

KARAKTERISASI MOLEKULER *Pasteurella multocida*: KAITANNYA DENGAN EPIDEMIOLOGI DAN PENGEMBANGAN VAKSIN ISOLAT LOKAL

SUPAR dan TATI ARIYANTI

Balai Besar Penelitian Veteriner, Jl. R.E. Martadinata No. 30, Bogor 16114

(Makalah diterima 10 September 2007 – Revisi 17 Desember 2007)

ABSTRAK

Bakteri *P. multocida* menyebabkan penyakit pasteurellosis pada berbagai ternak dan hewan liar. Pasteurellosis yang penting di Indonesia ialah *Haemorrhagic septicaemia* (HS) atau terkenal dengan nama penyakit ngorok atau SE (*Septicaemia epizootica*) pada ruminansia besar maupun kecil dan penyakit kholera pada unggas. Pengendalian penyakit SE pada ternak ruminansia dilakukan dengan aplikasi vaksin inaktif *P. multocida* strain Katha dari Burma, sedangkan kontrol kholera pada unggas menggunakan sediaan obat antibiotika. Sampai saat ini belum banyak teknik biologi molekuler untuk diferensiasi isolat lokal *P. multocida* dari berbagai tempat di Indonesia. DNA genomik *P. multocida* pada kasus SE dari berbagai propinsi direaksikan dengan enzim restriksi endonuklease *ApaI* dan dianalisis secara *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE); hasilnya berbeda dengan strain vaksin (Katha) dari Burma dan galur acuan lainnya. Demikian halnya dengan DNA genomik dari isolat lokal *P. multocida* penyebab kholera unggas. Bahkan pada isolat antar propinsi terdapat perbedaan pola fragmen genetik dari DNA genomiknya. Perbedaan pola restriksi endonuklease DNA tersebut juga merefleksikan perbedaan sifat patogenitas, antigenitas dan imunogenitasnya. Kajian vaksin isolat *P. multocida* dari kasus SE dan kasus kholera unggas isolat lokal yang disimpan pada unit Bbalitvet Culture Collection (BCC) juga memberikan petunjuk yang mendukung tentang temuan perbedaan sifat molekuler genetiknya. Vaksin yang dibuat dari isolat lokal lebih baik dalam memberikan perlindungan imunologik atau respon antibodinya lebih tinggi dan konsisten dibandingkan dengan vaksin serupa yang dibuat dari galur luar negeri. Potensi pemanfaatan *P. multocida* sebagai sumber daya genetik dapat dikembangkan menjadi *master seeds* untuk vaksin pasteurellosis (SE atau kholera unggas) isolat lokal yang sesuai dengan serotipe penyebab penyakit di lapangan, tetapi masih diperlukan penelitian lebih lanjut.

Kata kunci: *Pasteurella multocida*, karakterisasi, analisis DNA, vaksin

ABSTRACT

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Pasteurella multocida*: ITS IMPLICATION WITH EPIDEMIOLOGY AND THE DEVELOPMENT OF LOCAL ISOLATE VACCINES

Pasteurella multocida strains are the causative agents of pasteurellosis attacking wide range domestic and wild animals. The important pasteurellosis in animals in Indonesia are *Haemorrhagic septicaemic* (HS) or *Septicaemia epizootica* (SE) in large and small ruminants, fowl cholera in poultry and water fowls. HS associated with *P. multocida* in large ruminants was controlled by killed whole cell vaccines produced by the use of *P. multocida* Katha strain, whereas fowl cholera was controlled by antimicrobial drugs. At present, there are only a limited molecular biology techniques have been applied to investigate *P. multocida* isolates from different geographic locations in Indonesia. Genomic DNA of *P. multocida* from HS cases from various provinces which were treated with restriction endonuclease *ApaI* and analysed by means of pulsed-field gel electrophoreses (PFGE) demonstrated the presence of high degree distinctive DNA pattern compared to that of the vaccine (Katha) strain from Burma and other reference strains. Similar different patterns were found in genomic DNA of local *P. multocida* isolates from cholera disease of chicken and ducks. *P. multocida* isolates from some provinces showed different DNA patterns to each other. These DNA pattern differences were probably associated with the alteration of their pathogenicity, antigenicity and immunogenicity, but it has not been confirmed yet. Vaccines prepared from *P. multocida* isolate originated from local HS cases and local cholera demonstrated better protection in experimental animals against heterologous and homologous challenges, in terms of higher and consistency antibody responses compared to that of Katha strain or imported *P. multocida* poultry strains. This supports the potential aspects of molecular characterization of local *P. multocida* isolates kept at the BCC Unit. These isolates may play an important role in developing local master seeds to produce pasteurellosis local vaccines which would be more promising to be used in Indonesia in the future but further field trials are still needed.

Key words: *Pasteurella multocida*, characterization, DNA analysis, vaccines

PENDAHULUAN

Sejak ditemukannya bakteri *Pasteurella multocida* oleh Louis Pasteur lebih dari satu abad yang lalu hingga sekarang, mekanisme infeksi secara molekuler dan faktor virulensi belum diketahui secara jelas (MAY *et al.*, 2001). Spesies bakteri tersebut sangat heterogen dalam menimbulkan infeksi penyakit yang beragam pada berbagai jenis hewan dan manusia, secara umum dinamakan pasteurellosis. Manifestasi klinis infeksi *P. multocida* pada hewan sangat bermacam-macam, seperti *Haemorrhagic septicaemia* (HS) atau *Septicaemia epizootica* (SE) pada sapi dan kerbau (SJAMSUDIN, 1972), kholera pada berbagai jenis unggas, atropik rhinitis pada babi, infeksi pada manusia akibat gigitan anjing dan kucing. Dilihat dari aspek konfirmasi penguahan diagnosis penyakit pasteurellosis, kebanyakan laboratorium veteriner berkemampuan mengisolasi dan mengidentifikasi agen penyebabnya untuk mendapatkan kultur murni, selanjutnya diklasifikasi mengarah pada *phenotypic trait* berdasarkan morfologi, fermentasi karbohidrat dan sifat-sifat serologik (POERNOMO, 1980). Akan tetapi perlakuan pengkulturan di laboratorium dengan subkultur berulang dapat mengurangi sifat virulensi, stabilitas dan reaktivitas sifat fenotipik untuk identifikasi strain (MATSUMOTO dan STRAIN, 1993; JACQUES *et al.*, 1994). Penelitian di luar negeri tentang identifikasi dan karakterisasi sudah mencapai pada analisis secara genetik untuk mengetahui sifat dasar organisme *P. multocida*. Karakterisasi secara genetik merupakan cara yang lebih efektif dari pada metode tradisional fenotipik. Deteksi asam nukleat tersebut dapat mempercepat identifikasi terhadap organisme, menentukan posisi takson dan identifikasi hubungan intra spesies (HUNT *et al.*, 2000).

