



УКРАЇНА

(19) UA (11) 61253 (13) A

(51) 7 A61K39/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ CITROBACTER " Sp"( C.FREUNDII GALINARUM)"INV"-ПРОДУЦЕНТ БАКТЕРІЙНОГО АНТИГЕНУ

1

2

(21) 2002118944

(22) 11 02 2003

(24) 17 11 2003

(46) 17 11 2003, Бюл. № 11, 2003 р.

(72) Білявцева Олена Анатоліївна, Іонкіна Ірина Борисівна

(73) КРИМСЬКА ДОСЛІДНА СТАНЦІЯ ІНСТИТУТУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

(57) Штам бактерій *Citrobacter* "Sp" (*C. freundii* galinarum) "inv" - продуцент бактерійного антигену, що використовують для серологічної діагностики цитробактерної інфекції у курей, який депонований та зберігається за номером П-01 у колекції мікроорганізмів лабораторії вивчення хвороб птиці Кримської дослідної станції ІЕКВМ

Винахід відноситься до біології, медичної та ветеринарної мікробіології і може бути використаний при виробництві біологічно активних препаратів діагностичних цитробактерних антигенів, імунних сироваток, вакцин. Має загально теоретичне значення при вивченні міжродових зв'язків *Citrobacter* і бактерій роду *Salmonella*.

Бактерії роду *Citrobacter* складають самостійну групу родини *Enterobacteriaceae* (Bergey's, 1984). Однак, за ферментативними та серологічними властивостями вони схожі з сальмонелами. Згідно первинної класифікації вони входили до триби *Salmonellae* (Edward P. Ewing W. 1972). Серологічно однакові або близькі штами *Citrobacter* і *Salmonella* мають ідентичну або дуже схожу структуру вуглеводів їх О-антигенів. Деякі серологічні групи *Citrobacter* володіють Vi-антигеном, який серологічно ідентичний з Vi-антигеном *Salmonella typhimurium* і *Salmonella paratyphi C*.

Бактерії роду *Citrobacter* зустрічаються досить часто, але їх виділення та вивчення у Радянському Союзі не приділялося уваги. Згідно літературних даних деякі серовари цитробактеров можуть викликати як спорадичні випадки так і спалахи захворювань у людей, які протікають по типу харчових токсикоінфекцій. Вони можуть виділятися у якості етіологічного агента при інфекціях сечовиховивідних шляхів, отітах, остеомієлітах, менінгітах (Килессо В. А., 1985).

У дослідях Бортнічук В., Садовський В., Соколіна Н. (1997) показали етіологічну роль цитробактера у виникненні шлунково-кишкових захворювань новонароджених телят. У пробах фекалій хворих телят регулярно виділялися ентеробактерії таких видів *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*. У тільних корів встановлена серологічна позитивність до представників *Citrobacter*, *E. coli*, *Yersinia* при значних тирах 1:128 - 1:256, що свідчить заданими авторів про їх патогенні властивості. При вивченні факторів патогенності встановлено, що цитробактери являються вірулентними для білих мишей, володіють гемолітичною активністю.

Ізольований нами штам має переваги перед відомим штамом, в зв'язку з його видовим походженням від курей, що може бути використано при виготовленні вакцин та діагностичних препаратів для птахів.

Штам *Citrobacter freundii galinarum* має наступні характеристики:

Культурально-морфологічні ознаки. Бактерії представляють собою дрібні, рухливі палички. За Грамом фарбуються негативно. Добре ростуть на звичайних живильних середовищах, з pH 7,2-7,4, оптимальна температура інкубування 37-37°C. Термін інкубування 24-48 годин.

(13) A

(11) 61253

(19) UA

При рості на м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) викликають рівномірне помутніння, з невеликим осадом. На м'ясо-пептонному агарі (МПА) - утворюють невеликі колонії, округлі, прозорі. На диференціальному середовищі Ендо колонії безкольорові із сірватим відтінком, на середовищі Плоскірева - ріст у вигляді випуклих колоній які фарбуються у тон середовища (лактозонегативні варіанти), на вісмут-сульфатному агарі через 48 годин інкубації цитробактер дає пишний ріст у вигляді чорних колоній без редукційної зони під колоніями, ріст супроводжується характерним неприємним запахом.

#### Фізіолого-біохімічні характеристики

Ріст бактерій не подавляється на середовищах, які містять жовчні солі та діамантовий зеле-

ний, спроможні утилізувати натрію цитрат та використовувати його у якості єдиного джерела вуглецю. На середовищі Гісса з додаванням індикатора Андреде, вуглеводів, багатоатомних спиртів ферментує глюкозу з утворенням газу, а також ферментує маніт, рамнозу, сорбіт, арабінозу, лактозу, інозит. Бактерії утворюють сірководень, не утворюють індолу, не розріджують желатину.

Біохімічні маркери для диференціації цитробактер у від сальмонел.

