



CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI DI *Pasteurella multocida* ISOLATI IN CORSO DI PASTEURELLOSI DA DIVERSE SPECIE ANIMALI

Sebastiani C.¹, Ortenzi R.¹, Biagetti M.¹, Mangili P.¹, Bano L.³, Luppi A.², Cucco, L.¹, Magistrali C.F.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (IZSUM) - Perugia

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna (IZSLER)- Sezione di Reggio Emilia

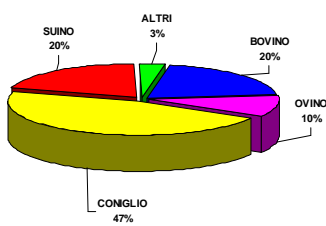
³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE)- Sezione di Treviso

INTRODUZIONE La pasteurellosi si riscontra con frequenza negli allevamenti intensivi provocando ingenti danni economici diretti e indiretti. Sono stati individuati 5 sierotipi capsulari di *P. multocida* (A, B, D, E, F), ciascuno associato, anche se non in senso esclusivo, ad un ospite specifico (1). La patogenicità di *P. multocida* è legata anche alla presenza di fattori di virulenza (2). Scopo del presente lavoro è stato quello di descrivere la distribuzione dei vari sierotipi e tossinotipi di ceppi di *P. multocida* isolati in corso di pasteurellosi da diverse specie animali, mediante l'applicazione di due protocolli di PCR multiplex.

MATERIALI E METODI

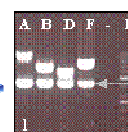
- **Cepi batterici:** 195 ceppi di *P. multocida* di origine diversa collezionati dal 2004 al 2011 nell'ambito dell'attività diagnostica degli Istituti Zooprofilattici
- **PCR multiplex:** utilizzati due protocolli di PCR multiplex, uno per gli antigeni capsulari (3) ed uno per i geni di virulenza (4)

ORIGINE CEPPI BATTERICI



PCR MULTIPLEX

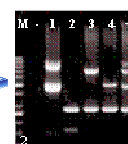
Geni target	Sierogruppo	Grandezza amplificata (bp)
KMT1	tutti	460
hyaD-hyaC	A	1044
tcbD	B	760
dcbF	D	657
ecbJ	E	511
fcbD	F	851



KMT1 (gene specie-specifico)

PCR ANTIGENI CAPSULARI

Fattori di virulenza	Descrizione	Grandezza amplificata (bp)
hgbB	Hemoglobin binding protein	499
pfhA	Filamentous hemagglutinin	275
tbpA	Transferrin binding protein	728
toxA	Dermonecrotic toxin	846



PCR GENI DI VIRULENZA

RISULTATI E DISCUSSIONE I protocolli utilizzati per la tipizzazione molecolare di *P. multocida* hanno permesso di identificare il tipo capsulare ed i geni codificanti per i fattori di virulenza, offrendo un metodo rapido ed alternativo ai test fenotipici. Nella popolazione in esame è stata riscontrata la presenza di tutti gli antigeni capsulari ad eccezione del tipo E, il tipo A è quello più ampiamente rappresentato in tutte le specie.

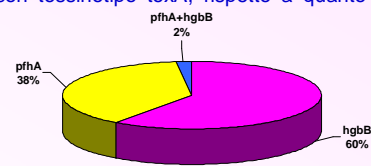
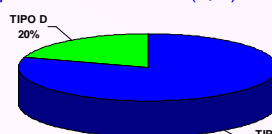
	Bovino		Ovino			Suino		Coniglio			
	Tipo A	Tipo D	Tipo A	Tipo D	Tipo F	Tipo A	Tipo D	Tipo A	Tipo B	Tipo D	Tipo F
hgbB	10%	25%	/	/	5%	42,5%	17,5%	29,5%	/	18%	3,5%
hgbB+pfhA	/	/	/	/	/	/	2,5%	8%	/	/	/
hgbB+toxA	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
pfhA	3%	/	/	/	/	37,5%	/	18,5%	/	/	21,5%
pfhA+tbpA	82%	20%	/	/	/	/	/	/	1%	/	/
tbpA	5%	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
tbpA+toxA	/	45%	5%	/	/	/	/	/	/	/	/
No fatt. vir.	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Tabella 1. Distribuzione dei geni di virulenza per tipo capsulare nelle varie specie analizzate

SUINO

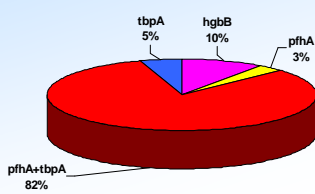
I ceppi sono stati isolati principalmente da polmoniti; il sierotipo A è stato quello più frequentemente identificato in associazione ai geni *pfhA* o *hgbB* (Tab. 1).

