

Caractérisation biochimique et moléculaire des souches de *Pasteurella multocida* isolées dans des élevages de lapins en Italie. Etude descriptive.

A. CERRONE¹, J.I.BADIOLA-SÁIZ², A.M. PEREZ DE ROZAS², J. GONZALEZ²,
A.G. PERUGINI¹, D. FENZIA¹, F. CAPUANO¹, M. BARTOLI¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno - Via Salute 2, 80055 Portici (NA), Italie.

²CRESA (Centre de Recerca en Sanitat Animal), Campus de Bellaterra, Edifici V
08193-Bellaterra, Barcelona, Espagne.

Résumé. Cette première partie de l'étude décrit les résultats concernant l'organe d'isolement, le diamètre des colonies après 17 et 24h d'incubation et les mesures de la croissance des colonies pour 141 souches de *P. multocida* isolées chez les lapins de 47 élevages italiens (Campanie). On a observé aussi la présence/absence d'ornithine décarboxylase (ODC) et on a caractérisé les souches par les techniques biochimiques et moléculaires (REP-PCR). En particulier, on a déterminé, sur la base de la cinétique biochimique, 14 clusters avec une similarité relative (SR) égale à 90%, 16 clusters, sur la base de l'intensité des bandes, avec une SR égale à 65% et 22 clusters avec une Dice distance (DD) égale à 45 sur la base de l'analyse des bandes.

Abstract- Identification and typing of *Pasteurella multocida* strains isolated from Italian rabbitries analysed by biochemical and molecular techniques. This first part of the study regards the phenotypic analysis (diameter and growth speed of the colonies, biochemical kinetics) and the genotypic one (REP-PCR) of 141 *P. multocida* strains isolated in 47 rabbitries in Campania region (Italy). On the basis of the different brake points selected to separate the different genotypes we have obtained the following division: 14 clusters for Biochemical kinetics with a SR (Relative Similarity) of 90%, 16 clusters for REP-PCR (Intensity of the Band) with a SR of 65% and 22 for REP-PCR with a DD (Dice Distance) of 45.

Introduction

Pasteurella multocida est un pathogène très important en médecine vétérinaire et humaine. L'espèce est polymorphe et complexe en ce qui concerne la variation antigénique, l'hôte et le pouvoir pathogène (Hunt *et al.*, 2000).

Ce microorganisme est le pathogène respiratoire le plus courant chez le lapin ; en général il entraîne des pathologies des voies respiratoires supérieures, caractérisées par des rhinites avec l'animal qui éternue souvent, pulvérisant de la sérosité ou du mucus. De multiples autres symptômes sont l'otite moyenne, la conjonctivite, la pneumonie, les abcès, les infections génitales et la septicémie (Deeb *et al.*, 1990).

L'épidémiologie de la Pasteurellose dépendra des conditions d'élevage (élevage fermier et/ou moderne, ou animalerie de laboratoire) et des souches (Kpodékon *et al.*, 1999). De plus, la capacité de provoquer ou non, un tableau clinique particulier ne dépend pas seulement de la souche, mais aussi de l'éventuelle présence simultanée, dans le même animal, de plusieurs souches (Badiola-Sáiz *et al.*, 1992). Dans cette étude nous décrivons les résultats concernant l'organe d'isolement, la dimension des colonies après 17 et 24h d'incubation et la mesure de la vitesse de croissance pour chaque souche. On a observé aussi la présence/absence d'Ornithine Décarboxylase (ODC) et on a caractérisé les mêmes souches par les techniques biochimiques et moléculaires.

1. Matériel et méthodes

Pendant la période 2001-2004, 141 souches de *P. multocida* ont été isolées (Tableau 1) chez des lapins malades qui présentaient des affections plus ou moins graves. Les lapins provenaient de 47 élevages professionnels localisés en Campanie (Italie). L'élevage n'est pas identifié seulement pour 14 souches. Dans tous les cas, des problèmes pathologiques ont été relevés.

