

5 Diskussion

Seit der Erstisolierung einer *Pasteurella*-Spezies im Jahre 1881 basiert die Identifizierung und Klassifizierung dieser Mikroorganismen in diagnostischen Laboratorien und Forschungseinrichtungen in erster Linie auf den phänotypischen Merkmalsausprägungen der in Reinkultur angezüchteten Bakterien. Die begrenzte Verlässlichkeit und Möglichkeit der Serotypisierung von *Pasteurella*- und *Mannheimia*-Spezies, widersprüchliche Resultate bei der phänotypischen Untersuchung von *P. multocida*-verdächtigen Isolaten und der Einfluss von Kultivierungsbedingungen auf die phänotypischen Merkmalsausprägungen sowohl von *P. multocida* als auch von *M. haemolytica* verdeutlichten in der Vergangenheit die Komplexität des Nachweises dieser Bakterienspezies [10, 142, 152, 278, 330]. Trotz eines insbesondere im letzten Jahrzehnt betriebenen erheblichen Forschungsaufwandes stellen bei der praktischen Arbeit mit *Pasteurella*- und *Mannheimia*-Spezies nach wie vor die noch immer fehlenden diagnostischen Werkzeuge zur validen Identifizierung und Differenzierung von Vertretern dieser beiden Bakteriengattungen ein erhebliches Problem dar.

Im experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit wurde diese Problematik der allein auf der Biotypisierung der Isolate basierenden Identifizierung von *Pasteurella*- und *Mannheimia*-Spezies erneut bestätigt. Phänotypische Merkmalsausprägungen der Untersuchungsstämme waren oft nicht reproduzierbar und biochemische Tests mussten teilweise mehrmals wiederholt werden, um aussagefähige Daten zu erhalten. Dies ging mit einem enormen zeitlichen Aufwand einher, zumal insbesondere die Zucker-Verwertungs-Reaktionen zum Teil erst nach vier Tagen eine eindeutige Reaktion zeigten. Sogar Referenzstämme, insbesondere von *Pasteurella*-Spezies, wiesen häufig nicht den nach der Literatur beschriebenen Biotyp auf. Darüber hinaus wurden uns wiederholt aus angesehenen Instituten, die ohne Zweifel vor der Versendung des Stamm-Materials einer großen Sorgfaltspflicht nachgekommen sind, Stämme zugesandt, die sowohl phänotypisch als auch nach einer DNS-Sequenzanalyse der mittels eubakterieller PCR amplifizierter 16S rRNS nicht den mitgeteilten Spezies bzw. Subspezies entsprachen bzw. in einigen Fällen trotz vorschriftsmäßiger Asservierung des Stamm-Materials nicht mehr kultivierbar waren. Es verwundert also nicht, dass in der Vergangenheit nur umfassende polyphasische Ansätze, bei der Kombinationen extensiver phänotypischer Untersuchungen mit arbeitsintensiven molekularen Methoden, wie Ribotyping, der Multilokus-Enzym-Elektrophorese, 16S rRNS-Sequenzierung und DNS-DNS-Hybridisierung zur

taxonomischen Gliederung der Gattungen *Pasteurella* und *Mannheimia* notwendig waren. Trotz intensiver Erforschung der beiden Bakteriengattungen belegen aktuelle Veröffentlichungen, dass der taxonomische Wandel bei *Pasteurella*- und *Mannheimia*-Spezies, der durch wiederholte Reklassifizierungen sowohl auf Gattungs- als auch auf Spezies- und Subspeziesebene zum Ausdruck kommt, bei Weitem noch kein Ende gefunden hat und diagnostische Laboratorien nach wie vor mit der Problematik einer validen Identifizierung von *Pasteurella*- und *Mannheimia*-Spezies konfrontiert sind [8, 9, 225].

