например, беременные животные, молодняк), для которых предназначена вакцина. Животные должны быть восприимчивыми к сероварам, используемым в вакцинах, а их сыворотки не должны содержать агглютинирующих антител к этим

сероварам. Каждому животному вводят вакцину рекомендованным способом в объеме, в два раза превышающим рекомендованную дозу, указанную на этикетке. Животных наблюдают в течение 14 дней на предмет отсутствия неблагоприятных местных или системных реакций, связанных с использованием вакцины.

iv) Активность серии продукта

Образцы готовой вакцины тестируют на активность на хомячках или морских свинках. Активность обычно оценивают по способности вакцины предотвращать гибель животного при контрольном заражении летальной дозой. Активность вакцины против некоторых сероваров, которые не являются летальными для хомячков и морских свинок, таких как серовар Hardjo, определяют по их способности предотвращать поражение почек в результате контрольного заражения животного возбудителем инфекции в дозе от 10 до 10 000 ИД₅₀ (50% инфицирующей дозы) или путем индукции соответствующего титра антител у кроликов.

Примерный протокол: Каждому из десяти здоровых хомячков в возрасте не более 3 месяцев вводят вакцину в объеме 1/40 дозы для собак. Через 15-30 суток всем вакцинированным животным и каждому из 10 невакцинированных хомячков того же возраста вводят внутрь брюшины соответствующее количество вирулентной культуры лептоспир серовара, на основе которого приготовлена вакцина (или суспензию ткани печени или почки экспериментально инфицированного животного). В случае с бивалентными вакцинами каждый серовар тестируют отдельно. Вакцина считается соответствующей условиям испытаний, если не менее 80% контрольных животных погибли, демонстрируя типичные признаки лептоспирозной инфекции, и если не менее 80% вакцинированных животных остались здоровыми в течение 14 дней после гибели контрольных. Для пяти- или шестивалентных вакцин, предназначенных для КРС и свиней, можно использовать другие протоколы. Согласно Европейской фармакопее необходимо пять вакцинированных и пять контрольных животных.

В настоящее время разрабатываются и уже входят в употребление *in vitro* тесты для оценки активности противолептоспирозных вакцин на основе количественной оценки защитного антигена в вакцине с использованием моноклональных антител в ИФА с захватом антигена (Ruby et al., 1992) (Klaasen et al., 2013).

2.3. Требования к получению регистрационного удостоверения/регистрации/лицензированию

2.3.1. Процесс производства

Для регистрации вакцины в регуляторные органы предоставляют описание процесса производства вакцины и испытаний по контролю качества (см. Разделы С.2.1. и С.2.2.). Эта информация должна быть получена по трем последовательным сериям вакцины, объем которых

должен составлять не менее 1/3 от типичного объема производственной серии.

Контроль в процессе производства является частью процесса производства.

2.3.2. Требования к безопасности

Проводят испытания с введением однократной дозы и многократных доз (с учетом максимального количества доз для первичной вакцинации и, если применимо, для первой ревакцинации/бустерной вакцинации), содержащих максимально разрешенную нагрузку и – в зависимости от случая – максимальное количество штаммов вакцины.

i) Общая безопасность для целевых животных

Один пример: использовать не менее 10 здоровых целевых животных без антител против *Leptospira*. Каждому животному вводят двойную дозу вакцины способом, указанным на этикетке. Животных наблюдают каждый день в течение 14 дней. В случае возникновения во время периода наблюдения нежелательных реакций, связанных с биологическим препаратом, вакцина считается неудовлетворительной. В случае возникновения нежелательных реакций, не связанных с биологическим препаратом, результаты теста признают неубедительными, и испытание повторяют (Европейская фармакопея, 2008. 9CFR; Департамент требований к сельскохозяйственным стандартам США § 9. CFR, 113).

ii) Безопасность у беременных животных

Если вакцина предназначена для применения у беременных животных, для оценки безопасности используют не менее 10 здоровых животных на сроке беременности, соответствующем рекомендованному плану, или на разных сроках беременности. Каждому животному вводят двойную дозу вакцины методом, указанным на этикетке. Животных наблюдают в течение всего срока беременности и до наступления дня после родов. Результаты испытания считают удовлетворительными, если у животных отсутствуют нежелательные местные или системные реакции, признаки заболевания или гибель по причинам, связанным с биологическим препаратом, а также негативное влияние на течение беременности или рожденное потомство.

iii) Меры предосторожности

Необходимо установить, является ли вакцина безопасной или патогенной для лиц, осуществляющих вакцинацию. С целью предупреждения лиц, осуществляющих вакцинацию, о возможной опасности на этикетке или в инструкции по применению вакцины должно быть четко указано, что в случае случайного введения препарата самому себе, необходимо срочно обратиться к врачу (это касается и адьювантов, эмульсионных вакцин, консервантов и т.д.).