Pendekatan molekuler seperti DNA hibridisasi dan identifikasi asam nukleat dapat diaplikasikan langsung terhadap sampel klinis dan dapat mempercepat atau mengurangi waktu yang dipakai untuk identifikasi. Aspek penelitian molekuler dapat dipakai untuk deteksi bakteri yang sulit dikultivasi di laboratorium. Molekuler teknologi dapat diaplikasikan pada identifikasi dan karakterisasi *P. multocida*. Pada kesempatan ini disajikan studi pustaka retrospektif tentang diferensiasi secara molekuler *P. multocida* penyebab penyakit pasteurellosis dan manfaatnya dalam pengembangan vaksin isolat lokal.

APLIKASI POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) UNTUK DETEKSI DAN IDENTIFIKASI *P. multocida*

PCR dikembangkan sejak tahun 1985, prinsip-prinsip dasar aplikasi secara *in vitro* melalui *cycling* repetitif dapat dikembangkan ke berbagai arah aspek

dasar dan dapat diterapkan terhadap sampel bahan pemeriksaan secara laboratorik. Saat ini, PCR tidak hanya untuk memproduksi suatu rantai (*sequence*) dalam jumlah yang banyak tetapi dapat diterapkan pada laboratorium klinik untuk deteksi dan identifikasi patogen yang infeksius. Perkembangan lebih lanjut dalam modifikasi penyiapan sampel dikombinasikan dengan multiplek PCR untuk analisis yang spesifik untuk keperluan diagnostik, studi patogenesis suatu bakteri, resistensi bakteri terhadap antibiotika, dengan memakai primer oligonukleotida (HUNT *et al.*, 2000).

Target utama dari PCR spesifik dalam *P. multocida* ditujukan untuk keperluan identifikasi, yang paling utama dalam hal identifikasi spesies spesifik dalam kondisi infeksi campuran (*mixed infection*). Cara ini baru dikembangkan sejak 10 tahun terakhir (KASTEN *et al.*, 1997; TOWNSEND *et al.*, 1997, 1998). KASTEN *et al.* (1997) menggunakan primer oligonukleotida yang dibuat untuk mengamplifikasi gen *psl* yang menyandi produksi protein *P6-like* dari *P. multocida*. Gen tersebut serupa dengan gen yang dimiliki oleh bakteri *Haemophilus influenzae* dan *H. parainfluenzae* (NELSON *et al.*, 1988). Amplifikasi gen ini dapat berfungsi sebagai basis untuk deteksi *P. multocida* (PCR-H), akan tetapi spesifisitas dari uji PCR-H untuk deteksi *P. multocida* atau sebaliknya masih perlu penelitian lebih lanjut.

Sensitivitas *P. multocida* (PM)-PCR yang dikembangkan oleh TOWNSEND *et al.* (1998a) dilaporkan dapat mendeteksi organisme kurang dari 10 sel tanpa harus ada tambahan teknik hibridisasi. Akan tetapi, teknik tersebut berdasarkan pada amplifikasi dari rantai DNA unik dari *P. multocida* (KMT1) yang diperoleh dari substraktif hibridisasi. Dengan demikian sensitivitas meningkat, akan tetapi spesifisitasnya menurun sedikit karena dapat mengamplifikasi *Pasteurella canis* biovar 2, kedua spesies tersebut sangat berdekatan, berdasarkan *sequencing* 16SrRNA (DEWHIST *et al.*, 1993). Dengan PM-PCR dilaporkan terdapat hasil positif palsu terhadap isolat pada kasus pneumonia dari sapi dan babi. Optimasi PM-PCR dilakukan dengan menggunakan *sequence* di sekitar KMT1 untuk memperbaiki spesifisitasnya.

PCR untuk deteksi *P. multocida* penyebab *Haemorrhagic septicaemia* (HSB-PCR)

PM-PCR untuk deteksi *P. multocida* grup B penyebab HS (SE) dikembangkan dari dua gen yang terpisah (BRICKELL *et al.*, 1998; TOWNSEND *et al.*, 1998a). Kedua gen terletak dalam satu kilo *base pairs* (kb), tetapi hubungannya tidak dijelaskan lebih lanjut. HSB-PCR bersifat spesifik untuk *P. multocida* grup B (serogrup 2 dan 5) yang dapat diamplifikasikan pada fragmen 620 *base pairs* (bp) oleh primer KTSP61 dan KTT72. Kedua primer tersebut dipakai untuk deteksi *P.*

multocida penyebab HS yang diisolasi dari tonsil babi (HUNT *et al.*, 2000). Sedangkan PM-PCR dari penelitian BRICKELL *et al.* (1998) dapat menunjukkan amplifikasi terhadap *P. multocida* penyebab HS serogrup B dan E. Kelihatannya kedua PCR tersebut dikembangkan dari isolasi DNA yang ditemukan dengan *sequence*-nya secara kebetulan. Penelitian yang lain mengemukakan tentang kapsul biosintesis loki yang dimiliki oleh serotipe A : 1 (CHUNG *et al.*, 1998) dan serotipe B:2 (BOYCE dan ADLER, 2000). Akan tetapi uji PCR dari gen pengendali biosintesis kapsul kemungkinan masih terbatas pada teori dalam mengidentifikasi semua organisme berdasarkan tipe kapsul. Spesifisitasnya dilaporkan tidak akan sampai pada *region* tipe somatik spesifik teridentifikasi dalam *cluster* gen yang menyandi sifat homologus *P. multocida* (O-antigen biosintesis).