Ein Hauptanliegen dieser Arbeit war daher die Etablierung von diagnostischen Assays, die eine schnelle und direkte Identifizierung und Differenzierung von *P. multocida* ssp. und *M. haemolytica* erlauben und über einen Nachweis des Virulenzgenmusters insbesondere von Isolaten der heterogenen Gattung *Pasteurella* zukünftig epidemiologische Studien ermöglichen. Das *Pasteurella multocida*-Genomprojekt sowie die in Teilen veröffentlichten Sequenzdaten des *M. haemolytica*-Genoms⁶ boten neue Möglichkeiten der molekularen Charakterisierung und Identifizierung, die die Grundlage für die Etablierung zahlreicher Einzel-PCRen darstellten, die in dieser Weise meines Wissens noch nie an einem Kollektiv von *Pasteurella*- und *Mannheimia*-Isolaten durchgeführt worden sind. So lagen bis dato mit Ausnahme des *P. multocida* Toxins sowie des Leukotoxins von *M. haemolytica* zu keinem der sonstigen für die beiden Spezies beschriebenen und in unterschiedlichen Pathogenesemodellen kritisch diskutierten Virulenzdeterminanten Prävalenzuntersuchungen bei einer repräsentativen Anzahl an Isolaten vor. Die vorliegende Arbeit erhob dabei nicht den Anspruch, eine objektive epidemiologische Studie mit gezielten Probenentnahme-Plänen oder der Untersuchung einer bestimmten Anzahl von Tieren bzw. von Isolaten aus den unterschiedlichen Erkrankungskomplexen darzustellen. Vielmehr sollte die Untersuchung der am Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen in Berlin vorhandenen Sammlung an *Pasteurella*- und *Mannheimia*-Isolaten erste orientierende Daten zur besseren Charakterisierung dieser heterogenen Bakteriengattungen liefern, um darauf aufbauend die Etablierung molekularer diagnostischer Werkzeuge zu ermöglichen und darüber hinaus die Bedeutung einzelner virulenzassoziiierter Faktoren im pathogenetischen Prozess der verschiedenen Infektionskrankheiten diskutieren zu können.

Die Arbeit liefert eine Vielzahl an Einzel-Ergebnissen, die neue Aspekte der Themenkomplexe Taxonomie, Virulenz und Epidemiologie beleuchten. Durch die erstmals in einem

⁶ <http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/microbial/mhaemolytica>

derart großen Rahmen angelegte Untersuchung, bei der *Pasteurella*-Isolate mittels DNS-DNS-Hybridisierung und PCR auf insgesamt 22 und *Mannheimia*-Isolate auf 10 (Tab. 11 - 13) virulenzassoziierte Gene untersucht wurden, konnten Daten gesammelt werden, die neue epidemiologische und taxonomische Zusammenhänge aufzeigen und Anlass zur Bearbeitung neuer Fragestellungen geben. Die Besprechung der Ergebnisse beschränkt sich aufgrund der Vielzahl an Einzel-Ergebnissen auf neu gewonnene Erkenntnisse.

Etablierung diagnostischer Werkzeuge zur Identifizierung und Charakterisierung von *Pasteurella multocida* ssp.- und *Mannheimia haemolytica*

Zahlreiche diagnostische molekulare Assays wurden in der Vergangenheit zum Nachweis von *P. multocida* ssp. *multocida* und *P. species* publiziert, während derartige Ansätze für die Identifizierung von *Mannheimia*-Spezies lediglich für den Nachweis des *lktA*-Gens existieren. Die Etablierung diagnostischer Werkzeuge konzentrierte sich meist auf die mit bestimmten Wirtstieren oder Erkrankungskomplexen assoziierten *P. multocida* ssp.-Stämme. So wurden für die Identifizierung von Hämorrhagische Septikämie (HS)-Stämmen zwei PCRen entwickelt, die auf dem Nachweis eines über die subtraktive Hybridisierung zwischen einem apathogenen (nicht-HS-Stamm) mit einem HS-Stamm ermittelten spezifischen DNS-Sequenz bzw. auf der Amplifikation der für B:2-Stämme spezifischen 16S rRNS – 23S rRNS-Sequenz basierten (HSB-PCR) [32, 311]. Bei der Anwendung der HSB-PCR zur Untersuchung des pathogenetischen Potentials von *P. multocida*-Stämmen von Schweinen in Vietnam waren 19 von 32 Isolaten positiv, jedoch gehörten nur acht dem Kapseltyp B an [312]. Zur validen Identifizierung von HS-Stämmen kann diese PCR also nur nach zusätzlicher Bestimmung des Kapseltyps eingesetzt werden. Aufgrund der geringen Inzidenz der Hämorrhagischen Septikämie in Deutschland und im gesamten europäischen Raum ist diese diagnostische PCR ohnehin für die Fragestellung der Diagnostik von *P. multocida* ssp.-Isolaten, insbesondere der Kapseltypen A, D und F und deren Charakterisierung für den europäischen Raum nicht relevant.