Цитробактерії не володіють лізин декарбоксилазою, сальмонели декарбоксилують лізин. Цитробактерії ростуть на середовищах у присутності ціаніду калію (KCN), ріст сальмонел на середовищі з KCN відсутній або із запізненням. Біохімічні маркери представлені у таблиці.

Таблиця

Основні тести для диференціації цитробактера від сальмонел

| Ріст на диференціальних середовищах  | Цитробактер  | Сальмонелла   |
|--------------------------------------|--|---|
| Вісмут-сульфатний агар               | Через 48 годин інкубації дає багатий ріст, утворюючи чорні колонії без редукційної зони під колонією | Через 24-48 годин інкубації утворюють чорні колонії з металевим блиском, при цьому і спостерігається редукційна зона під колонією чорного кольору |
| Ріст на середовищі, що утримує лізин | Не карбоксилує лізин   | Карбоксилує лізин   |
| Ріст на середовищі з ціанідом калію  | Росте в присутності KCN  | Ріст відсутній  |

Вірулентність. Штам *Citrobacter freundii gallinarum* володіє вірулентністю для курчат добоового та десятиденного віку. Інтраорбітальне введення добоової бульйонної культури в об'ємі 0,2 см<sup>3</sup>, яка містить 10<sup>8</sup> мікробних клітин викликало розвинення генералізованої форми кишкової інфекції. Захворювання протікало в гострій та під гострій формі, супроводжувалося гібеллю до 50% серед добоових курчат та 30% у десяти денних. При вивченні серологічного статусу птахів, що одужали встановлена серопозитивність до цитробактерного антигену в реакції аглютинації (РА). Титри антитіл були низькими 1:1 - 1:4 (0,7+0,1 log<sub>2</sub>) у курчат інфікованих в добоовому віці. Більш великі титри антитіл 1:8 - 1:16 (3,7 + 0,2 log<sub>2</sub>) виявили у курчат, інфікованих у 10 денному віці.

Антигенні властивості, спроможність до антитілоутворення в організм і дорослих курей.

Формували групи дорослих курей (250 денного віку) по 10 голів в дослідній та контрольній групах. Птицю інфікували шляхом інтраорбітального введення бульйонної культури цитробактера в об'ємі 0,2 см<sup>3</sup>, що містить 10 мікробних клітин.

Серологічний статус у курей визначали перед зараженням та після інфікування через 14 діб. Зразки сироваток крові досліджували в реакції аглютинації, користуючись мікротитратором. Також в якості антигену використовували змив бактеріальної культури *Citrobacter freundii gallinarum*, інактивовану 0,4% розчином формаліну. На 14 добу після інфікування у курей в сироватці крові реєстрували антитіла в достатньо високих титрах 1:64 - 1:128. Клінічних ознак хвороби не сп-

стерігали. В контрольній групі сероконверсії не встановлено.

Епідеміологічний маркер. В зв'язку з широким розповсюдженням цитробактера в природі, наявністю його серологічних варіантів, що об'єднують 32 серологічних О-групи та 88 Н-антигенів в 75 композиціях, його мінливостю, важливим являється розробка епідеміологічного маркера. За нашими спостереженнями встановлені наступні ознаки маркерів:

- у дорослих курей спостерігається латентна форма інфекції без прояву клінічних ознак захворювання, що характеризується порушенням яйцесекретності. Місце локалізації *Citrobacter freundii gallinarum* у дорослих курей - жовткові фолікули, захворювання супроводжується їх запаленням. Курчат добоові та десяти денні при експериментальному інфікуванні хворіють кишковою формою інфекції.

Спосіб отримання штаму та його ідентифікація. Проводять діагностичний забій курей, що мають порушення функції яйцесекретності або позитивно реагуючи із еритроцитарним пупорним антигеном *Sal pullorum-gallinarum*, відбір курей для діагностичного забою проводять до застосування антибіотиків або інших хімотерапевтичних препаратів. Матеріалом для бактеріологічного дослідження являється пунктат жовткових фолікулів, тому що у дорослих курей жовткові фолікули являються переважливим місцем локалізації збудника інфекції. До посіву приступають як можна раніше безпосередньо у секційного столу. Досліджуваний матеріал засівають прямим посівом у чашки із щільними селективно-

диференціальними середовищами агар Ендо, Плоскірева, вісмут-сульфідний агар. Наносять 1-2 краплини пунктату на поверхню агару, розтирають безперервними рухами шпателем на невеликій ділянці агару, після чого відривав шпатель продовжують розтирати поверхню що лишилася незасіяною. Посіви витримують при 37°C протягом 18-20 годин (48 годин для інкубації на вісмут-

сульфідному агарі). Вивчають характер росту на щільних живильних середовищах.

Ураховують розмір, форму, колір колоній, утворення пігменту, наявність специфічного запаху. Від первісної оцінки колоній залежить кінець бактеріологічного дослідження. При наявності колоній характерних для цитробактера вони підлягають відсіву для біохімічних досліджень.