Tableau 1: Echantillons totaux

	Nombre (% du total)
Poumon	61 (43,3%)
Utérus	29 (20,6%)
Foie	13 (9,2%)
Sperme	8 (5,7%)
Coeur	6 (4,3%)
Abscès sous-cutané	5 (3,5%)
Milieu	5 (3,5%)
Mamelle	3 (2,1%)
Cavités nasales	1 (0,7%)
Cerveau	1 (0,7%)
Testicule	1 (0,7%)
Pas identifié	8 (5,7%)

Les animaux ont été groupés sur la base de l'âge : femelles, lapereaux (0-28 jours), lapins au sevrage (29-40 jours) et en engraissement (41-80 jours). Pour tous les élevages on a relevé sur une fiche les pathologies et les problèmes de santé des lapins.

1.1. Isolement bactériologique, identification et caractérisation

Les échantillons ont été prélevés de plusieurs organes, sélectionnés sur la base des symptômes et de la présence des lésions. La méthode d'isolement était l'ensemencement sur Gélose Trypcase Soja + 5% de sang de mouton (BioMerieux, 69280 Marcy l'Etoile, France). Les boîtes de pétri ont été incubées à 37°C pendant 24h dans une étuve contenant un bécher rempli d'eau pour maintenir une hygrométrie constante. Après 24h de culture à 37°C on a sélectionné les colonies qui avaient la morphologie d'une souche de *Pasteurella*, et on les a subcultivées en double sur boîtes de pétri avec Gélose Trypcase Soja + 5% de sang de mouton et incubées à 37°C pendant 24h.

L'espèce *P. multocida* est déterminée en fonction de ses caractères biochimiques en utilisant le système Vitek (BioMerieux, Marcy l'Etoile France) selon les instructions fournies par le producteur. Les renseignements obtenus par le système Vitek sont synthétisés avec un graphique de distances qui permet de grouper les souches les plus proches selon leur degré d'homologie. En particulier, on a considéré les changements optiques relevés à chaque heure pour 22 tests biochimiques réalisés par le système Vitek.

En même temps on a fait une coloration de Gram de l'isolat, le test catalase et oxydase et l'ODC (Liofilchem s.r.l., Bacteriology products 64036 Roseto degli Abruzzi, TE).

Les souches ont été cryoconservées : les bactéries prélevées sur milieu solide sont mises en suspension dans le tube de cryoconservation contenant du BHI (Brain Heart Infusion Broth) (Oxoid Australia PtyLtd West Edilberg P.O. box 220, Melbourne Victoria 3081) additionné de 15% de glycérol. Le tube est placé au congélateur à -20°C.

1.2. Diamètre des colonies et vitesse de croissance

Après cette première étape les souches ont été décongelées et mises en suspension dans du BHI et incubées à 37°C pendant 24h pour revitaliser les bactéries. 10 µl de culture bactérienne ont été ensemencés par stries sur Gélose Biotone (Tryptose) Agar (Biolife Italiana s.r.l., Viale Monza 272, 20128 Milano Italia) additionnée de 5% de sérum de cheval (Biolife Italiana s.r.l.). Les colonies de *P. multocida* apparaissent rondes, d'opalescence bleuâtre, irisées à la loupe binoculaire par transillumination oblique à 45°. Le diamètre des colonies bactériennes est mesuré selon la méthode de Rideaud (Rideaud *et al.*, 1992 ; Rideaud et Coudert, 1994). Il est mesuré après 17 et 24h de culture à 37 °C. Le diamètre est mesuré avec un microscope stéréoscopique (grossissement de 9 et précision ± 0,125 mm).

1.3. Caractérisation génotypique

La REP-PCR (*Repetitive extragenic palindromic PCR*) a été effectuée selon la méthode décrite par Versalovic *et al.* (1991) et Townsend *et al.* (1997).

Les souches, caractérisées par un génotype différent, ont été mises en évidence par l'amplification des séries répétitives, qui ont montré hétérogénéité de nombre et de fréquence de distribution des fragments pour les différentes souches.

Le logiciel utilisé pour la définition du génotype est fondé sur les algorithmes DICE (Detection of Informative Combined Effects) et Manhattan Distances et a été développé avec Microsoft Visual Basic ver.6.0.