Auch für den Nachweis aviärer *P. multocida* ssp. wurden in der Vergangenheit unterschiedliche PCRen entwickelt. Dazu gehört beispielsweise die *psl*-PCR [161] oder die Serotyp 1-spezifische Pm-PCR [275]. Die *psl*-PCR kann aufgrund ihrer eingeschränkten Spezifität, die sich, wie die vorliegende Arbeit belegt, in einer zusätzlichen Detektion des *psl*-Gens von *P. canis*, *P. dagmatis* und *P. stomatis* ausdrückt, vor dem Hintergrund des Bakterienspektrums bei Wirtstieren, wie insbesondere Hunden und Katzen, nicht als spezifisches

Diagnostikum für *P. multocida* ssp. sämtlicher tierartlicher Herkunft empfohlen werden, entspricht aber durchaus ihrem Anspruch des Nachweises aviärer *P. multocida* ssp..

Auch die Pm-PCR, die im Übrigen neben dem Serotyp 1 auch Serotyp 14-Isolate detektiert, ist speziell für die Identifizierung von Geflügel-Cholera-Isolaten entwickelt worden. Eine weitere, als *P. multocida* ssp. *multocida*-spezifisch publizierte PCR basiert auf dem Nachweis des über die subtraktive Hybridisierung identifizierten Genabschnittes *kmt* [311]. Die Spezifität dieser PCR wurde an zahlreichen Vertretern aus der Familie der *Pasteurellaceae*, unter anderem an der *Pasteurella sensu stricto*-Gruppe getestet, und es muss einschränkend festgestellt werden, dass *kmt* auch bei den Subspezies *P. multocida* ssp. *septica* und *gallicida*, sowie auch bei *P. canis* Biotyp 2-Stämmen amplifiziert wurde. Der Nachweis von KMT wurde deshalb in eine der etablierten diagnostischen Multiplex-PCRen integriert, da er ein sehr hilfreiches Tool zur ersten Identifizierung *P. multocida*-verdächtiger Isolate darstellt.

Zur Charakterisierung und zum Nachweis von Virulenzdeterminanten bei *Pasteurella*-Isolaten vom Rind wurden bis heute keine speziellen molekularen Assays entwickelt, ebenso wenig ging die Charakterisierung von Schweine-, Kaninchen- und Kleine Wiederkäuer-Isolaten, abgesehen von gezielten epidemiologischen Fragestellungen mittels DNS-Fingerprinting und Ribotypisierungen, die auch an Rinderisolaten durchgeführt wurden [71, 142, 330] über den Nachweis des *toxA*-Gens mit zusätzlicher konventioneller Bestimmung des Kapseltyps hinaus. Noch weniger Daten liegen für *Pasteurella*-Isolate von Hunden und Katzen vor.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zur Prävalenz virulenzassoziiierter Faktoren an einem Kollektiv an *Pasteurella*- und *Mannheimia*-Isolaten bildeten die Grundlage für die Etablierung von zwei Multiplex-PCRen. In der ersten Multiplex-PCR, die eine schnelle und direkte Identifizierung und Differenzierung von *P. multocida* ssp. und *M. haemolytica* ermöglicht, wie es beispielsweise bei einer Mischkultur aus einem Nasen- oder Rachentupfer von Patiententieren mit respiratorischer Erkrankung erforderlich ist, wurden Primerpaare zum Nachweis von sechs Genen integriert. Nachgewiesen werden in dieser Multiplex-PCR in *P. multocida* ssp. der Genabschnitt KMT, die Gene für die Kapseltypen A und D, die in Deutschland und auch weltweit nach wie vor die größte pathogenetische Bedeutung besitzen, sowie das tierseuchenrechtlich relevante *toxA*-Gen. Zur Identifizierung von *M. haemolytica* wurden Primerpaare für den Nachweis des wichtigsten und bei allen Stämmen nachgewiesenen *lktA* sowie im Falle des Vorliegens einer natürlichen *lktA*-negativen Mutante des äußeren Membranproteins *pomA* integriert.

