
СИБИРСКИЙ ВЕСТНИК

СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
НАУКИ



2

2006

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ИНДИКАЦИЯ *FUSOBACTERIUM NECROPHORUM*
БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ И С ПОМОЩЬЮ
ГНЕЗДОВОЙ ПЦР//Сиб.вест.с.-х.наук, №2 .- 2006.-С.92-96

А.А. САМОЛОВОВ, доктор ветеринарных наук,
СВ. ЛОПАТИН, кандидат ветеринарных наук,
Ю.Д. КАРАВАЕВ, доктор ветеринарных наук,
В.И. СЕМЕНИХИН, И.Н. СЕМЕНОВА, кандидаты ветеринарных наук

Приведены результаты сравнительной индикации *Fusobacterium necrophorum* с помощью бактериологического исследования и использования полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гнездовыми праймерами. Показана специфичность разрабатываемой диагностической тест-системы: положительный анализ продуктов ПЦР получали только тогда, когда в качестве матрицы использовали ДНК *F. necrophorum*, отрицательный - при использовании ДНК других микроорганизмов. Во всех случаях бактериологическое исследование биоматериала из пораженных конечностей при положительной биопробе на белых мышах совпадало с положительным результатом ПЦР.

Основным способом лабораторной диагностики некробактериоза крупного и мелкого рогатого скота является бактериологическое исследование: микроскопия мазка, посев на питательные среды, биопроба на лабораторных животных. Эти методы диагностики направлены в основном на выделение *F. necrophorum* без учета его вирулентности. По этому признаку у микроба различают три основных {А, В и С) и один промежуточный (АВ) биотипа. Биотип А считается наиболее вирулентным, его чаще выделяют из абсцессов печени крупного рогатого скота и называют *F. necrophorum* subsp. *necrophorum*. Биотип В менее вирулентный, его выделяют из содержимого рубца и называют *F. necrophorum* subsp. *fundiliforme*. Промежуточный биотип АВ в основном находят в пораженных конечностях крупного рогатого скота и овец, а также в органах, поражения которых первично вызваны биотипами Л и В. Биотип С в настоящее время признан апатогенным и выделен в специальный вид *F. pseudonecrophorum*. Его можно выявить в содержимом рубца, абсцессах и фекалиях [1-4]. По морфологическим признакам все биотипы схожи.

При некробактериозе, особенно его кожной форме, наряду с основным возбудителем в больших количествах присутствует сопутствующая микрофлора: стафилококки, стрептококки, микрококки, кишечная палочка и другие микроорганизмы. Они препятствуют получению чистой культуры, а также постановке своевременного и правильного диагноза, на который затрачивается 8-10 сут, а в случае значительного обсеменения биологических образцов вульгарной микрофлорой это время увеличивает ся на 6-10 дней.

В настоящее время наиболее чувствительными и специфичными признаны способы диагностики инфекционных болезней, основанные на выявлении генома возбудителя в биологическом материале с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющей сократить сроки диагностических исследований до 1-2 дней и обнаружить возбудителя при очень низких концентрациях его.

Цель настоящего исследования - определение эффективности диагностики некробактериоза в ПЦР в сравнении с традиционным бактериологическим методом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Биологические образцы для исследований отбирали у крупного рогатого скота по клиническим показаниям. Выделение культур *F. necrophorum* на питательных средах и заражение лабораторных животных проводили согласно "Методическим указаниям по лабораторной диагностике некробактериоза животных" [5]. Выделение хромосомной ДНК *F. necrophorum* осуществляли методом ПЦР с гнездовыми праймерами по разработанной нами ранее методике [6].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Первоначально проверена специфичность разрабатываемой диагностической тест-системы. Положительные анализы продуктов ПЦР получали только тогда, когда в качестве матрицы использовали ДНК патогенного возбудителя *F. necrophorum* subsp. *necrophorum*. Анализы были отрицательными, когда использовали ДНК других бактерий: стафилококков, стрептококков, кишечной палочки, протей, микоплазмы (табл. 1).

Таблица 1

Результаты исследований на специфичность праймеров тест-системы		
Культура	ПЦР с праймерами	
	Наружные	Внутренние
<i>Staphylococcus aureus</i>	Отрицательно	Отрицательно
<i>Staphylococcus albus</i>	»	»
<i>Streptococcus pyogenes</i>	»	»
<i>Streptococcus epidermitis</i>	»	»
<i>Escherihia coli</i>	»	»
<i>Salmonella dublin</i>	»	»
<i>Proteus vulgaris</i>	»	»
<i>Fusobacterium necrophorum</i> , ВИЭВ-1	»	Положительно
<i>Fusobacterium necrophorum</i> , ВИЭВ-2	»	»
<i>Fusobacterium necrophorum</i> , ГНУ ИЭВСидВ	»	»
Дистиллированная вода	»	Отрицательно

Затем провели тестирование возбудителя некробактериоза в пробах, полученных от коров из разных хозяйств Кемеровской, Новосибирской областей и Алтайского края. Пробы взяты от животных по клиническим показаниям. Данные бактериологического, биологического исследований и ПЦР биологических образцов, отобранных от животных, подозреваемых в инфицировании *F. necrophorum* subsp. *necrophorum*, приведены в табл. 2.

