

Винахід відноситься до біології, медичної та ветеринарної мікробіології, біотехнології та може бути використаний при виробництві біологічно активних препаратів, діагностичних цитробактерних антигенів для серологічної діагностики цитробактерної інфекції у птахів. Має загально теоретичне і практичне значення.

Для бактерій роду *Citrobacter* характерна наявність 44 серологічних 0-груп, 88 антигенів і більше 200 серологічних типів. Окрім того є мікродові зв'язки по 0-антигену із бактеріями роду *Salmonella*, *Eshcherichia*, *Morganella* та *Haftia*.

Прототип - відомий спосіб отримання аглютинуючих цитробактерних антигенів шляхом вирощування 18-24 годиною агарової культури бактерій роду *Citrobacter* із наступним застосуванням його в реакції аглютинації на склі загальноприйнятим методом (1).

Недоліком відомого способу являється те, що при виборі бактерій для отримання антигену не враховується видова специфічність бактерій за джерелом походження, що являється важливим для проведення правильної лабораторної діагностики.

Окрім того, застосування антигену в реакції аглютинації на склі дає можливість оцінювати результати за якісним показником - інтенсивність аглютинації, ступінь її прояви. Отримані дані дозволяють робити тільки загальний висновок про антигенні зв'язки, а в деяких випадках лише узагальнено (2).

Метою передбачуваного винаходу являється розробка способу отримання аглютинуючого антигену для серологічної діагностики цитробактерної інфекції у курей.

Поставлена мета досягається тим, що як антиген використовують виділений від курей штам *Citrobacter freundii*, видоспецифічний за джерелом походження. Антиген використовують у пластинчатій реакції аглютинації (мікротитратор Такачі) з кількісним визначенням титру антигену.

Приклад виконання способу:

1. Штам *Citrobacter freundii*, ізольований із жовткових фолікулів курей, позитивнореагуючих із еритроцитарним пулорним антигеном, виготовленим зі штаму *S.pulorum-gallinarum*.

2. Культуру *Citrobacter freundii*, висівають на МПБ у пробірки по 10см³ у кожній. Інкують при 37°C протягом 24 годин.

3. Кожна культура містить 3х10⁹ колонієутворюючих одиниць при підрахуванні колоній на агаровій поверхні у чашках Петрі. Культуру перевіряють на чистоту шляхом фарбування по Граму, та мікроскопією на рухливість.

4. Потім розплідку бактерій реінкують на м'ясо-пептонному агарі (МПА) в матрацах об'ємом 1,5л; інкують в термостаті при температурі 37°C протягом 18-24 годин. Добову агарову культуру змивають забуференим (рН7,2) 0,85% розчином NaCl.

5. В отриманій суспензії визначають концентрацію мікробних клітин за стандартом каламутності. Фізіологічним розчином (рН7,2) доводять концентрацію бактерій до 20млрд./см³.

6. Суспензію *Citrobacter freundii* інактивують 0,4% розчином формаліну при 37°C протягом 48 годин.

Визначення активності і специфічності антигену.

Антиген для діагностики цитробактерної інфекції у курей являє собою завись бактеріальної культури штаму *Citrobacter freundii* (був отриманий виконавцями із жовткових фолікулів курей, № деклараційного патенту 61253, 2003р.), інактивованої розчином формаліну. Концентрація бактерій згідно стандарту каламутності складає 20млрд./см³.

Випробування проводять у тест-системі, яка містить специфічну імунну сироватку, нормальну негативну сироватку курей, фізіологічний розчин NaCl з рН7,2. Антиген застосовують у кількісній, пробірочній та пластинчатій реакції аглютинації (РА) за допомогою мікротитратора Такачі.

Порядок випробування в пластинчатій (РА).

Готують послідовні двократні розведення імунної специфічної сироватки від курей фізіологічним розчином NaCl, в об'ємі 0,05см³. У всі розведення сироватки додають по 0,05см³ робочого розчину антигену (для отримання робочого розчину нативний антиген розводять фізіологічним розчином 1:10). В контролі досліджуються нормальна негативна сироватка у двократних розведеннях.

Контроль антигену на спонтанну аглютинацію проводять шляхом внесення у 5 лунок плексигласової панелі фізіологічного розчину NaCl в об'ємі 0,05см³, потім додають 0,05см³ робочого розчину антигену у кожен лунку.

Панелі струшують та ставлять на 2 години до термостата при 37°C. Потім реакцію залишають при кімнатній температурі 23-25°C на 20-22 години.

Облік реакції.

Позитивна реакція характеризується появою на дні лунки осаду у вигляді парасольки із рівними або зубчастими краями.

Негативна реакція характеризується появою на дні лунки осаду у вигляді маленького гудзика. Реакція на спонтанну аглютинацію повинна бути негативною. Результати досліджень представлені у таблиці.

Таблиця

Назва компонента	Розведення сироватки								
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
1.Імунна сироватка	+	+	+	+	+	+	+		
2.Нормальна сироватка	+	+	-	-	-	-	-		
3.Фізіологічний розчин	-	-	-	-	-	-	-		

Найбільше розведення імунної сироватки, при якому спостерігається чітка аглютинація вважають титром антигену.

Реакцію аглютинації з імунною сироваткою оцінюють позитивно при титрі 1:16 і вище.

Реакцію аглютинації з негативною сироваткою повинна бути негативною або не вище 1:4.