PCR untuk deteksi *P. multocida* toksigenik

Aplikasi teknologi PCR untuk identifikasi *P. multocida* toksigenik dilaporkan pertama tahun 1994 (NAGAI *et al.*, 1994), menggunakan primer yang disintesis dari gen *toxA* yang menyandi sintesis toksin dermato-nekrosis pada penyebab kasus atropik rhinitis progresif pada babi. Pada awalnya, PCR dipakai untuk deteksi *P. multocida* strain toksigenik. Selanjutnya dipakai untuk analisis langsung *Pasteurella multocida* tanpa menggunakan hibridisasi (KAMP *et al.*, 1996; LICHTENSTEIGER *et al.*, 1996; HOTZEL *et al.*, 1997). Dilaporkan penggunaan PCR untuk deteksi toksigenik *P. multocida* dari sampel swab tonsil dan nasal babi cukup sensitif (KAMP *et al.*, 1996). Akan tetapi, menurut LICHTENSTEIGER *et al.* (1996) lebih cocok untuk memeriksa sampel dalam jumlah terbatas karena cenderung terjadi adanya *false* positif amplifikasi. Hal ini dibuktikan oleh AMIGOT *et al.* (1998) yang menggunakan primer yang dibuat oleh LICHTENSTEIGER *et al.* (1996) bahwa PCR produk (*band* DNA) yang perkiraan ukuran DNANYA tidak jelas dapat ditemukan pada sampel yang bersifat negatif pada ELISA dan uji pada sel jaringan. Hal ini dapat terjadi karena pita DNA yang tidak jelas tersebut berasal dari sampel yang jumlah selnya terlalu rendah dan tidak terdeteksi dengan cara lain, atau terjadi *false* amplifikasi atau terkontaminasi dengan DNA positif. Penambahan primer set dalam gen *toxA* dapat dipakai untuk prosedur *nested* atau multiplek PCR, cara ini diharapkan dapat menaikkan sensitivitas maupun spesifisitasnya dan mengeliminasi kemungkinan terjadinya amplifikasi *false* positif.

PCR fingerprinting

Penggunaan PCR *fingerprinting* untuk diferensiasi isolat *P. multocida* telah dilaporkan oleh para peneliti

dalam dasawarsa terakhir ini, dengan memakai *probe* RNA komersial dan biasanya dilabel dengan radio isotop ^{32}P -dCTP, dan selanjutnya dikombinasikan dengan teknik hibridisasi *in vitro*. Akan tetapi, penggunaan label radioisotop untuk melihat dan meningkatkan sensitivitas primer dapat mengurangi feasibilitas dari primer di laboratorium. Prosedur dengan aplikasi ^{32}P -dCTP akan meningkatkan deteksi dan amplifikasi fragmen dari organisme yang kaya akan sitosin dalam genomnya (HOPKIN *et al.*, 1998).

Repetitive ekstra genetik PCR *fingerprinting* dewasa ini juga telah dikembangkan untuk deteksi *P. multocida* dan dibandingkan dengan PFGE, hasilnya dilaporkan dapat menunjukkan diferensiasi dengan baik (TOWNSEND *et al.*, 1997; 1998; GUNAWARDANA *et al.*, 2000). Aplikasi teknik tersebut pada bakteri *P. multocida* menunjukkan bahwa penyebab kholera unggas dan HS pada babi di Vietnam mempunyai sifat variasi genetik yang tidak berbeda banyak dengan REP-PCR profil dari serotipe A:1 dan serogrup B penyebab HS. Hasil analisis dari *P. multocida* dari tonsil babi yang sehat dari rumah potong hewan, menunjukkan sifat genetik yang heterogen. Hal itu diduga bahwa babi sehat dapat berfungsi sebagai reservoir terhadap serotipe penyebab kholera unggas (TOWNSEND *et al.*, 1997a).

KARAKTERISASI *P. multocida* SECARA MOLEKULER DAN KAITANNYA DENGAN EPIDEMIOLOGI

Berbagai upaya dilakukan dalam klasifikasi *P. multocida* berdasarkan sifat fenotipik, seperti identifikasi secara serologis untuk deteksi antigen kapsular, somatik dan sifat profil fermentasi secara biokimiawi (RIMLER, 1990). Akan tetapi dengan teknik tersebut hanya menyajikan karakterisasi dan informasi yang kurang lengkap dalam studi epidemiologi *P. multocida* (WILSON *et al.*, 1992). Kemampuan untuk diferensiasi secara fenotipik juga penting terutama tentang aspek epidemiologi dalam menentukan galur vaksin (VERMA dan JAIWAL, 1997). Pengembangan teknik molekuler (*DNA-base*) merupakan metode alternatif untuk karakterisasi dan melengkapi cara identifikasi fenotipik dan biokemik. Teknik molekuler biologi sangat penting untuk membedakan bakteri atau organisme yang secara fenotipik sama atau serupa. Dalam dekade terakhir ini, teknik karakterisasi genomik banyak dipakai untuk identifikasi yang secara fenotipik banyak variasinya dan bakteri *P. multocida* mempunyai sifat berbeda terhadap isolat dari hewan yang berbeda-beda (TENOVER *et al.*, 1995).

Pada awalnya investasi teknik pengembangan DNA genomik memerlukan biaya yang relatif besar untuk pembelian peralatan dan bahan kimia yang lebih mahal. Beberapa laboratorium di berbagai negara dapat melakukan pengadaan peralatan dan melakukan

penelitian dan pengamatan (WASCHMUTH, 1986). Akan tetapi, sekarang teknik molekuler DNA sudah dipakai di banyak laboratorium medis kedokteran atau veteriner bahkan dipakai dalam diagnosis rutin (HUNT *et al.*, 2000). Karakterisasi secara molekuler yang sudah dilakukan pada *P. multocida* seperti DNA *fingerprinting*, merupakan metode yang sangat populer untuk diferensiasi bakteri yang secara fenotipik sama atau serupa. Aplikasi teknik ini (DNA *fingerprinting*) dalam mempelajari molekuler epidemiologi *P. multocida* telah banyak dipakai di luar negeri dan dipublikasi di berbagai jurnal penelitian. Namun demikian dalam tinjauan ini dikemukakan beberapa artikel untuk menggambarkan dan menjelaskan bahwa karakterisasi molekul DNA dapat menunjang pendekatan suatu epidemiologi penyakit.