Die Ergebnisse einer zweiten Multiplex-PCR sollten Aufschluß über das Vorkommen und die Verteilung von zehn virulenzassoziierten Genen bei *P. multocida* ssp.-Wildtypstämmen geben, die eine Charakterisierung von Isolaten beispielsweise im Rahmen epidemiologischer Studien möglich machen. Zukünftig könnte so die Virulenz von Wildtypstämmen eingeschätzt werden. Auch hier waren die mittels DNS-DNS-Hybridisierung und PCR ermittelten Ergebnisse die Grundlage für die PCR-Etablierung. Für eine routinemäßige Anwendung eines diagnostischen Werkzeuges musste zuvor die Validität der PCR für jedes der nachzuweisenden Gene überprüft werden. Die hier erarbeiteten Daten belegten eine sehr hohe Übereinstimmung der Ergebnisse von DNS-DNS-Hybridisierung und PCR (Kap. 4.1.2.3), die vor allem durch die sorgfältige Auswahl der Oligonukleotid-Primer erreicht wurde. Deshalb empfehlen wir die Multiplex-PCRen als moderne Diagnostika zur zweifelsfreien Identifizierung.

Aufgrund der in dieser Arbeit ermittelten Virulenzmuster von Spezies aus der *Pasteurella sensu stricto*-Gruppe konnten mittels der zweiten Multiplex-PCR falsch deklarierte und zugesandte Referenzstämmen oder auch zuvor biotypisch als *P. canis* oder *P. avium* typisierte Wildtyp-Isolate identifiziert und korrekt klassifiziert werden. Obwohl nur eine geringe Anzahl *P. sensu stricto*-Spezies untersucht wurde, war doch eine Regelmäßigkeit in dem Vorkommen der virulenzassoziierten Gene zu erkennen. Neben *ompH*, dessen Nachweis aufgrund seiner Sequenzvariabilität nicht in die Multiplex-PCR integriert wurde, besaßen die *Pasteurella* spp. von den in der Multiplex-PCR nachzuweisenden Genen nur *oma87* (*P. canis* und *P. dagmatis*) oder *tonB* (*P. dagmatis*). Auf der anderen Seite gab es unter den 289 *P. multocida* ssp.-Isolaten, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, kein Isolat, das die bei *Pasteurella sensu stricto*-Stämmen gefundenen Genkombination aufwies und ebenso kein Isolat, bei dem alle zehn in der Multiplex-PCR integrierten Primer-Paare kein Produkt amplifizierten. Der Nutzen und die Praktikabilität dieser diagnostischen Assays versprechen also groß zu sein und können in Zukunft zu einer eindeutigen Charakterisierung von Untersuchungsisolaten beitragen. Damit steht endlich eine Grundlage für valide epidemiologische Studien zur Verfügung.

Bedeutung einzelner virulenzassoziiierter Gene bei *Pasteurella*- und *Mannheimia*-Spezies

Aufgrund der Vielzahl der in dieser Arbeit generierten Daten wird die Besprechung der Prävalenz einzelner virulenzassoziiierter Gene, wie bereits oben erwähnt, auf solche Aspekte beschränkt, die Hinweise auf eine Veränderung der Epidemiologie dieser Bakterienspe-

zies geben, bzw. bei neu identifizierten Genen erstmals Daten zu deren Verteilung und Vorkommen bei den unterschiedlichen Wirtstieren und *P. multocida* ssp.-Kapseltypen liefern.