2.3.3. Требования к эффективности

Для регистрации коммерческой вакцины необходимо провести испытания по оценке эффективности серии или серий продукта, произведенных в соответствии со стандартным методом и содержащих минимальное количество антигена или обладающих минимальной активностью; перед выпуском в продажу каждую будущую коммерческую серию необходимо тестировать с целью подтверждения, что активность данного продукта не уступает активности серии(ий), использованных для оценки эффективности.

В испытании используют минимум 10 вакцинированных и 10 контрольных животных (КРС) и 8 вакцинированных и 8 контрольных животных (собаки), которых подвергают контрольному заражению каждым сероваром, включенным в вакцину. Животных вакцинируют в соответствии с рекомендованным планом вакцинации в полевых условиях. Контрольное заражение происходит естественным путем. Возраст животных и их репродуктивный статус должны соответствовать таковым, которые будут заявлены в инструкции. Животных умерщвляют (если они не погибли ранее) через 28-35 дней после контрольного заражения, а образцы соответствующих тканей отправляют на посев. Клинический осмотр проводят ежедневно. Посев крови проводят на 4-7 день после контрольного заражения, а также в день обнаружения лихорадки у животных. Пробы мочи, отобранные 14, 21 и 28 день после контрольного заражения, изучают на наличие лептоспир. После убоя также проводят посев тканей почек и мочи. Если заявлено, что вакцина обеспечивает защиту от носительства инфекции в половых путях, также необходимо выполнить посев образцов матки и фаллопиевых труб, отобранных в момент убоя. В случае гибели животного, проводят посев мочи, тканей почек и печени. Эффективность считается подтвержденной, если вакцина обеспечила защиту 80% вакцинированных животных при наличии инфекции не менее чем у 80% контрольных животных.

2.3.4. Продолжительность иммунитета

Продолжительность иммунитета оценивают на тех видах животных, для которых предназначена данная вакцина, при этом используют естественные способы контрольного заражения. Продолжительность иммунитета нельзя оценивать в зависимости от периода сохранения титров антител в РМА у вакцинированных животных, так как защитные антитела против клинической формы болезни могут присутствовать в очень низких титрах. Вакцинный иммунитет должен сохраняться в течение, как минимум, 6 месяцев или дольше, в зависимости оттого, что заявлено на этикетке.

2.3.5. Стабильность

При соблюдении предписанных условий хранения ожидается, что вакцины будут сохранять свою активность в течение 1-2 лет. Оценку

стабильности производят посредством определения активности после хранения при 2-5°C, комнатной температуре и при 35-37°C.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ADLER B. & DE LA PEÑA МОСТЕЗУМА А. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Vet. Microbiol.*, 140, 287–296.
- ADLER B., FAINE S., CHRISTOPHER W.L. & CHAPPEL R.J. (1986). Development of an improved selective medium for isolation of leptospire from clinical PMAerial. *Vet. Microbiol.*, 12, 377–381.
- AHMED A., ENGELBERTS M.F.M., BOER K.R., AHMED N. & HARTSKEERL R.A. (2009). Development and validation of a real-time PCR for detection of pathogenic leptospira species in clinical PMAerials. *PLoS One*, 4, e7093.
- AHMED A., GROBUSCH M.P., KLATSER P. & HARTSKEERL R.A. (2012a). Molecular approaches in the detection and characterization of *Leptospira*. *J. Bacteriol. Parasitol.*, 3, 2 <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9597.1000133>.
- AHMED A., KLAASEN H.L.B.M., VAN DER VEEN M., VAN DER LINDEN H., GORIS M.G.A. & HARTSKEERL R.A. (2012b). Evaluation of real-time PCR and culturing for the detection of leptospire in canine samples. *Adv. Microbiol.*, 2, 162–170.
- AHMED N., MANJULATA DEVI S., VALVERDE M. DE LOS A., VIJAYACHARI P., MACHANG'U R.S., ELLIS W.A. & HARTSKEERL R.A. (2006). Multilocus sequence typing method for identification and genotypic classification of pathogenic *Leptospira* species. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 5, 28 (doi:10.1186/1476-0711-5-28).
- BARNETT J.K., BARNETT D., BOLIN C.A., SUMMERS T.A., WAGAR E., CHEVILLE N.F., HARTSKEERL R. & HAAKE D. (1999). Expression and distribution of leptospiral outer membrane components during renal infection of hamsters. *Infect. Immun.*, 67, 853–861.
- BASKERVILLE A. (1986). Histopathological aspects of diagnosis of leptospirosis. *Curr. Top. Vet. Med. Anim. Sci.*, 36, 33–43.
- BEY R.F. & JOHNSON R.C. (1978). Protein-free and low-protein media for the cultivation of *Leptospira*. *Infect. Immun.*, 19, 562–569.
- BRENNER J., KAUFMANN A.F., SULZER K.R., STEIGERWALT A.G., ROGERS F.C. & WEYANT R.S. (1999). Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. nov. and four new *Leptospira* genomospecies. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49, 839–858.
- BRITISH PHARMACOPOEIA (VETERINARY) (1985a). *Leptospira* veterinary vaccines. 117.
- BRITISH PHARMACOPOEIA (VETERINARY) (1985b). Test for sterility of veterinary immunological products. Appendix xviA, (vet). 2, A127–A128.
- CHEN T.Z. (1986). Development and present status of leptospiral vaccine and technology of production of the vaccine in China. *Ann. Immunol. Hung.*, 26, 125–151.