Analisis restriksi endonuklease

Analisis restriksi endonuklease merupakan teknik penting sebagai penunjang studi penyakit bakterial, terutama untuk investigasi wabah penyakit, seperti pasteurellosis. Metode tersebut juga dapat diaplikasikan dan sangat stabil, tidak dipengaruhi oleh sifat-sifat yang tidak konsisten, seperti pada teknik pendekatan fenotipik suatu *trait* bakteri. Spesifisitas dan sensitivitas dari metode fenotipik sangat dipengaruhi oleh faktor-faktor eksternal dari suatu organisme patogen. Dalam amplifikasi analisis restriksi endonuklease (ARE) baik yang dikombinasikan dengan *ribotyping* atau sendiri sangat spesifik dan berbeda dibanding dengan profil DNA. Beberapa enzim restriksi (*HhaI* dan *HpaII*) telah dicoba di luar negeri untuk diferensiasi isolat *P. multocida* dan dapat menghasilkan pita DNA genomik dari cakupan serotipe isolat bakteri tersebut (WILSON *et al.*, 1992, 1993; BLACKALL *et al.*, 1995, 1996). Diantara strain referensi *P. multocida* yang terdiri dari 16 serotipe menunjukkan tingkat profil DNA genomik yang unik. Perbedaan sifat kapsul serogrup B menunjukkan bahwa serotipe yang sama menunjukkan sifat *fingerprinting* yang berbeda. Akan tetapi pada pengamatan ARE pada serogrup E tidak memperlihatkan pola yang sama. Aplikasi ARE pada penyebab HS pada rusa di Amerika dapat menentukan lokasi asal dari *P. multocida* (WILSON *et al.*, 1995).

Pengamatan epidemiologik pasteurellosis pada babi yang menderita atropik rhinitis dapat diketahui bahwa sifat profil DNANYA sangat heterogen (ZHAO *et al.*, 1992; GARDNER *et al.*, 1994). Berdasarkan profil DNA tersebut dapat dilacak sumber penularannya sebagai sumber wabah. Di samping itu, sifat perbedaan yang tinggi ARE memungkinkan untuk pengamatan dalam menentukan efikasi vaksin *P. multocida* dalam pengendalian penyakit terutama vaksin *P. multocida* aktif. Di luar negeri vaksin aktif dipakai untuk

pengendalian kholera pada kalkun (WILSON *et al.*, 1993), di Indonesia vaksin pasteurellosis aktif (kholera atau HS) dilirik untuk dipakai di lapangan oleh produsen vaksin, namun demikian masih terdapat keawatiran atau keraguan yang berkaitan dengan kelengkapan/fasilitas perangkat diagnostik genetik bakteri yang akurat untuk membedakan antara galur vaksin aktif dan galur lapangan.

Ribotyping

Dalam studi pustaka retrospektif pada analisis restriksi endonuklease (ARE) kerap kali dilaporkan bahwa teknik pengerjaannya sangat kompleks, mengakibatkan pengamatan secara visual dan interpretasi sangat sulit. Pada pengamatan *ribotyping* menggunakan enzim restriksi untuk digesti DNA genomik dan agarose elektroforesis untuk pemisahan fragmen genomik DNA. Lebih lanjut teknik *ribotyping* masih memerlukan teknik hibridisasi dengan *probe* (gen pelacak). Hibridisasi masih memerlukan indikator radioisotop dan autoradiografi hasil reaksi hibridisasi. Tetapi hal tersebut dilaporkan lebih tidak kompleks dibanding ARE (CHASLUS-DANCLA *et al.*, 1996). Di samping itu dapat mengidentifikasi *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) dalam *ribosomal* genom bakteri.

Ribotyping dikombinasikan dengan ARE dan telah diaplikasikan untuk karakterisasi dan diferensiasi *P. multocida* dari babi (ZHAO *et al.*, 1992; GARDNER *et al.*, 1994) dan *P. multocida* yang diisolasi dari unggas yang menderita kholera di banyak laboratorium veteriner di luar negeri (SNIPES *et al.*, 1989; BLACKALL *et al.*, 1995; CARPENTER *et al.*, 1991). Teknik tersebut dapat mengidentifikasi variasi genetik dan hubungannya dari isolat *P. multocida* yang diperoleh dari wabah penyakit kholera unggas yang sebelumnya tidak dapat didiferensiasi secara *ribotyping* dan *biotyping*.

Ribotyping yang diaplikasikan untuk diferensiasi *P. multocida* penyebab HS menunjukkan adanya sedikit perbedaan pada strain atau galur yang serotipenya sama. Dibandingkan dengan *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE), *ribotyping* lebih tidak konsisten dalam aplikasinya untuk klasifikasi (TOWNSEND *et al.*, 1997). Dengan dipakainya dalam diferensiasi *Restriction Fragment Length Polymorphisms* (RFLP) atau sekitar *ribosomal operon*, kerap kali membingungkan terhadap klasifikasi. Bila *ribotyping* dikombinasikan dengan teknik lain dapat meningkatkan tingkat akurasi dalam diferensiasi bakteri penyebab HS yang secara fenotipik sama, walaupun akan ada dugaan penyimpangan hubungan genetiknya apabila menggunakan *ribotyping* saja sebagai dasar klasifikasi.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

Field alteration electrophoresis yang umum dikenal atau disebut *pulsed-field gel electrophoresis* merupakan salah satu persyaratan standar terhadap metode *fingerprinting* untuk mempelajari molekuler epidemiologi (GOERING, 1993), karena adanya polimorfisme sepanjang kromosom dapat diamati tanpa adanya pola restriksi yang kompleks dan restriksi genetik yang panjang yang dihasilkan pada *ribotyping*. Analisis dengan PFGE menunjukkan tingkat perbedaan tinggi dalam identifikasi dan diferensiasi dari spesies bakteri jika dibandingkan dengan teknik *ribotyping* (PREVOST *et al.*, 1992, KRISTJANSSON *et al.*, 1994; TOWNSEND *et al.*, 1997a). Pada metode ARE menentukan tingkat perbedaan yang tinggi akan tetapi profil dari fragmen DNA yang dihasilkan dari teknik *ribotyping* yang sangat kompleks, sulit dianalisis tanpa komputer untuk menarik kesimpulan yang akurat (WILSON 1993; KRISTJANSSON *et al.*, 1994).

