

## Studiu privind patogenitatea și capacitatea imunogenă a microorganismului *Fusobacterium necrophorum*

### Study on the pathogenicity and immunogenic capacity of the microorganism *Fusobacterium necrophorum*

Andrei Nanu, Constantin Chiurciu, Costin Stoica  
Romvac Company S.A.

[nanu.andrei.vet@gmail.com](mailto:nanu.andrei.vet@gmail.com)

**Cuvinte cheie:** *Fusobacterium necrophorum*, pododermatite necrobacilare, ovine, vaccin, imunizare.

**Key-words:** *Fusobacterium necrophorum*, necrobacillary pododermatitis, ovine, vaccine, immunization.

#### Rezumat

Prezentul studiu este adresat medicilor veterinari, cercetătorilor cât și crescătorilor de ovine, caprine și bovine, și are ca scop prezentarea unei metode profilactice eficiente în lupta cu pododermatitele necrobacilare. Patogenitatea și stabilirea dozei minime letale la șoareci, au facilitat demonstrarea capacității imunogene și efectului protector a unei suspensii inactivate de *Fusobacterium necrophorum*. Vaccinarea ovinelor și caprinelor contra necrobacilozei a indus o creștere a anticorpilor cu cel puțin  $2\log_2$ , evidențiată prin reacția de seroaglutinare lentă în tuburi. Scăderea până la dispariție a cazurilor de pododermatită necrobacilară în efectivele de ovine certifică eficacitatea imunizantă a suspensiei vaccinale.

#### Abstract

This study is aiming veterinarians, researchers and breeders of sheep, goats and cattle, and aims to present an effective prophylactic method in the fight against necrobacillary pododermatitis. The pathogenicity and the determination of the minimum lethal dose in mice facilitated the demonstration of the immunogenic capacity and protective effect of an inactivated suspension of *Fusobacterium necrophorum*. Vaccination of sheep and goats against necrobacillosis induced an increase in antibodies by at least  $2\log_2$ , evidenced by the slow seroagglutination reaction in the tubes. The reduction to extinction of cases of necrobacillary pododermatitis in sheep herds certifies the immunizing efficacy of the vaccine suspension.

#### Introducere

Importanța și agresivitatea microorganismelor anaerobe și nesporogene în diferite afecțiuni ale animalelor este cunoscută încă de la începutul secolului trecut, dar cu toate acestea, interesul asupra acestor patogeni a crescut vertiginos în ultimii ani.

Principalul motiv este reprezentat de incidența din ce în ce mai mare a cazurilor clinice produse de aceste microorganisme, acest lucru generând un impact economic negativ, în special în cazul pododermatitelor necrobacilare.

*Fusobacterium necrophorum* este unul dintre agenții infecțioși asupra căruia au stăruit mult eforturile specialiștilor care căutau date despre mecanismul patogen în necrobaciloze.

Acest microorganism este un comensal al tractului digestiv la animale dar se întâlnește și la nivelul aparatului genital femel. În consecință, rezervorul sau sursa acestui agent infecțios va fi una continuă și nu ar putea fi sterilizată sau îndepărtată definitiv.

Datorită caracterului strict anaerob, al statutului pretențios și a sensibilității marcate, izolarea, identificarea și studierea acestui bacil este mult mai dificilă comparativ cu cea a altor bacterii Gram negative.

*Fusobacterium necrophorum* nu prezintă formă de rezistență, prin urmare odată ajuns în afara mediului său de dezvoltare, atmosfera externă bogată în oxigen îl distruge în câteva minute. Cu toate acestea, anumiți factori favorizanți ce țin de mediul extern, cum ar fi umiditatea crescută a așternuturilor, a

padocurilor, pășunilor și saivanelor favorizează crearea unui mediu prielnic supraviețuirii agentului patogen.

Concomitent cu acestea, alți factori favorizanți cum ar fi carențele animalelor, leziunile netratate, excesul de corn și în general igiena necorespunzătoare a acestora duc la apariția patologiilor necrobacilare, printre acestea enumerându-se frecvent pododermatitele ovinelor, caprinelor și bovinelor.