Kapselantigene und dermonekrotisierendes Toxin bei *Pasteurella*-Spezies

Da bei *P. multocida* ssp. *multocida* Erkrankungskomplexe und Wirtsadaptation eng mit dem bakteriellen Kapselantigen assoziiert sind, war der Nachweis des Kapseltyps bei dem bezüglich der tierartlichen Herkunft sowie den klinischen Vorberichten sehr heterogen zusammengesetzten Stamm-Material von besonderem Interesse.

Die Ergebnisse bestätigen einerseits in der Literatur beschriebene Sachverhalte, wie z.B. die hohe Adaptation von Kapseltyp A-Stämmen an Rinder und Kälber (92,3 %) sowie an Geflügel (85,7 %) und den im Vergleich zum Kapseltyp A (34,9 %) vermehrten Nachweis von D-Stämmen (62,3 %) beim Schwein [87, 112, 164, 249]. Auffallend war aber andererseits der häufige Nachweis von *capD*-Stämmen (34,9 %) bei kleinen Wiederkäuern neben den in der Literatur vorwiegend im Zusammenhang mit dieser Wirtsspezies beschriebenen *capA*-Stämmen (69,2 %). So wurde erst kürzlich in einer Studie von Weiser et al. (2003) der Kapseltyp A als vorherrschend bei Pneumonie-assoziierten *P. multocida* ssp.-Isolaten von Schafen und Ziegen beschrieben, während nur ein Isolat den Kapseltyp D trug und die Autoren davon ausgingen, dass dieses vermutlich von einer Wildziege auf das Schaf übertragen wurde [321].

Obwohl in der vorliegenden Arbeit zwei Drittel der untersuchten Schweine-Isolate *capD* besaßen, war nur bei einem der Tiere bekannt, dass es klinische Symptome der mit diesem Kapseltyp assoziierten Erkrankung Rhinitis atrophicans (AR) zeigte. Bei allen anderen Schweinen, bei denen zu gleichen Teilen *P. multocida*-Isolate mit den Kapselantigenen A und D isoliert wurden, lagen entweder pneumonische Geschehen vor, die bisher vor allem mit Kapseltyp A-Stämmen assoziiert wurden [75, 112], oder die Tiere waren klinisch gesund. Im Gegensatz dazu waren zwei Schweine, von denen *toxA*-negative Kapseltyp A-Stämme isoliert wurden, an der AR erkrankt. Verfolgt man die Literaturdaten, so deutet sich eine Verschiebung des früher fast ausschließlich mit der AR assoziierten Kapselantigens D zu einer wachsenden Bedeutung des Kapseltyps A für diesen Erkrankungskomplex an. So fand man in AR-positiven Schweineherden in Dänemark, dass immerhin 38 % der *P. multocida* ssp. *multocida*-Isolate vom Kapseltyp A waren [179]. Auffallend war auch die fehlende Assoziation der Präsenz des *toxA*-Gens in einem Isolat vom Schwein zur klinischen Erkrankung der AR.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Besiedlung des Respirationstraktes bei Schweinen mit Toxin-bildenden *P. multocida*-Stämmen nicht zwangsläufig in der klinischen Erkrankung

der Atrophischen Rhinitis resultieren und bestätigen die Aussagen anderer Autoren, dass die Fähigkeit eines *P. multocida* – Isolates zur Bildung des dermonekrotisierenden Toxins es nicht unbedingt virulent macht [109]. Andererseits weisen die Resultate anderer Studien darauf hin, dass PMT bzw. das kodierende Gen *toxA* in Schweineherden mit AR trotz unterschiedlicher Untersuchungsmethoden nicht immer vorhanden ist [179]. So fanden Lariviere et al. (1992) das Toxin-Gen lediglich bei 38 % der Stämme von Schweinen, die von Farmen stammten, wo die Tiere an AR erkrankt waren, während bei vier Farmen sogar kein Toxin-Nachweis möglich war, obwohl *P. multocida*-Isolate des Kapseltyps D isoliert werden konnten. Diese Daten deuten darauf hin, dass der Respirationstrakt der Tiere von mehreren verschiedenen *Pasteurella*-Isolaten besiedelt waren und diese Mischinfektionen blieben aufgrund der konventionellen Diagnostik, die eine Differenzierung derartiger Stämme nicht leisten kann, unerkannt. Eine weitere Erklärung für die oben geschilderten Daten könnte ein Verlust des phagenkodierten PMT-Gens *in vivo* sein. Ein derartiges Geschehen, dass ebenso wie den Verlust des PMT auch die Möglichkeit der horizontalen Übertragung dieses Toxin-Gens innerhalb der Subspezies und weiteren *Pasteurella*-Spezies impliziert, hätte nicht kalkulierbare Auswirkungen auf die Epidemiologie dieser Erkrankung und wirft ein neues Licht auf die Frage der Wirtsadaptation von *Pasteurella*-Isolaten. Andere Autoren vermuten sogar einen horizontalen Transfer des Kapsel-Biosynthese-Locus inklusive des *toxA*-Gens zwischen verschiedenen Subpopulationen von *P. multocida* ssp., eine Hypothese, die experimentell allerdings bis dato nicht bewiesen ist [75].