Il 20% dei campioni è risultato di tipo D, perlopiù associato con il gene *hgbB* (Tab. 1). I ceppi esaminati non provenivano da casi di rinite atrofica progressiva, e questo può giustificare il basso numero di isolati appartenenti al sierotipo D (5) con tossinotipo *toxA*, rispetto a quanto riportato in letteratura (6, 7).



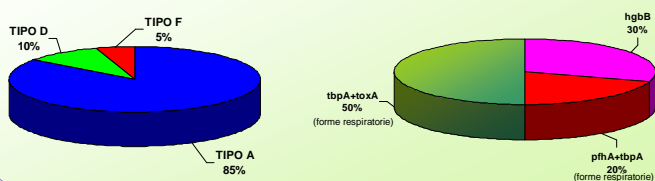
BOVINO

Nei ceppi prevalentemente isolati in corso di forme respiratorie l'unico sierotipo riscontrato è stato il tipo A per lo più associato alla combinazione dei geni di virulenza *pfhA* e *tbpA* (Tab. 1)



OVINO

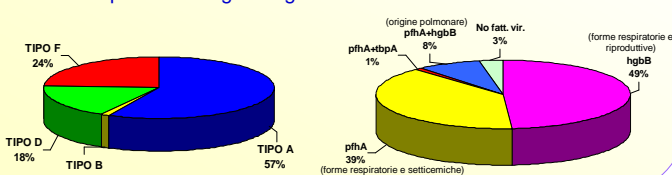
Nei ceppi isolati prevalentemente da forme respiratorie, il tipo capsulare più rappresentato è il tipo A in associazione con *tbpA+toxA* o *tbpA+pfhA* (Tab. 1). Nei pochi casi di mastite esaminati il profilo riscontrato è risultato il medesimo.



CONIGLIO

Tutti i tipi capsulari sono stati osservati ad eccezione dell'E, con una prevalenza del tipo A e del tipo F. Nelle forme respiratorie si riscontrano prevalentemente i tossinotipi *pfhA* o *hgbB* (Tab. 1).

Solo negli stipti di origine polmonare sono stati riscontrati entrambi questi due geni. Nelle forme setticemiche predomina il gene *pfhA* e nelle forme riproduttive il gene *hgbB*.



CONCLUSIONI La tipizzazione molecolare in corso di focolai di malattia fornisce uno strumento diagnostico per la valutazione del ruolo patogeno dei ceppi isolati. Inoltre, può essere impiegata nel processo di selezione degli stipti per l'allestimento di vaccini stabulogeni.

BIBLIOGRAFIA 1) Mutters R., et al. (1989) "Taxonomy of the group. In: Adlam C., Rutter J.M. (Eds). Pasteurella and Pasteurellosis. Academic Press, London, pp. 3-34". 2) Tang X., et al. (2009) "Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of Pasteurella multocida strains from swine in China" J Clin Microbiol 47: 951-958; 3) Kirsty M., et al. (2001) "Genetic organization of Pasteurella multocida cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system" J Clin Microbiol 39: 924-929; 4) Atashpaz S., et al. (2009) "Rapid virulence typing of Pasteurella multocida by multiplex PCR" Res Vet Sci 87: 355-357; 5) Harper M., et al. (2006) "Pasteurella multocida pathogenesis: 125 years after Pasteur" FEMS Microbiol Lett. 265: 1-10; 6) Dziva F., et al. (2008) "Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with Pasteurella multocida" Vet Microbiol 128: 1-22; 7) Ewers C., et al. (2006) "Virulence genotype of Pasteurella multocida strains isolated from different hosts with various disease status" Vet Microbiol 114:304-317;