CODE OF FEDERAL REGULATIONS (OF THE UNITED STATES OF AMERICA) (9CFR)
United States Department of Agriculture Standard Requirements, 9 CFR 113.26.

CODE OF FEDERAL REGULATIONS (OF THE UNITED STATES OF AMERICA) (9CFR)
United States Department of Agriculture Standard Requirements, 9 CFR 113.38.

COLE J.R., ELLINGHAUSEN H.C. & RUBIN H.L. (1980). Laboratory diagnosis of leptospirosis of domestic animals. *Proc. U.S. Anim. Health Assoc.*, 83, 189–199.

COUSINS D.V., ROBERTSON G.M. & HUSTAS L. (1985). The use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect the IgM and IgG antibody response to *Leptospira interrogans* serovars hardjo, pomona and tarassovi in cattle. *Vet. Microbiol.*, 10, 439–450.

DIKKEN H. & KMETY E. (1978). Serological typing methods of leptospirae. *Methods Microbiol.*, 11, 259–307.

DRAGON E.A., SPADORO J.P. & MADEJ R. (1993). Quality control of polymerase chain reaction. In: *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications*, Persing D.H., Smith T.F., Tenover F.C. & White T.J., eds. American Society for Microbiology, Washington DC, USA, 160–168.

ELLIS W.A. (1986). The diagnosis of leptospirosis in farm animals. In: *The Present State of Leptospirosis Diagnosis and Control*, Ellis W.A. & Little T.W.A., eds. Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands, 13–31.

ELLIS W.A., MONTGOMERY J.M. & THIERMANN A.B. (1991). Restriction endonuclease analysis as a taxonomic tool in the study of pig isolates belonging to the Australis serogroup of *Leptospira interrogans*. *J. Clin. Microbiol.*, 29, 957–961.

ELLIS W.A., O'BRIEN J.J., NEILL S.D., FERGUSON H.W. & HANNA J. (1982a). Bovine leptospirosis: microbiological and serological findings in aborted fetuses. *Vet. Rec.*, 110, 147–150.

ELLIS W.A., O'BRIEN J.J., NEILL S.D. & HANNA J. (1982b). Bovine leptospirosis: Serological findings in aborting cows. *Vet. Rec.*, 110, 178–180.

ELLIS W.A., YAN K.T., MCDOWELL S.W.J., MACKIE D.P., POLLOCK J.M. & TAYLOR M.J. (2000). Immunity to Bovine Leptospirosis. *Proceedings of 21st World Buiatrics Congress*, Punte del Este, Uruguay, 10601–10611.

ELLIS W.A. & ZYGRAICH N. (1986). Experimental studies with a *Leptospira interrogans* serovar hardjo vaccine. *Proceedings of the XIVth World Congress on Diseases of Cattle*, Dublin, Eire, 971–974.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA (2002a). Monograph 01/2002:0447: *Leptospiravaccine* for veterinary use. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM), Council of Europe, Strasbourg, France, p. 2270.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA (2002b). Chapter 2. Methods of analysis. European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM), Council of Europe, Strasbourg, France, 13–231.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA MONOGRAPH: Bovine Leptospirosis vaccine (inactivated); PA/PH/Exp. 15V/T (01) 28.