2. Résultats

Tableau 2: Région anatomique d'isolement et type d'animaux

Type d'animaux Nb de souches (%)	Nb de	Région Anatomique souches
Mâles 12 (8,5%)	8	Sperme
	1	Poumon
	1	Foie
	1	Testicule
	1	Cavités nasales
Femelles 62 (44%)	29	Utérus
	19	Poumon
	5	Foie
	3	Mamelle
	4	Cœur
	1	Abcès sous-cutanés
	1	Pas identifié
Lapereaux 12 (8,5%)	10	Poumon
	2	Foie
Lapins en sevrage 12 (8,5%)	11	Poumon
	1	Foie
Lapins en engraissement 32 (22,7%)	22	Poumon
	4	Foie
	3	Abcès sous-cutanés
	2	Cœur
	1	Cerveau
Milieu 5 (3,6%)	4	Boîtes exposées (bâtiment engraissement)
	1	Boîtes exposées (bâtiment femelles)
Pas identifié 6 (4,2%)	6	Pas identifié

Aussi bien en ce qui concerne l'aspect clinique, que les isolements, les résultats obtenus mettent en évidence la plus grande incidence des infections à *P. multocida*, chez les femelles (44% des souches isolées, surtout avec des affections de l'utérus et du poumon) et chez les lapins en engraissement (22,7%, avec affections respiratoires). Tout ceci confirme la priorité de la pathologie chez les lapins adultes (Patton, 1988; Di Giacomo, 1992) (Tableau 2).

La Figure 1 représente le degré de similarité parmi les 141 isolats. En particulier, on a déterminé, sur la base de la cinétique biochimique, 14 groupes (clusters) avec une similarité relative (SR) égale à 90%.

Une corrélation positive a été individualisée entre le diamètre des colonies et le pouvoir pathogène des souches isolées parce que toutes ont été obtenues d'animaux malades avec une symptomatologie variable d'un état moyen à grave (Tableau 3).

Les empreintes génétiques obtenues par *REP-PCR* sont très utiles pour une analyse rapide du DNA des isolats de *P. multocida*. Cette technique qui étudie la plupart du génome, donne l'identification génétique la plus exacte de *P. multocida* et représente un moyen pour mener des analyses moléculaires épidémiologiques et pour une caractérisation approfondie des souches de *P. multocida* isolées dans plusieurs organes.

Les fragments obtenus par *REP-PCR* produisent un modèle de bandes (Figures 2 et 3). En particulier, la Figure 2 reproduit un dendrogramme où nous avons reconnu 16 groupes (clusters) avec une similarité relative (SR) égale à 65%. Dans le dendrogramme de la Figure 3 on observe 22 groupes (clusters) avec une Dice distance (DD) égale à 45% avec *REP-PCR* (analyse des bandes, où nous avons considéré simultanément la présence/absence des bandes et leur intensité).

Le tableau 4 reporte les résultats des mesures des diamètres des colonies effectuées après 24h d'incubation et après le test d'ODC. Le diamètre varie de 0,3 et 0,7 mm après 17h d'incubation et de 0,8 et 1,6 mm après 24h pour 22 souches (15,6%) ; ce sont des résultats très importants et ceci conduit à supposer une crédibilité plus grande du résultat obtenu après 24h, compte tenu de la positivité du test ODC car les souches qui forment des petites colonies sont toutes Ornithine Décarboxylase négatives (ODC-) (Rideau et Coudert, 1994). En plus, pour des augmentations de diamètre comprises entre 0,1 et 0,2 mm, nous avons relevé une vitesse de croissance pendant 24h, qui correspond à des augmentations de 0,01 mm/heure.