Walaupun PFGE merupakan bagian integral untuk mempelajari komponen genetik dan molekuler epidemiologi, namun teknik ini belum banyak diaplikasikan pada *typing* komparatif *P. multocida*. Dalam awal pengembangannya yang dilakukan oleh DONNIO *et al.* (1994) menunjukkan adanya sifat heterogenitas di antara *P. multocida* D:2 yang diisolasi dari *nasopharynx* pada peternakan babi *breeder* yang menderita pasteurellosis, walaupun tidak ada hubungan genetik diantara isolat bakteri *P. multocida* dari babi *breeder* dan babi potongnya. Karakterisasi secara PFGE terhadap isolat *P. multocida* yang bersifat dermato-nekrotik yang diisolasi dari manusia dan babi menunjukkan DNA polimorfisme, walaupun tidak ada korelasinya dengan spesies hospes (DONNIO *et al.*, 1999). Dengan tidak adanya perbedaan di antara toksigenik (dermato-nekrotik) isolat dari babi diduga bahwa manusia terinfeksi dan terkolonisasi *P. multocida* toksigenik dari babi.

Diferensiasi diantara isolat *P. multocida* penyebab HS secara PFGE dari berbagai tempat pada berbagai belahan dunia menunjukkan korelasi geografik (TOWNSEND *et al.*, 1997a). Sebagai contoh *P. multocida* serogrup B penyebab HS di Amerika Utara berbeda dengan serogrup B di Asia. Contoh lainnya tentang kemampuan teknik PFGE untuk mengetahui hubungan dan perbedaan genetik *P. multocida* grup B penyebab HS di *Yellowstone Park Buffalo* dan dari darah kuda di Amerika Utara tidak dapat dibedakan secara *serotyping*, protein *typing* dan *ribotyping*, akan tetapi dengan analisis secara PFGE menunjukkan bahwa sifat restriksi endonuklease dari DNA profil berbeda (GOHENOUR, 1924; STEIN *et al.*, 1949; TOWNSEND *et al.*, 1997a).

Selanjutnya dilaporkan oleh GUNAWARDANA *et al.*, (2000) tentang aplikasi PFGE untuk diferensiasi *avian*

P. multocida dalam mempelajari molekuler epidemiologi menunjukkan hasil yang lebih berbeda dibanding dengan *repetitive extragenic* PCR (REP-PCR).

Kajian *P. multocida* galur acuan dan isolat lokal (Indonesia) secara PFGE

Analisis profil fragmen DNA isolat *P. multocida* yang diisolasi dari kasus SE dan dikoleksi pada unit BCC dilaporkan bahwa isolat dari Propinsi Kalimantan Selatan (BCC 2259, PMK1), dari Propinsi DIY (PMK5), dari Kupang NTT (BCC 1878) dari Jawa Barat (BCC 2261, BCC 2262, BCC 2263) yang dianalisis secara PFGE menunjukkan pola restriksi *ApaI* sama (SUPAR, 2003), terdiri dari 10 pita DNA, terbesar 291 kilobase pair (kb) dan terkecil 20 kb (*ApaI* tipe 1). Pola restriksi tersebut berbeda dengan galur vaksin SE yang dipakai di seluruh wilayah Indonesia yakni *P. multocida* strain Katha dari Burma, yang terdiri dari 11 pita DNA dengan ukuran yang terbesar 330 kb dan terkecil 50 kb, restriksi *ApaI* sama dengan isolat dari Izatnagar, India (Tabel 1).

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa permasalahan penyakit SE masih sering terjadi secara endemik, walaupun vaksinasi telah dilakukan setahun sekali menggunakan vaksin SE yang dibuat dari strain Katha. Sifat-sifat antigenik dan respon imunologik penyebab SE tersebut di atas (BCC 2259, PMK1, PMK5, BCC 2261, BCC 2262, BCC 2263) dipelajari pada hewan mencit, sapi, dan kerbau. Hasil penelitian RAMDANI (1997) melaporkan bahwa antibodi monoklonal yang dibuat dari strain Katha secara *immunoblotting* tidak dapat mengenali komponen antigen isolat lokal *P. multocida* terhadap antigen yang berasal dari isolat Propinsi Kalimantan Selatan (BCC 2259, PMK1), dari Propinsi DIY (PMK5) dan dari Jawa Barat (BCC 2261, BCC 2262). Lebih lanjut dilaporkan bahwa walaupun galur Katha serotipenya sama dengan isolat lokal tersebut, vaksin isolat lokal atau galur Katha dibuat vaksin monovalen yang diemulsikan dalam *adjuvant* dan diuji imunogenitasnya pada mencit. Vaksin isolat lokal dapat memberikan respon antibodi lebih baik dan perlindungan yang berbeda pula terhadap uji tantang galur homolog dan heterolog. Antiserum dari hewan yang divaksinasi dengan vaksin SE multivalen isolat lokal yang diperiksa imunogenitasnya secara *immunoblotting* dapat bereaksi lebih banyak terhadap komponen antigen *P. multocida* dan lebih lengkap jika dibandingkan dengan serum dari vaksinasi galur Katha, namun daya perlindungan semuanya menunjukkan 100%. Keunggulan vaksin SE isolat lokal multivalen memberikan respon antibodi lebih tinggi, reaksi terhadap komponen antigen lebih lengkap, titer antibodi lebih konsisten dan titer antibodi masih tetap

tinggi setelah 6 bulan pasca vaksinasi (RAMDANI, 1997). Dari aspek kajian tersebut menunjukkan bahwa perbedaan dalam sifat restriksi endonuklease dari DNA genomik dari isolat lokal *P. multocida* memberikan sifat yang beda terhadap sifat antigenisitas dan

imunogenisitasnya, namun secara pasti belum diketahui tentang faktor komponen antigen yang dikendalikan oleh fragmen DNA penyandinya, masih perlu penelitian lebih lanjut.

Tabel 1. Restriksi endonuklease *ApaI* pada DNA *P. multocida* dan analisis secara PFGE