Auffallend war in der vorliegenden Arbeit sicherlich auch der häufige Nachweis des Toxin-Gens bei Isolaten von kleinen Wiederkäuern (66,7 %), zumal es in Deutschland keine publizierten Daten über das Vorkommen klinischer Symptome der Rhinitis atrophicans bei Schafen und Ziegen gibt. Lediglich eine Studie aus Norwegen berichtet vom Auftreten der AR in Ziegenherden und vom Nachweis *toxA*-positiver *P. multocida*-Isolate in drei von fünf Herden [12]. Einige Jahre später tauchten in einer weiteren Studie zur Etablierung eines Kolonie-Blot-Assays zum Nachweis von PMT ebenfalls *toxA*-positive Isolate aus Norwegen auf, von denen sieben den Kapseltyp D aufwiesen und nur eins den Kapseltyp A hatte [205]. Während die zitierte Arbeit auf ein vermehrtes Vorkommen Toxin-produzierender Kapseltyp D-Stämme bei kleinen Wiederkäuern hindeutet, kann eine derartige Tendenz aufgrund der hier vorliegenden Untersuchungsergebnisse mit sechs *toxA*-positiven Kapseltyp A- und vier D-Stämmen nicht bestätigt werden. Vielmehr scheinen beide Kapselantigene Toxin-produzierender *P. multocida* ssp. in gleichem Maße an kleine Wiederkäuer adaptiert zu sein. Zum epidemiologischen Zusammenhang der Isolate gibt es leider nur wenige Informationen,

so dass über das Ereignis eines horizontalen Transfers von Kapsel-Biosynthese-Loci oder Toxin-Gen nur spekuliert werden kann. Nach derzeitigem Kenntnisstand scheint die Übertragung des *toxA*-Gens zwischen verschiedenen Kapsel- bzw. auch Serotypen wahrscheinlicher zu sein als die von Kapsel-Biosynthese-Loci. Dafür spricht zum einen die relativ neue Erkenntnis, dass *toxA* phagenkodiert ist und zum anderen die Tatsache, dass der Verlust der Kapsel bei einem Toxin-produzierenden Kapseltyp D-Stamm nicht in einem Verlust der Toxinbildung resultierte, man also nicht von einem Co-Transfer dieser beiden Strukturen ausgehen kann [262].

Der Phage, auf dem das PMT-Gen lokalisiert ist, gehört zur Familie der *Siphoviridae*, zu der z. B. auch die bei *E. coli* vorkommenden Shiga-Toxin-kodierenden Phagen gehören, bei denen ein hohes Ausmaß an horizontalem Transfer beschrieben ist [36]. Da *toxA*-positive *P. multocida*-Stämme nach der Zugabe von Mitomycin lytisch werden, d. h. der Phage induzierbar ist, ist eine Regulation der Expression des *toxA*-Gens durch bestimmte Umgebungsreize im Wirt zwar naheliegend, spricht aber gegen die Ergebnisse einer früheren Untersuchung, in der das kodierende Gen und das exprimierte Toxin bei *P. multocida* ssp.-Stämmen in gleichem Maße nachgewiesen werden konnten, weshalb die Autoren von einer konstitutiven Expression des Gens ausgingen [138, 246].