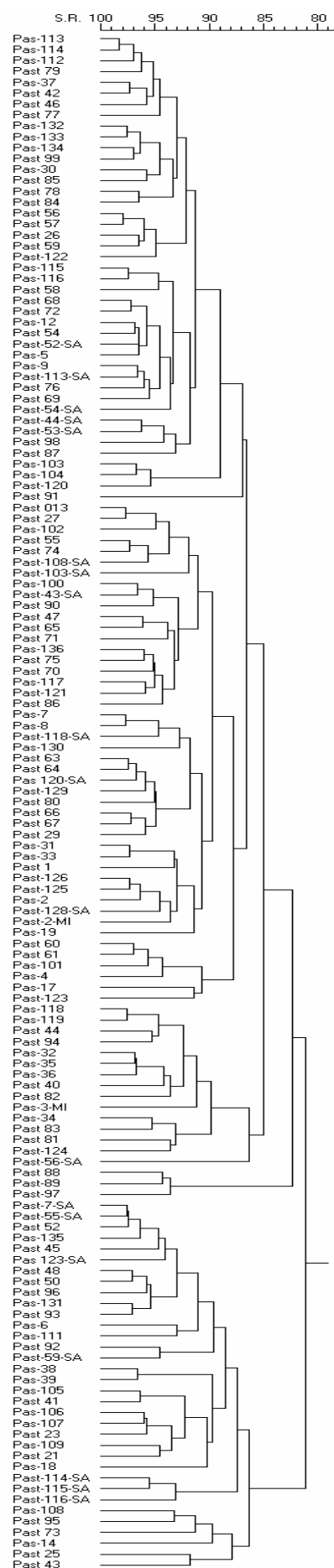


Figure 1 (droite): Dendrogramme des souches isolées dans 47 élevages de lapins – Cinétique biochimique

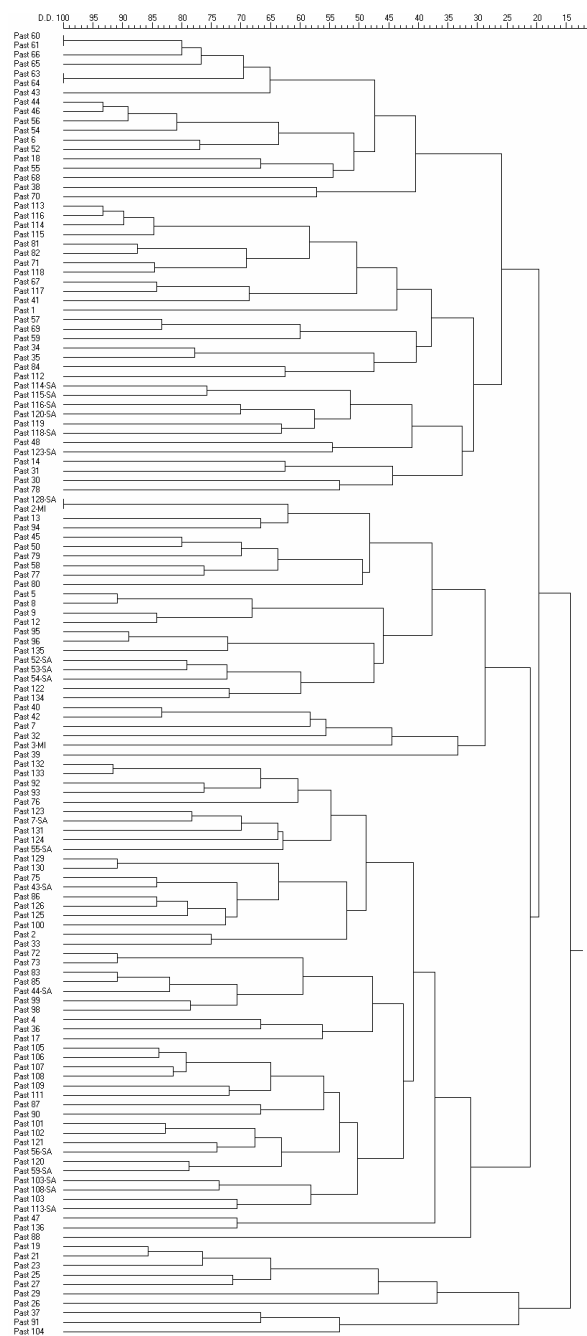
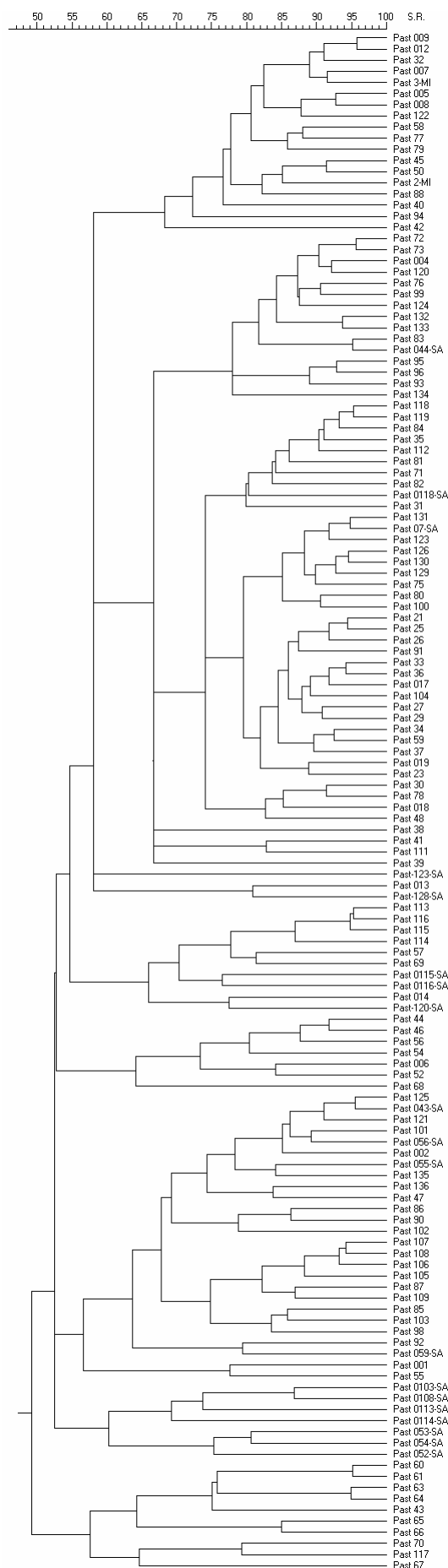