<i>P. multocida</i>		Asal isolat, strain dari daerah lainnya (kode No BCC)	Jumlah fragmen	Ukuran fragmen (kb)		Restriksi <i>ApaI</i> tipe
Nomor	Sumber			Terbesar	Terkecil	
01	Sapi	Kalimantan Selatan (2259)	10	291	20	1
02	Kerbau	Kalimantan Selatan (PMK1)	10	291	20	1
03	Sapi	Yogyakarta (PM5)	10	291	20	1
09	Sapi	Kupang, Timor Barat (1878)	10	291	20	1
11	Sapi	Jawa Barat (2262)	10	291	20	1
12	Sapi	Jawa Barat (2263)	10	291	20	1
15	Sapi	Jawa Barat (2261)	10	291	20	1
05	Sapi	Burma (strain vaksin)	11	330	50	2
17	Kerbau	Izatnagar, India (346)	11	330	50	2
13	Sapi	Jawa Tengah (2157)	15	220	15	3
18	Sapi	Sydney, Uni. Aust. (356)	15	220	15	3
22	Sapi	Jawa Tengah (1475)	15	220	15	3
10	Sapi	Jawa Tengah (2256)	12	340	15	4
19	Sapi	Sydney, Uni. Aust. (344)	12	340	15	5
20	Bison	NADC M-1404 (1366)	12	340	15	5
32	Sapi	NADC P-1591 (1372)	12	340	15	5
21	Bunia*	ATCC 4020 IMVS Aust. (347)	12	340	15	6
23	Sapi	Sri Lanka (2009)	12	340	15	7
07	Itik	Jawa Tengah (DY2)	11	340	48,5	8
08	Itik	Jawa Barat (2331)	11	340	48,5	8
24	Itik	Balitvet, Jawa Barat (2047)	12	340	15	9
25	Ayam	Balitvet, Jawa Barat (2048)	7	390	15	10
26	Ayam	Balitvet, Jawa Barat (2049)	10	390	30	11
27	Ayam	Balitvet, Jawa Barat (2050)	10	390	30	11
28	Ayam	Balitvet, Jawa Barat (2051)	10	390	30	11
29	Ayam	NADC P-1581 (1360)	8	436	60	12
30	Gull	NADC P-1987 (1361)	9	436	20	13
31	Kalkun	NADC P-1702 (1363)	11	390	15	14
33	Kalkun	NADC P-2100 (1376)	13	390	15	15
34	Sapi	IMVS Australia (353)	13	390	15	15
35	Sapi	Sri Lanka (MRI) SL1	10	330	50	17
36	Gajah	Sri Lanka (MRI) SL2	10	330	50	17
37	Babi	Sri Lanka (MRI) SL3	10	390	50	17

*Bunia = salah satu jenis hewan liar, di Australia

Sumber: SUPAR (2003)

Dua galur *P. multocida* dari Sydney University (BCC 344 dan BCC 356) menunjukkan profil DNA yang berbeda, BCC 356 termasuk dalam kelompok *ApaI* tipe 3 sama dengan isolat dari Jawa tengah (BCC 1475 dan BCC 2157), dan BCC 344 pola restriksi DNA-nya berbeda dengan semua bakteri yang di periksa (*ApaI* tipe 5) namun sifatnya sama dengan strain dari bison dan bunia (SUPAR, 2003).

P. multocida (DY2 dan BCC 2331) yang diisolasi dari itik penderita kholera dari tempat yang berbeda menunjukkan profil DNA serupa (*ApaI* tipe 8), sedangkan 1 isolat dari itik lainnya (BCC 2047) profil DNA genomiknya berbeda, tergolong dalam kelompok *ApaI* tipe 9. Empat isolat dari ayam di Indonesia yang diisolasi di Bbalitvet (BCC 2049, BCC 2050, BCC 2051) termasuk dalam *ApaI* tipe 11, sedangkan nomor BCC 2048 sangat berbeda profil fragmen DNA-nya dengan yang lainnya dan tergolong dalam *ApaI* tipe 10. Lima strain acuan *P. multocida* berasal dari NADC (BCC 1360, BCC 1361, BCC 1363, BCC 1376) masing-masing menunjukkan profil DNA genomiknya berbeda satu dengan yang lain. Disamping itu, strain dari kalkun (BCC 1376) profil DNANYA sama dengan *P. multocida* asal anak sapi (BCC 353) yang berasal dari Institute of Medical and Veterinary Science/IMVS (SUPAR, 2003). Sedangkan *P. multocida* yang diisolasi dari sapi, gajah dan babi dari Srilanka menunjukkan profil DNA genomik yang serupa, hal ini diduga dapat terjadi melalui infeksi silang atau lingkungan yang tercemar.

Penelitian pasteurellosis unggas yang sebelumnya dilakukan menunjukkan bahwa *P. multocida* DY2 dan BCC 2331 mempunyai sifat patogenitas yang serupa, baik pada ayam maupun pada mencit (SUPAR *et al.*, 2000; 2001a). Vaksin monovalen dan bivalen dari isolat tersebut dapat memberikan proteksi silang terhadap ujiantang galur homolog dan heterolog baik isolat lokal maupun galur unggas impor (SUPAR *et al.*, 2001b). Pemeriksaan secara PFGE isolat lokal BCC 2331 dan DY2 tersebut menunjukkan sifat restriksi sama (SUPAR, 2003). Dari fenomena ini dapat dikatakan bahwa bakteri *P. multocida* yang mempunyai pola profil DNA sama menunjukkan sifat virulensi, sifat antigenisitas dan imunoproteksi sama, seperti yang terjadi pada bakteri *P. multocida* penyebab SE di Indonesia.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari analisis genomik DNA dengan enzim restriksi endonuklease dilanjutkan dengan PFGE menunjukkan bahwa isolat *P. multocida* dari sapi dan kerbau penderita *Haemorrhagic septicaemia* (HS) atau SE di Indonesia profil DNA-nya berbeda dengan strain Katha dari Burma dan berbeda pula terhadap isolat/strain referens dari kawasan Asia lainnya.

Demikian halnya penyebab kholera unggas di Indonesia berbeda dengan penyebab kholera unggas dan strain *P. multocida* referens dari luar negeri. *P. multocida* isolat Indonesia lebih mempunyai dampak imunoprotektif dan lebih sesuai sebagai kandidat vaksin SE dibandingkan dengan galur luar negeri, tetapi masih perlu penelitian lebih lanjut. Teknik molekuler PFGE lebih sederhana dan lebih mudah dilakukan untuk analisis genetik bakteri dibandingkan dengan teknik molekuler genetik yang lain. Teknik ini dapat diaplikasikan di Indonesia tanpa penggunaan radioisotop *labelling* dan autoradiografi dalam deteksi DNA. Teknik PFGE dapat menyajikan hasil yang sangat berbeda terhadap *serotipe* bakteri sejenis dalam spesies yang secara fenotipik dan serotipik sulit dibedakan, namun teknik ini mudah diaplikasikan terhadap bakteri lain, seperti: kasus antraks dari berbagai wilayah dan kaitannya dengan penggunaan vaksin antraks aktif, dugaan kematian gajah akibat infeksi *P. multocida*, penyebaran salmonellosis pada hewan dan atau manusia.