Результаты исследований биологических образцов на некробактериоз

№ проб	Исследуемый материал	Бактериологическое исследование		ПЦР с праймерами	
		Питательные среды и биопроба	Получена чистая культура	наруж-ными	внутрен-ними
1	2	3	4	5	6
	Фаланга:				
1	1	+	+	-	+
2	2	+	-	-	+
3	3	+	-	-	+
4	4	+	+	-	+
5	5	+	+	-	+
6	6	+	-	-	+
7	7	+	-	-	+
8	8	+	-	-	+
9	9	+	+	-	+
10	10	+	+	-	+
11	Костный мозг фаланги	+	+	+	+
12	Кровь фаланги	+	-	-	+
	Абсцесс печени:				
13	1	+	-	-	-
14	2	+	-	-	-

1	2	3	4	5	6
15	3	+	+	-	
13	4	+	-	-	+
14	5	+	-	-	+
15	6	+	+	-	+
16	Абсцесс мышц	+	-	-	+
17	Биоматериал от мышцы	+	-	+	+
18	Некротический очаг от мышцы	+	-	-	+
19	Стенка рубца	-	-	-	-
20	Содержимое рубца	-	-	-	-
21	Копытцевый рог	-	-	-	-
22	Навоз	-	-	-	-
23	<i>F. necrophorum</i> из коллекции	+	-	-	+
24	<i>F. necrophorum</i> лиофилизиров. 1	+	Не исслед.	-	+
25	<i>F. necrophorum</i> лиофилизиров. 2	+	»	-	+
26	<i>F. necrophorum</i>	+	+	-	+

Во всех случаях бактериологическое исследование биоматериала из пораженных конечностей (фаланга, костный мозг и кровь фаланги) при положительной биопробе на белых мышках совпадало с положительным результатом ПЦР, преимущественно с внутренним праймером. Отрицательные результаты исследования биоматериала (стенка и содержимое рубца, копытцевый рог, навоз) также совпадали с отрицательным исследованием ПЦР. При исследовании абсцессов печени совпадение составило 50 %.

ВЫВОДЫ

1. Разработанная диагностическая тест-система полимеразной цепной реакции с гнездовыми праймерами обладает строгой специфичностью и позволяет выявлять в биологических образцах патогенный биотип *AB F. necrophorum subsp. necrophorum*.

2. Диагностическое исследование биологических образцов из пораженных конечностей на некробактериоз бактериологическим методом и полимеразной цепной реакцией тождественно.

3. ПЦР с гнездовыми праймерами для выявления *F. necrophorum subsp. necrophorum* может быть использована в качестве экспресс-метода для диагностики кожной формы некробактериоза,

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Hodgson A.L.M. Restriction fragment length polymorphism analysis of *Fusobacterium necrophorum* using a novel repeat DNA sequence and a 16 rRNA gene probe / A.L.M. Hodgson, L.A. Nicholson, T.A. Doran et al. // FEMS Microbiol. Lett. - 1993. - Vol. 108. - P. 205-210.
- Nicholson L.A. Phylogenetic relationship of *Fusobacterium necrophorum* A, AB, and B biotypes based upon 16 rRNA gene sequence analysis / L.A. Nicholson, C.J. Morrow, L.A. Corner et al. // Int. J. Syst. Bacteriol. - 1994. - Vol. 44, N 2. - P. 315-319.
- Emery D.L. Cultural characteristics and virulence of strains of *Fusobacterium necrophorum* isolated from the feet of cattle and sheep / D.L. Emery, J.A. Vaughan, B.L. Clark, D.L. Steward // Austr. Vet. J. - 1985. - Vol. 62. - P. 43-46.
- Shinjo T. Recognition of boivar C of *Fusobacterium necrophorum* (Flügge) Moore and Holdeman as *Fusobacterium pseudonecrophorum* sp. nov., nom. rev. (ex Prevot 1940) / T. Shinjo, K. Hiraiwa and S. Miyazato // Int. J. Syst. Bacteriol. - 1990. - Vol. 40. - P. 71-73.
- Методические указания по лабораторной диагностике некробактериоза (утверж. ГВУ Госагропрома СССР 1 июня 1987 г.). - М, 1987. - 4 с.
- Семенихин В.И. Выделение хромосомной ДНК *Fusobacterium necrophorum* / В.И. Семенихин, А.А. Самоловов, С.В. Лопатин // Научное обеспечение ветеринарных проблем в животноводстве. - Новосибирск, 2000. - С. 63-66.

**COMPARATIVE INDICATION OF *FUSOBACTERIUM NECROPHORUM*
BY BACTERIOLOGICAL METHOD AND WITH THE HELP
OF NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)**

**A.Samolovov, S.Lopatin, Yu.Karavaev, V. Semenikhin,
I.Semionova**

Results of comparative indication of *Fusobacterium necrophorum* with the help of bacteriological analysis and using polymerase chain reaction (PCR) with nested primers are presented. The developed diagnostic test system specificity is shown: the positive analysis of PCR products takes place only then DNA *F. necrophorum* was used as a matrix, the negative analysis takes place when using DNA of the other microorganisms. At the positive biological test on white mice in all cases the bacteriological analysis of biomaterial from affected extremities coincided with the positive PCR result.

*Поступила в редакцию
11:112005*

*Институт экспериментальной ветеринарии
Сибири и Дальнего Востока,
Всероссийский институт экспериментальной ветеринарии*