Figure 2 (gauche): Dendrogramme des souches isolées dans 47 élevages de lapins - REP-PCR (Intensité des bandes)

Figure 3 (droite): Dendrogramme des souches isolées dans 47 élevages de lapins - REP-PCR (Analyse des bandes)

Tableau 3: Pathologies relevées dans les élevages d'origine des lapins et catégorie commerciale intéressée

Symptômes relevés dans les élevages d'origine des lapins analysés	Catégorie Commerciale						
	Nb de souches et pathologie reliée						
	Femelles	Mâles	Lapereaux	Lapins en sevrage	Lapins en engraissement	Milieu	Pas identifié
Avortements	12	---	---	---	---	---	1
Infertilité	18	---	---	---	---	2	---
Mammite	3	2	---	---	---	---	---
Abcès		3	---	---	2	---	---
Symptômes respiratoires	9		1	3	10	---	---
Diarrhée	7	2	1	4	11	---	---
Mortalité	2	3	7	---	4	2	---
Mammite et abcès	1	---	---	---	---	---	---
Mammite et avortements	1	---	---	---	---	---	---
Mammite et infertilité	1	---	---	---	2	---	---
Infertilité et symptômes respiratoires	1	---	---	---	---	---	---
Diarrhée et mortalité	3	---	---	2	2	---	---
Avortements, infertilité, mort	2	4	---	---	---	---	---
Avortements, infertilité, abcès	1	---	---	---	---	---	---

Tableau 4: Diamètre des colonies et vitesse de croissance des souches

Nb total de souche s	Diamètre des colonies à 24h* (mesure avec un grossissement de 9 et précision $\pm 0,125\text{mm}$)		Vitesse de croissance pendant 24h (mm/h)
	ODC-	ODC+	
1	0,4	---	0,02
10	---	0,7 – 0,8	0,03
23	---	0,9 - 1	0,04
20	---	1,1 – 1,3	0,05
12	---	1,4 – 1,5	0,06
12	---	1,6 – 1,7	0,07
16	---	1,8 - 2	0,08
3	---	2,1 – 2,2	0,09
12	---	2,3 – 2,5	0,10
4	---	2,6 – 2,7	0,11
4	---	2,8 – 2,9	0,12
9	---	3 – 3,1	0,13
1	---	3,3	0,14
3	---	3,5 – 3,7	0,15
1	---	3,8	0,16
4	---	4	0,17

* pour 6 souches on n'a pas relevé la mesure

Conclusion

Pendant les années les plus récentes on a développé des techniques qui permettent de mettre en évidence les similarités et les différences parmi des souches bactériennes et qui se sont révélées très efficaces non seulement pour les études épizootiques, mais aussi pour les études sur la prophylaxie vaccinale (Badiola Saiz *et al.*, 1996).