Având în vedere aspectele descrise mai sus și nenumăratele solicitări din partea crescătorilor de animale dar și a medicilor veterinari practicanți, prezentul studiu vine în întâmpinarea acestora cu soluții și rezultate pozitive.

Studiul a urmărit particularități legate de patogenitatea *Fusobacterium necrophorum* și în special capacitatea imunogenă a acestuia.

Studierea patogenității s-a făcut pe șoareci de laborator și s-au urmărit aspectele legate de exprimarea clinică a bolii, modificările anatomopatologice, re izolarea și identificarea microorganismului inoculat din probele prelevate, stabilirea dozei minime letale (DML) precum și a dozei letale absolute (DL<sub>100</sub>).

Studierea capacității imunogene a bacteriei s-a efectuat atât pe animale de laborator (șoareci și iepuri) cât și pe specia țintă – ovine și caprine.

Valoarea imunizantă la șoareci s-a testat prin efectuarea infecției de control iar la iepuri și specia țintă – prin măsurarea nivelului de anticorpi înainte și după vaccinare.

## Materiale și Metode

### Șoarecii

În experiment au fost folosiți șoareci proveniți din tulpinile NMRI și CD1, masculi cu greutatea cuprinsă între 20-30 grame, tip de creștere nonconsangvin și regim liber de germeni patogeni specifici (sursa - *Animaleria SPF, Stațiunea Băneasa, Institutul Cantacuzino*). Șoarecii au fost cazați câte 5, în cuști de plastic, cu furajare și adăpare la discreție.

### Tulpina bacteriană

*Fusobacterium necrophorum* "ATCC 25286" TL<sub>2</sub>/2017, păstrată în baia de azot lichid la -196 °C. Pentru testări, a fost preparată cultura bacteriană de 24 de ore cu concentrația cuprinsă între 1x10<sup>5</sup> Unități Formatoare de Colonii (UFC) /ml și 1x10<sup>7</sup> UFC/ml.

### Cultura bacteriană și inocularea

Culturile inocul au fost preparate prin două repicaje succesive la intervale de 48 și 24 de ore pe medii de cultură speciale pentru dezvoltarea bacteriilor anaerobe.

După atingerea maturității s-a efectuat numărătoarea totală de germeni a culturilor, iar din diluțiile zecimale efectuate au fost inoculați șoarecii pe cale subcutanată, cu câte 0,5 ml / cap. Testarea patogenității și stabilirea dozei minime letale au fost efectuate în 3 experimente, cu diferite culturi bacteriene preparate separat.

Numărul de șoareci inoculați cu diferite concentrații bacteriene este redat în tabelul 1.

**Tabelul 1.**

Numărul de șoareci inoculați cu diferite concentrații bacteriene

Concentrația bacteriană / 0,5 ml	5x10 <sup>6</sup> UFC	5x10 <sup>5</sup> UFC	5x10 <sup>4</sup> UFC	5x10 <sup>3</sup> UFC	5x10 <sup>2</sup> UFC
Numărul de șoareci inoculați	10	15	15	10	5

Ca martori, au fost folosite 3 loturi de câte 5 șoareci, cazați separat dar în condiții identice celor de mai sus.

Unul dintre acestea nu a fost inoculat iar celelalte două au fost inoculate cu suspensie de *Salmonella gallinarum* tulpina 9 R, cu câte 0,5 ml/cap (echivalentul a 2x10<sup>7</sup> UFC).

### Vaccinul și imunizarea

Inducerea imunității s-a realizat cu vaccinul PODOVAC, acesta având ca principiu activă - masă antigenică, *Fusobacterium necrophorum* "ATCC 25286", inactivată cu formaldehidă și adjuvantată cu gel de hidroxid de aluminiu. Au fost inoculate 3 loturi de câte 5

șoareci pe cale subcutanată cu câte 0,5 ml de vaccin, de două ori la interval de 14 zile.

Alte 3 loturi de câte 5 șoareci au fost folosite ca martori nevaccinați. După 2 săptămâni de la vaccinarea de rapel, s-a

efectuat infecția de control, toate cele șase loturi fiind inoculate cu suspensie bacteriană vie de *Fusobacterium necrophorum*, în concentrații diferite, acestea fiind redată în tabelul 2.

