

INHALTSVERZEICHNIS

	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	V
1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	<i>Mannheimia haemolytica</i>	3
2.1.1	Einführung	3
2.1.2	Einordnung der Gattung <i>Mannheimia</i> unter taxonomischen, biotypischen und serologischen Gesichtspunkten	4
2.1.3	Bedeutung von <i>Mannheimia</i> spp. als Infektionserreger	5
2.1.4	Virulenzassoziierte Faktoren von <i>Mannheimia haemolytica</i> und deren pathogenetische Bedeutung	6
2.1.4.1	Adhäsionsfaktoren	9
2.1.4.2	Kapsel-Polysaccharid (KPS)	11
2.1.4.3	Lipopolysaccharid (LPS)-Komplex	13
2.1.4.4	Äußere Membranproteine	15
2.1.4.5	Eisenregulierte äußere Membranproteine	16
2.1.4.6	Lipoproteine	19
2.1.4.7	Leukotoxin	20
2.1.4.8	Neuraminidase (Sialidase)	24
2.1.4.9	Sialoglycoprotease	25
2.1.4.10	Immunglobulin G-Protease	26
2.1.4.11	Superoxiddismutase	27
2.2	<i>Pasteurella multocida</i> ssp. und <i>Pasteurella</i> spp.	29
2.2.1	Einführung	29
2.2.2	Taxonomische Einordnung der Gattung <i>Pasteurella</i>	30
2.2.3	<i>Pasteurella multocida</i> ssp. <i>multocida</i> und <i>Pasteurella</i> -Spezies als Infektionserreger	31
2.2.4	<i>Pasteurella multocida</i> ssp.: Virulenzfaktoren und deren pathogenetische Bedeutung	34
2.2.4.1	Adhäsionsfaktoren	37
2.2.4.2	Polysaccharid-Kapsel	40
2.2.4.3	Lipopolysaccharid (LPS)-Komplex	43
2.2.4.4	Äußere Membranproteine	44

2.2.4.5	Eisenregulierte äußere Membranproteine	47
2.2.4.6	Lipoproteine	50
2.2.4.7	Dermonekrotoxin (<i>Pasteurella multocida</i> Toxin)	52
2.2.4.8	Neuraminidase	55
2.2.4.9	Superoxid-Dismutase	56
2.2.4.10	Immunglobulin-Protease	57
3	MATERIAL UND METHODEN	59
3.1	Bakterienstämme	59
3.1.1	Referenz- und Kontrollstämme	59
3.1.2	Empfängerstämme für Transformationsversuche	60
3.1.3	<i>Pasteurella</i> -Wildtypstämme	61
3.2	Anzucht und Stammhaltung der verwendeten Bakterienstämme	61
3.3	Zuordnung der Isolate zur Gattung <i>Pasteurella</i> bzw. <i>Mannheimia</i>	62
3.4	Molekulargenetische Methoden	64
3.4.1	Gewinnung und Konzentrationsbestimmung von genomischer DNS	64
3.4.1.1	Hitze-Lyse	64
3.4.1.2	Aufarbeitung von chromosomaler und Plasmid-DNS mittels Kit	64
3.4.1.3	Aufreinigung von PCR-Produkten	64
3.4.1.4	DNS-Konzentrationsbestimmung	65
3.4.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	66
3.4.2.1	Oligonukleotid-Primer	66
3.4.2.2	Reaktionsansätze für Einzel-PCRen und Thermocyclerprogramme	66
3.4.2.3	Multiplex-PCR	67
3.4.2.4	Horizontale Agarosegel-Elektrophorese	68
3.4.3	DNS-DNS-Hybridisierungstechniken	77
3.4.3.1	Herstellung von nicht-radioaktiv-markierten Oligonukleotid-Sonden	77
3.4.3.2	Dot-Blot-Technik	77
3.4.3.3	Hybridisierung mit Dioxigenin-(DIG)-markierten Oligonukleotidsonden	77
3.4.3.4	Nachweis gebundener markierter Sonden	77
3.4.3.5	Chemolumineszenz	78
3.4.3.6	Aufreinigung und Waschen von Membranen	78
3.4.4	DNS-Klonierung	79