DAFTAR PUSTAKA

- AMIGOT, J. A., M. TORREMORELL, and C. PIJOAN. 1998. Evaluation techniques for the detection of toxigenic *Pasteurella multocida* strains from pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10: 169 – 173.
- BLACKALL, P.J., J.L. PAHOFF and ARKS. 1996. Amplification of molecular fingerprinting to study on outbreaks of porcine pasteurellosis and pleuropneumoniae. *Agri. Practice.* 17: 17 – 23.
- BLACKALL, P.J., J.L. PAHOFF, D. MARK and J. MARROW. 1995. Characterisation of *P. multocida* isolated from cholera outbreaks on turkey farm. *Aust. Vet. J.* pp. 135 – 138.
- BOYCE, J.D. and B. ADLER. 2000. The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Infect. Immun.* 68: 3463 – 3468.
- BRICKELL, S.K., L.M. HOMAS, K.A. LONG, M. PANACCIO and WIDDERS. 1998. Development of a PCR test based on a gene region associated with pathogenicity of *Pasteurella multocida* serotype B:2, the causal agent haemorrhagic septicaemia in Asia. *Vet. Microbiol.* 59: 295 – 307.
- CARPENTER, T.E., K.P. SNIPES, R. W. KASTEN, D.W. HIRD and D.C. HIRSH. 1991. Molecular epidemiology of *Pasteurella multocida* in turkey. *Am. J. Vet. Res.* 52: 1345 – 1349.
- CHASLUS-DANCLA, E., P. LESAGE-DESCAUSES, S. LEROY-SETRIN, J.L. MARTEL, P. COUDERT and J.P. LAFFONT. 1996. Validation of random polymorphic DNA assays by ribotyping as a tool for epidemiological surveys of *Pasteurella multocida* from animals. *Vet. Microbiol.* 52: 91 – 102.

- CHUNG, J.Y., Y.M. CHANG and B. ALDER. 1998. The capsule biosynthesis locus of *Pasteurella multocida*. FEMS Microbiol. Lett. 166: 289 – 298.
- DEWHIST, F.E., B.J. PASTER, I. OLSEN and G.J. FRASER. 1993. Phylogeny of the *Pasteurella multocida* as determined by comparison of 16S ribosomal nuclei acid sequence. Int. Med. J. Microbiol. Virol. Parasitol. Inf. Dis. 279: 35 – 44.
- DONNIO, P.Y., A. ALLARDET-SERVENT, M. PERRIN, F. ESCANDE and J.L. AVRIL. 1999. Characterization of dermonecrotic toxin producing strains of *Pasteurella multocida* subspecies *multocida* isolated from man and swine. J. Med. Microbiol. 48: 125 – 131.
- DONNIO, P.Y., C. LEE GOFF, J.L. AVRIL, P. POUEDRAS and S. GRAS-ROUZET. 1994. *Pasteurella multocida*: oropharyngeal carriage and antibody response in breeders. Vet. Res. 25: 8 – 15.
- GARDNER, I., A.R. KASTEN, G.I. EAMENS, K.P. SNIPE and R.J. ANDERSON. 1994. Molecular fingerprinting of *Pasteurella multocida* associated with progressive atrophic rhinitis in swine herds. J. Infect. Diagn. Invest. 6: 442 – 447.
- GOERING, R.V. 1993. Molecular epidemiology of nosocomial infection: Analysis of chromosomal restriction fragment pattern by pulsed-field gel electrophoresis. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 14: 590 – 600.
- GOHENOUR, I.A. 1924. Haemorrhagic septicemia studies: The development of a potent immunizing agent (natural aggresin) by the use of highly virulent strains haemorrhagic septicemia organism. Am. Vet. Med. Ass. 65: 433 – 441.
- GUNAWARDANA, G.A., K.M. TOWNSEND and A.J. FROST. 2000. Molecular characterization of avian *Pasteurella multocida* isolates from Australia and Vietnam by REP-PCR and PFGE. Vet. Microbiol. 72: 97 – 109.
- HOPKINS, B.A., T.H. M. HUANG and L.D. OLSON. 1998. Differentiation turkey post vaccination isolates of *Pasteurella multocida* using arbitrarily prime polymerase change reaction. Avian Dis. 42: 265 – 274.
- HOTZEL, H., W. ERLER and D SCHIMMEL. 1997. Detection of dermatonecrotic gene in *Pasteurella multocida* using polymerase chain reaction. Berl. Munch. Tierarztl. Woch. 110: 139 – 142
- HUNT, M.L., B. ADLER and K.M. TONSEND. 2000. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. Vet. Microbiol. 72: 2 – 25.
- JACQUES, M., M. BALANGER, M. S. DIARRA, M. DARGIS, and F. MOLUOIN. 1994. Modulation of *Pasteurella multocida* capsular polysaccharide during growth under iron-restricted condition and in vivo. Microbiol. 140: 263 – 270.
- KAMP, E.M., G.C. BOLKEN, T.M. VERMEULEN, N.M.F. DE JONG, H.E. BUY, F.H. REEK and M.A. SMITH. 1996. A sensitive PCR assay suitable for large scale detection of toxigenic *Pasteurella multocida* in nasal and tonsillar swab specimens of pigs. J. Vet. Diagn. Invest. 8: 304 – 309.
- KASTEN, R.W., T.E. CARPENTER, K. P. SNIPE and D.C. HIRSH. 1997. Detection of *Pasteurella multocida*-DNA in turkey flocks by use of the polymerase chain reaction. Avian Dis. 41: 676 – 682.
- KRISTJANSSON, M., M.H. SAMORE, D.N. GERDING, P.C. DEGIROLAMI, K.M. BETTIN, A.W. KARCHMER and A.W. ARBEIT. 1994. Comparison of restriction analysis, ribotyping and pulsed field gel electrophoresis for molecular differentiation of *Clostridium difficile* strains. Am. J. Vet. Res. 51: 207 – 210.
- LICHTENSTEIGER, C.A., S.M. STEEBENGEN, R.M. LEE, D.D. POLSON and E.R. VIMR. 1996. Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. J. Clinic. Microbiol. 34: 3035 – 3039.
- MATSUMOTO, M. and J.G. STRAIN. 1993. Pathogenicity of *Pasteurella multocida*: Its variable nature demonstrated by in vivo pathogenesis. Avian Dis. 37: 781 – 785.
- MAY, B.J., Q. CHIANG, L.L. LI, M.L. PAUSTIN, T.S. WHITAM and V. KAPUV. 2001. Completed genomic sequence of *Pasteurella multocida* Pm70. Proc. Nat. Academic Sci. 98(6): 1360 – 1365.
- NAGAI, S., S. SAMENO and T. YAGIHASHI. 1994. Differentiation of toxigenic from non toxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by PCR. J. Clinic. Microbiol. 32: 1004 – 1010.
- NELSON, M.B., M.A. APICELLA, T.F. MURPHY, H. VANKEULLEN, L.D. SPOTILA and D. REKOSH. 1988. Cloning and sequencing of *Haemophilus influenzae* outer membrane protein P6. Infect. Immun. 56: 128 – 134.
- POERNOMO, S. 1980. Kasus *Pasteurella multocida* pada itik. Bull. LPPH. XII(19): 42 – 56.
- PREVOST, G., B. JAULHAC and Y. PIEMONT. 1992. DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. J. Clinic. Microbiol. 30: 967 – 973.
- RAMDANI. 1997. Pengembangan vaksin SE dari isolat lokal untuk pencegahan penyakit ngorok pada sapi dan kerbau. Pros. simposium sehari penyakit ngorok (*Septicaemia epizootica, SE*). Bogor 19 Agustus 1997. Balitvet, Bogor. hlm. 44 – 46.
- RIMLER, R.B. 1990. Comparison of *Pasteurella multocida* lipopolysaccharide by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis to determine relationship between haemorrhagic septicaemia strain and serological related group A strains. J. Clinic. Microbiol. 28: 654 – 659.
- SIAMSUDIN, A. 1972. Kepekaan beberapa hewan percobaan terhadap *Pasteurella multocida* strain Kupang. Bull. LPPH. III(3 – 4): 1 – 5.
- SNIPES, K.P., D.C. HIRSH, R.W. KASTEN, T.E. CARPENTER, D.W. HIRD and R.W. MC CAPES. 1989. Differentiation of field isolate of *Pasteurella multocida* serotype 3, 4 from live vaccine strain by genotypic characterization. Avian Dis. 34: 419 – 424.