FAINE S., ADLER B., BOLIN C. & PEROLAT P. (2000). *Leptospira and Leptospirosis*, Second Edition. Medisci Press, Melbourne, Australia.

GORIS M., LEEFLANG M., BOER K., GOEIJENBIER M., VAN GORP E., WAGENAAR J. & HARTSKEERL R.A. (2012). Establishment of valid laboratory case definition for human Leptospirosis. *J. Bacteriol. Parasitol.*, 3, e1000132

HARTMAN E.G., VAN DEN INGH T.S.G.A.M. & ROTHUIZEN J. (1986). Clinical, pathological and serological features of spontaneous canine leptospirosis. An evaluation of the IgM- and IgG-specific ELISA. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 13, 261–271.

HARTMAN E.G., VAN HOUTEN M., FRIK J.F. & VAN ER DONK J.A. (1984). Humoral immune response of dogs after vaccination against leptospirosis measured by an IgM- and IgG-specific ELISA. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 7, 245–254.

HATHAWAY S.C., LITTLE T.W.A. & PRITCHARD D.G. (1986). Problems associated with the diagnosis of *Leptospira interrogans* serovar hardjo infection in bovine populations. *Vet. Rec.*, 119, 84–86.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON SYSTEMATIC BACTERIOLOGY (1984). Subcommittee on the taxonomy of *Leptospira*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34, 258–259.

JOHNSON R.C. & FAINE S. (1984). Leptospiraceae. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, USA, 62–67.

JOHNSON R.C. & HARRIS V.G. (1967). Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospirae. I. Growth at low temperatures. *J. Bacteriol.*, 94, 27–31.

JOHNSON R.C. & ROGERS P. (1964). 5-Fluorouracil as a selective agent for growth of Leptospirae. *J. Bacteriol.*, 87, 422–426.

JOHNSON R.C. & SEITER C.W. (1977). *The Leptospira and their cultivation – a monograph*. Reheis Chemical (a division of Armour Pharmaceutical), Phoenix, Arizona, USA.

KLAASEN H.L.B.M., VAN DER VEE M., MOLKENBOER M.J.C.H. & SUTTON D. (2013). A novel tetravalent Leptospira bacterin protects against infection and shedding following challenge in dogs. *Vet. Rec.*, 172, 181–181.

LIMPAHUROTSAKUL D., TURNER E.L., WUTHIEKANUN V., THAI PADUNGPANIT J., SUPUTTAMONGKOL Y., CHERAKUL W., SMYTHE LD., DAY N.P.J., COOPER B. & PEACOCK S.J. (2012). Fool's gold: why imperfect reference tests are undermining the evaluation of novel diagnostics: re-evaluation of 5 diagnostic tests for Leptospirosis. *Clin. Infect. Dis.*, 55, 322–331.

MCCREEDY B.J. & CALLAWAYTH H. (1993). Laboratory design and work flow. In: *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications*, Persing D.H., Smith T.F., Tenover F.C. & White T.J., eds. American Society for Microbiology, Washington D.C., USA, 149–159.