Avec ces systèmes on peut confronter les dendrogrammes obtenus par la technique biochimique et ceux obtenus par REP-PCR. En outre, on peut mesurer les sélections entre les distributions des dendrogrammes et le degré de virulence. Le rétablissement de l'état de santé des animaux dans les élevages dépend d'une rapide et soigneuse identification des pathogènes intéressés. Longtemps les microbiologistes ont cherché une meilleure identification des pathogènes par l'utilisation des méthodes fondées sur le phénotype. Sûrement l'adoption des méthodes moléculaires peut fournir une analyse exacte et très discriminante des isolats bactériens (Ozbey *et al.*, 2004).

Les relevés phénotypiques (Coudert *et al.*, 1999) (diamètre des colonies, vitesse de croissance) peuvent être utilisés pour la diagnose de Pasteurelloses du lapin avec un niveau de crédibilité élevé pour leur haute valeur pronostique et la simplicité d'exécution. La seconde partie de l'analyse de ces données sera consacrée à l'étude des corrélations entre les différentes caractéristiques biochimiques et génétiques des souches et les paramètres pathologiques enregistrés (fermes, organes, type de pathologie,...)

Remerciements

La recherche a été partiellement financée par le Ministère Italien de la Santé (*Programma per la Ricerca Sanitaria 2001 – Attività di Ricerca Corrente*).

Références

BADIOLA SAIZ J.I., ROSELL J.M., PUJOLS J., PEREZ DE ROZAS A., RAFAEL O., RAMON J., SEGURA L.I., SACO M.M., 1992. Biological features of *Pasteurella multocida* strains isolated from rabbits in the northeast area of Spain. *J. Appl. Rabbit Res.*, 15:1366-1374.

- BADIOLA SÁIZ J.I., PUJOLS J., PEREZ DE ROZAS A.M., SACO M.M., ROSELL J.M., 1996. Theoretical and practical aspects of the differentiation of *Pasteurella multocida* strains through the study of the biochemical kinetics. *Proc. 6th World Rabbit Congress*, Toulouse, vol. III, 23-27.
- COUDERT P., RIDEAUD P., KPODEKON M., 1999. Le point sur les pasteurelloses du lapin. *8ème Journées de la Recherche Cunicole en France*. Paris (FRA), 1999/06/09-10.; 3-12.
- DEEB B.J., DI GIACOMO R.F., BERNARD B.L., SILBERNAGEL S.M., 1990. *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* Infection in Rabbits. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol 2, 70-75.
- DI GIACOMO R.F., 1992. Natural history of *Pasteurella multocida* infection in rabbits. *J. Appl. Rabbit Res.* 15: 1515-1523.
- HUNT M.L., ADLER B., TOWNSEND K.M., 2000. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology*, 72, 3-5.
- KPODEKON M., RIDEAUD P., COUDERT P., 1999. Pasteurelloses du lapin: revue. *Revue Méd. Vét.*, 150, 3, 221-232.
- OZBEY G., KILIC A., ERTAS H.B., MUZ A., 2004. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Pasteurella multocida* and *Manheimia haemolytica* strains isolated from cattle, sheep and goats, 2004. *Vet. Med. – Czech*, 49, (3):65-69.
- PATTON, N.M., 1988. Important factors affecting doe losses. *Proc. 4th World Rabbit Congress*, Budapest, vol III, 83-88.
- RIDEAUD P., COUDERT P., MERCIER P., HERVOUET P., 1992. A comparative study of the virulence of *Pasteurella multocida* from rabbits (*O. cuniculus*). *J.Appl. Rabbit Res.*, 15, 1389-1400.
- RIDEAUD P., COUDERT P., 1994. Identification des souches de *Pasteurella multocida* pathogènes pour le lapin. *VIèmes Journées de la Recherche Cunicole*, La Rochelle 6 & 7 Décembre 1994. Vol.1.
- TOWNSEND K. M., DAWKINS H. J., PAPADIMITRIOU J.M., 1997. REP-PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates that cause haemorrhagic septicaemia.. *Res. Vet. Sci.* 63: 150-155.
- VERSALOVIC J., KOEUTH T., LUPSKIJ. R., 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19: 6823-6831 .