- STEIN, C.D., L. MOTT and D.W. GATE. 1949. Pathogenicity and lyophilization of *Pasteurella bubalseptika*. Vet. Med. 44: 336 – 339.
- SUPAR, YUDI SETIADI, DJAENURI, NINA KURNIASIH B. POERWADIKARTA dan SJAFEL. 2001a. Pengembangan vaksin kholera unggas: I. Proteksi vaksin *Pasteurella multocida* isolat lokal pada ayam terhadap ujiantang dengan galur homolog dan heterolog. JITV 6(1): 59 – 67.
- SUPAR, YUDI SETIADI, DJAENURI, NINA KURNIASIH B. POERWADIKARTA dan SJAFEL. 2001b. Pengembangan vaksin kholera unggas: II. Patogenitas dan proteksi vaksin *Pasteurella multocida* isolat lokal pada itik percobaan. JITV 6(2): 120 – 125.
- SUPAR, YUDI SETIADI, DJAENURI, NINA KURNIASIH dan B. POERWADIKARTA. 2000. Patogenesis of *Pasteurella multocida* isolat lokal pada mencit dan ayam. JITV 5(1): 59 – 64.
- SUPAR. 2003. Restriksi DNA genomik *Pasteurella multocida* isolat Indonesia, galur Katha dan galur referen yang dianalisa dengan PFGE. JITV 8(3): 196 – 204.
- TENOVER, F.C., R.D. ARBEIT, R.V. GOERING, P.A. NIKELSEN, B.E. MURRAY, D.H. PERSING and B. SUVA MUNATAN. 1995. Interpreting DNA chromosomal restriction pattern produce by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. J. Clinic. Microbiol. 33: 2233 – 2239.
- TOWNSEND, K.M., A.J. FROSS, C.W. LEE, J.M. PAPADIMITRIOU and H.J.S. DAWKINS. 1998a. Development of PCR assay for species and type specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. J. Clinic. Microbiol. 36: 1096 – 1100.
- TOWNSEND, K.M., D. O'BOYL E, T.T. PHAN, T.X., T.G. WIJewardanana, I. WILKIE, N.T. TRUNG and A.J. FROST. 1998. Acute septisemic pasteurellosis in Vietnamese pigs. Vet. Microbiol. 63: 205 – 215.
- TOWNSEND, K.M., H.J.S. DAWKINS and J.M. PAPADIMITRIOU. 1997. Analysis haemorrhagic septicaemia causing isolates of *Pasteurella multocida* by ribotyping and field alteration gel electrophoresis (FAGE). Vet. Microbiol. 57: 383 – 395.
- TOWNSEND, K.M., H.J.S. DAWKINS and J.M. PAPADIMITRIOU. 1997a. REP-PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates that cause haemorrhagic septicaemia. Res. Vet. Sci. 63: 151 – 155.
- VERMA, R. and T.N. JAIWAL. 1997. Protection of cell mediated immune response I calves immunized with multiple emulsion of haemorrhagic septicaemia vaccine. Vaccine. 15(11): 1254 – 1260.
- WASCHMUTH, K. 1986. Molecular epidemiology of bacterial infection; Examples of methodology of investigation of outbreaks. Rev. infect. Dis. 8: 682 – 692.
- WILSON, M.A., M.J. MORGAN and D.G.E. BARGER. 1993. Comparison of DNA fingerprinting and serotyping for identification avian *Pasteurella multocida* isolates. J. Clinic. Microbiol. 31: 255 – 259.
- WILSON, M.A., R. RIMLER and L.J. HOFFMAN. 1992. Comparison DNA finger printing and somatic serotype of serogroup B and E *Pasteurella multocida* isolates. J. Clinic. Microbiol. 30(6): 1518 – 1524.
- WILSON, M.A., R.M. DUNCAN, T.Y. ROFFE, G.E. NORDHALM and B.M. BORLOWSKI. 1995. Pasteurellosis in elk (*Cervus elaphus*): DNA fingerprinting of isolates. Vet. Rec. 137: 1534 – 1537.
- ZHAO, G., C. PIJOAN, M. P. MURTAUGH and T.W. MULITOV. 1992. Use of restriction analysis and ribotyping to study the epidemiology of *Pasteurella multocida* in close swine herds. Infect. Immun. 60: 1401 – 1405.