**Tabelul 2**

Inocularea cu suspensie bacteriană vie de *Fusobacterium necrophorum*, în concentrații diferite

Nr. Lot / categoria	Lot 1	Lot 2	Lot 3	Lot 4	Lot 5	Lot 6
	vaccinați	M / nevaccinați	vaccinați	M / nevaccinați	vaccinați	M / nevaccinați
Concentrația inoculată	5x10 <sup>6</sup> UFC		5x10 <sup>5</sup> UFC		5x10 <sup>4</sup> UFC	

Testarea capacității imunizante prin măsurarea nivelului de anticorpi serici, s-a efectuat în 4 experimente diferite și au fost inoculate în total 41 de ovine, 15 caprine și 5 iepuri, pe cale subcutanată cu câte 2 ml de suspensie vaccinală. Vaccinarea de rapel a fost făcută după 4 săptămâni la ovine și caprine iar la iepuri – după 14 zile de la prima inoculare.

Probele de sânge recoltate înainte de prima vaccinare și după două săptămâni de la vaccinarea de rapel, au fost testate pentru determinarea nivelului de anticorpi.

Testarea s-a efectuat prin Reacția de Seroaglutinare Lentă (RSAL) în tuburi cu suspensie inactivată de *Fusobacterium necrophorum* concentrată până la obținerea turbidității corespunzătoare standardului 1,5 McFarland (Antigen FN 1,5McF). Ovinele și caprinele testate faceau parte din 5 efective care însumau 1879 de animale, fiind și acestea incluse în programul de vaccinare. Unitățile respective au fost incluse în programul de testare pentru că incidența pododermatitelor necrobacilare era crescută și frecventă.

## Rezultate

### Patogenitate, DL<sub>100</sub> și DML

*Fusobacterium necrophorum* inoculat în concentrație de peste 5x10<sup>3</sup> UFC s-a dovedit a fi patogen pentru șoareci, aceștia prezentând ca semne clinice de boală - letargie, apatie, horipilație și inflamație cianotică la locul inoculării. Severitatea semnelor clinice a fost direct proporțională odată cu creșterea concentrației inoculate, finalizându-se cu exitus de 100% la concentrația de 5x10<sup>6</sup> UFC. La examenul anatomopatologic s-a identificat

edem, inflamație necrotico-cazeoasă și emfizem la locul inoculării.

Din probele de ficat recoltate pentru examenul bacteriologic s-a izolat și identificat *Fusobacterium necrophorum*, caracterele culturale ale acestuia fiind superioare tulpinei mamă. Concentrația bacteriană inoculată care a produs starea de exitus la toate animalele dintr-un lot a fost 5x10<sup>6</sup> UFC, aceasta reprezentând DL<sub>100</sub>.

Concentrația minimă de bacterii care a produs semne clinice de boală la toate animalele și moartea unui singur animal din același lot, reprezintă DML și este 5x10<sup>4</sup> UFC.


Atât șoarecii martor neinoculați cât și cei inoculați cu *Salmonella gallinarum* 9R (cu o concentrație bacteriană de 4 ori mai mare decât cea a șoarecilor inoculați cu DL<sub>100</sub> de *Fusobacterium necrophorum*), nu au prezentat reacții locale sau generale.

### Imunizare

Verificarea instalării stării de imunitate la loturile de șoareci vaccinați s-a efectuat prin infecția de control cu cultură vie de *Fusobacterium necrophorum* cu concentrație bacteriană începând de la DML până la DL<sub>100</sub>.

Prin urmare, atât loturile martor cât și cele vaccinate au fost inoculate conform tabelului Nr.2. Șoarecii martor inoculați cu DML au făcut semne clinice de boală în proporție de 100% și au murit în proporție de 20%. Spre deosebire de aceștia, cei din lotul vaccinat, inoculați cu DML, nu au prezentat semne clinice de boală și au rezistat în proporție de 100%. În tabelul 3 sunt cumulate rezultatele testărilor efectuate pe șoareci vaccinați și nevaccinați, acestea sunt exprimate procentual.