- NERVIG R.M.&GARRETT L.A. (1979). Use of furosemide to obtain bovine urine samples for leptospiral isolation. *Am. J. Vet. Res.*, 40, 1197–1200.
- OIE S., KOSHIRO A., KONISHI H., & YOSHSII Z. (1986) In vitro evaluation of combined use of fosfomycin and 5-fluorouracil for selective isolation of *Leptospira* species. *J. Clin. Microbiol.*, 23, 1084–1087.
- PEROLAT P., MERIEN F., ELLIS W.A. & BARANTON G. (1994). Characterization of *Leptospira* isolates from serovar hardjo by ribotyping, arbitrarily primed PCR, and mapped restriction polymorphisms. *J. Clin Microbiol.*, 32, 1949–1957.
- PICARDEAU M. (2013). Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 43(1), 1–9.
- PRITCHARDG. (2001). Milk antibody testing in cattle. *In Practice*, 23, 542–548.
- RUBY K.W., CARDELLA M.A.&KNUDTSON W.U. (1992). Assay for measuring relative potency of leptospiral bacterins containing serovar pomona. *Biologicals*, 20, 259–266.
- SCANZIANI E. (1991). Comparison between specific immunoperoxidase staining and bacteriological culture in the diagnosis of renal leptospirosis of pigs. *Res. Vet. Sci.*, 50, 229–232.
- SHENBERG E. (1967). Growth of pathogenic *Leptospira* in chemically defined media. *J. Bacteriol.*, 93, 1598–1606.
- SIGNORINI M.L., LOTTESBERGER J., TARABLA H.D. & VANASCO N.B. (2013) Enzyme-linked immunosorbent assay to diagnose human leptospirosis: a meta-analysis of the published literature. *Epidemiol. Infection.*, 141, 22–32.
- SLACK A., SYMONDS M., DOHNT M.F. & SMYTHE L.D. (2006b). An improved multiple-locus variable number of tandem repeats analysis for *Leptospira interrogans* serovar Australis: a comparison with fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis and its use to redefine the molecular epidemiology of this serovar in Queensland, Australia. *J. Med. Microbiol.*, 55, 1549–1557.
- SLACK A., SYMONDS M., DOHNT M., HARRIS C., BROOKES D. & SMYTHE L.(2007). Evaluation of a modified Taqman assay detecting pathogenic *Leptospira* spp. against culture and *Leptospira*-specific IgM enzyme-linked immunosorbent assay in a clinical environment. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 57, 361–366.
- TERPSTRA W.J., KORVER H., SCHOONE G.J., VAN LEEUWEN J., SCHÖNEMANN C.E., DE JONGE-AGLIBUT S. & KOLK A.H.J. (1987). Comparative classification of *Leptospira* serovars of the Pomona group by monoclonal antibodies and restriction-endonuclease analysis. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. [A]*, 266, 412–421.
- TERPSTRA W.J., KORVER H., VAN LEEUWEN J., KLATSER P.L. & KOLK A.H.J. (1985). The classification of sejroe group serovars of *Leptospira interrogans* with monoclonal antibodies. *Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. [A]*, 259, 498–506.
- THAIPADUNPANIT J., CHIERAKUL W., WUTHIEKANUN V., LIMPAHUROTSAKUL D., AMORNCHAI P., BOONSLIP S., SMYTHE L.D., LIMPAIBOON R., HOFFMASTER A.R., DAY N.P.J. & PEACOCK S.J. (2011). Diagnostic accuracy of real-time PCR assays

targeting 16S rRNA and lipI32 genes for human Leptospirosis in Thailand: a case-control study. Plos One, 6, e16236.

THIERMANN A.B., HANDSAKER A.L., FOLEY J.W., WHITE F.H. & KINGSCOTE B.F. (1986). Reclassification of North American leptospiral isolates belonging to serogroups Mini and Sejroe by restriction endonuclease analysis. Am. J. Vet. Res., 47, 61–66.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE: NATIONAL VETERINARY SERVICES LABORATORIES (1987). Microtitre technique for detection of Leptospira antibodies. Proc. U.S. Anim. Health Assoc., 91, 65–73.

VIJAYACHARI P., HARTSKEERL R.A., SHARMA S., NATARAJASEENIVASAN K., ROY S., TERPSTRA W.J. & SEHGAL S.C. (2004). A unique strain of Leptospira isolated from a patient with pulmonary haemorrhages in Andaman Islands: a proposal of serovar Portblairi of serogroup Sehgal. Epidemiol. Infect., 132, 663–673.

WILD C.J., GREENLEE J.J., BOLIN C.A., BARNETT J.K., HAAKE D.A. & CHEVILLE N.F. (2002). An improved immunohistochemical diagnostic technique for canine leptospirosis using antileptospiral antibodies on renal tissue. J. Vet. Diagn. Invest., 14, 20–24.

ZUERNER R.L. & ALT D.P. (2009). Variable nucleotide tandem-repeat analysis revealing a unique group of Leptospira interrogans serovar omona isolates associated with California sea lions. J. Clin. Microbiol., 47, 1202–1205.

ZUERNER R.L., ALT D. & BOLIN C.A. (1995). IS1533-based PCR assay for identification of Leptospira interrogans sensu lato serovars. J. Clin. Microbiol., 33, 3284–3289.

ZUERNER R.L. & BOLIN C.A. (1997). Differentiation of Leptospira interrogans isolates by IS1500 hybridization and PCR assays. J. Clin. Microbiol., 35, 2612–2617.

NB: Существуют референтные лаборатории МЭБ по лептоспирозу (см. Таблицу в Части 4 данного Руководства по наземным животным или обновленный список на веб-сайте МЭБ: <http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/> <http://www.oie.int/>)

Дополнительную информацию по диагностическим тестам, реактивам и вакцинам против лептоспироза можно получить в референтных лабораториях МЭБ.