3.4.4.1	Verwendete Plasmide	79
3.4.4.2	PCR-Amplifizierung des <i>Pasteurella</i> ssp.- und spp. <i>ompH</i> -Gens	79
3.4.4.3	DNS-Restriktion	80
3.4.4.4	Ligation	80
3.4.4.5	Transformation	81
3.4.4.6	DNS-Sequenzanalyse	82
4	ERGEBNISSE	83
4.1	Charakterisierung von <i>Pasteurella multocida</i>-Subspezies und <i>Pasteurella</i>-Spezies	83
4.1.1	Biotypisierung	83
4.1.2	Molekularbiologische Typisierung	83
4.1.2.1	DNS-DNS-Hybridisierung	83
4.1.2.2	Polymerase-Kettenreaktion	86
4.1.2.3	Vergleich der mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und DNS-DNS- Hybridisierung ermittelten Ergebnisse	87
4.1.2.4	Nachweis Kapseltyp-assoziierter Gene in <i>P. multocida</i> ssp.-Wildtypisolaten	89
4.1.2.5	Prävalenz von <i>cap</i> -Genen in <i>P. multocida</i> ssp.-Wildtypisolaten in Assoziation zum Wirtsorganismus	90
4.1.2.6	Prävalenz und Kombination virulenzassoziierter Gene bei <i>P. multocida</i> ssp.-Isolaten in Assoziation zum Kapseltyp, Wirtsorganismus und Gesundheitsstatus des Wirtsorganismus	91
4.1.3	Charakterisierung von <i>tbpA</i> und dessen flankierender DNS-Region in <i>Pasteurella</i> -Spezies	106
4.1.4	Untersuchungen zur Diversität des <i>ompH</i> -Gens bei <i>Pasteurella multocida</i> ssp.- und <i>Pasteurella</i> spp.-Isolaten	108
4.1.4.1	Phylogenetische Analyse der <i>ompH</i> -Gene der <i>Pasteurella</i> spp. und ssp.	110
4.2	Charakterisierung der [<i>Pasteurella</i>] <i>haemolytica</i>-Wildtypisolate	112
4.2.1	Biotypisierung und Speziesdeterminierung mittels 16S rRNS-Sequenzanalyse	112
4.2.2	Molekularbiologische Typisierung	114
4.2.2.1	DNS-DNS-Hybridisierung	114
4.2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion	117
4.2.2.3	Vergleich der mittels Polymerase-Kettenreaktion und DNS-DNS-Hybridisierung ermittelten Daten	118
4.2.2.4	Kombination der in <i>M. haemolytica</i> -Wildtypisolaten mittels PCR und DNS-DNS-Hybridisierung nachgewiesenen virulenzassozierten Gene	118

4.2.2.5	Kombination der in <i>Mannheimia haemolytica</i> -Wildtypisolaten nachgewiesenen virulenzassoziierten Gene in Assoziation zum Gesundheitsstatus der Wirtstiere	120
4.3	Etablierung diagnostischer Multiplex-Polymerase-Kettenreaktionen (Multiplex-PCRen)	121
5	DISKUSSION	124
6	ZUSAMMENFASSUNG	145
	SUMMARY	148
7	LITERATURVERZEICHNIS	151
8	ANHANG	177
8.1	Nährmedien	177
8.2	Reagenzien	179
8.3	Puffer, Lösungen und Enzyme für die DNS-Analytik	180
8.4	Bezugsquellen von Geräten, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	183
8.5	Stammverzeichnis	186
8.6	DNS-Sequenzen von <i>Pasteurella</i>-Spezies und -Subspezies <i>ompH</i>-Genen	192