**Tabelul 3.**  
Rezultatele testărilor efectuate pe șoareci vaccinați și nevaccinați

Statusul imun al animalelor Concentrația bacteriană inoculată	Șoareci nevaccinați (neimunizați)	Șoareci vaccinați (imunizați)
$5 \times 10^6$ UFC	- 100% semne clinice de boală - 100% exitus	- 100% semne clinice de boală - 80% exitus
$5 \times 10^5$ UFC	- 100% semne clinice de boală - 80% exitus	- 100% semne clinice de boală - 60% exitus
$5 \times 10^4$ UFC (DML)	- 100% semne clinice de boală - 6,6% exitus	- <b>0% semne clinice de boală</b> - <b>0% exitus</b>
$5 \times 10^3$ UFC	- 20% semne clinice de boală - 0% exitus	
$5 \times 10^2$ UFC	- 0% semne clinice de boală - 0% exitus	

Determinarea nivelului de anticorpi serici anti *Fusobacterium necrophorum* prin RSAL presupune conjugarea antigenului inactivat (descriș în capitolul anterior) cu anticorpii liberi din serul animalelor. Aceștia au crescut postvaccinal la toți iepurii cu cel puțin  $3 \log_2$  față de valoarea inițială înainte de imunizare. Vaccinarea ovinelor și caprinelor a indus o creștere a nivelului de anticorpi cu  $2 \log_2$  la 90% din animalele testate.

### Concluzii

Exprimarea efectului patogen al *Fusobacterium necrophorum* este dependentă de cantitatea bacteriană inoculată.

Doza minimă letală la șoarece este de 100 de ori mai mică decât doza letală absolută.

Proprietățile culturale ale bacteriei sunt exprimate mai bine după reizolarea acesteia din probele prelevate, murinizarea putând fi o soluție pentru redobândirea caracterelor acestui microorganism. Inactivat și preparat ca vaccin, agentul etiologic al necrobacilozelor, a indus imunitatea protectoare la șoarecii inoculați. Prin urmare, aceștia au rezistat la infecția de control cu doza minimă letală, spre deosebire de cei nevaccinați, care au făcut boala în proporție de 100%. Creșterea titrului de anticorpi detectabili în sângele animalelor, certifică capacitatea imunogenă a suspensiei vaccinale.

În cele 5 efective de ovine cu istoric bogat în incidența afecțiunilor necrobacilare, imunizarea a dus la dispariția și absența

afecțiunilor specifice, acest lucru confirmând concluziile teoretice. Imunizarea cu vaccinul Podovac reprezintă o metodă profilactică eficientă în lupta cu pododermatitele necrobacilare.

### Bibliografie

1. **Kononov AN** (2004). Eficacitatea sistemului de măsuri antiepidemice în necroza copitelor la ovine. Teză de doctorat, Stavropol - 2004.
2. **Panasjuk SD, Sidorchuk AA, Kononov AN.** (2010). Asocierea vaccinului "Nekovak" și "Novikon" în sistemul de măsuri pentru prevenirea și controlul bolilor infecțioase ale bovinelor și rumegătoarelor mici. *Veterinaria* 2010, 8:7-10.
3. **Panasjuk SD, Kononov AN.** (2015). Importanța asocierii microorganismelor în etiologia necrobacteriozei și a necrozei copitelor la ovine. *Vestnik APK din Stavropol*, 2015, 1, pp. 58-62.
4. **Conlon PJ, Hepper KP, George WT.** (1977). Evaluation of Experimentally Induced *Fusobacterium necrophorum* Infections in Mice. *Am Soc Microbiol Infect Immun J.*, pp. 510-517.
5. **Saginala S, Nagaraja TG, Lechtenberg KF, Chengappa MM, Kemp KE, Hine PM.** (1997). Effect of *Fusobacterium necrophorum* leukotoxin vaccine on susceptibility to experimentally induced liver abscesses in cattle. *J Anim Sci.*, 75(4):1160-1166.
6. **Checkley SL, Janzen ED, Campbell JR, McKinnon JJ.** (2005). Efficacy of vaccination against *Fusobacterium necrophorum* infection for control of liver abscesses and footrot in feedlot cattle in western Canada. *Can Vet J.*, 46(11):1002-1007.