Sollte eine horizontale Übertragung des Toxin-Gens tatsächlich möglich sein, und davon ist aufgrund der vorliegenden Daten auszugehen, hätte dies immense Auswirkungen auf *P. multocida* ssp.-Populationen, die beispielsweise nur als Kommensalen im oberen Respirationstrakt verschiedener Wirtstiere ansässig sind. Diese könnten durch Aufnahme des Toxin-Gens ein neues pathologisches Potential erhalten. Bei der Isolierung von *P. multocida* ssp. von verschiedenen Wirtstieren sollte in Zukunft eine erhöhte Aufmerksamkeit auf deren Toxin-Bildungsfähigkeit gelegt werden, da durch die vermutliche Transferierbarkeit des Toxin-Gens *in vivo* ein großes Reservoir *toxA*-positiver Isolate in unterschiedlichen Wirtstieren entstehen könnte, wie es z.B. auch für Ratten bekannt ist, die sich auf Schweinebetrieben aufhalten [112]. Darüber hinaus sollte bei der Isolierung von *P. multocida* ssp. aus dem Respirationstrakt von Schweinen und anderen Wirtstieren die Möglichkeit des Vorliegens mehrerer Stämme stärker berücksichtigt werden. Durch die in dieser Arbeit etablierten Multiplex-PCRen sind die Voraussetzungen geschaffen worden, die Stämme auf ihr Virulenzmuster zu testen, um so schnell feststellen zu können, ob sich in einem Tier bzw. in Tieren einer Herde verschiedene *P. multocida* ssp.-Populationen angesiedelt haben. Dieses Wissen ist beispielsweise unerlässlich, wenn es darum geht, im Rahmen von Sanierungsmaßnahmen einen erregerfreien Betrieb zu schaffen.

Da zum Vorkommen der Kapseltypen bei *P. multocida* ssp.-Isolaten von Hunden und Katzen bis dato nur eine Literaturquelle [290] vorlag, kann der vermehrte Nachweis des Kapseltyps A bei Hunde (100 %)- und Katzen-Stämmen (75,9 %) und die deutliche Assoziation dieses Kapselantigens an die beiden Wirtspezies zunächst nur als Erkenntnisgewinn angesehen werden. Überraschend war allerdings der Nachweis des *capF*-Gens bei vier *P. multocida* ssp.-Isolaten von Katzen. Kapseltyp F-Stämme, die erstmals von Puten isoliert wurden und als „minor fowl cholera-Isolate“ gelten [271], weisen also offensichtlich nicht, wie bisher angenommen, eine strikte Assoziation zu Geflügelstämmen auf, sondern wurden in dieser Arbeit nicht nur bei vier Katzen mit Rhinitis, Pneumonie und Knochennekrose, sondern auch bei zwei Kälbern mit Pneumonie und einer nicht näher definierten klinischen Erkrankung isoliert. Bei der erwarteten Wirtspezies, dem Geflügel, wurde *capF* dagegen bei keinem der allerdings nur sieben Isolate nachgewiesen. Auch diese Ergebnisse erfordern zukünftige epidemiologische Studien.

Die *capF*-positiven Katzen- und Kälber-Isolate standen in keinerlei epidemiologischem Zusammenhang und wurden in verschiedenen Zeiträumen und unterschiedlichen Regionen Deutschlands isoliert. Es ist nicht bekannt, ob sich die Tiere in räumlichem Kontakt zu einer Geflügelpopulation aufgehalten haben, so dass ein möglicher horizontaler Austausch des *capF*-Genlocus zwischen *P. multocida*-Isolaten dieser Tiere stattgefunden haben könnte. Da alle Tiere klinisch erkrankt waren, rückt die Bedeutung dieses Kapseltyps auch für Erkrankungen bei Katzen und Rindern in den Vordergrund. Möglicherweise sind die Mikroorganismen zu einem Wirtswechsel in der Lage oder, wie bereits bei Kapseltyp D-Stämmen diskutiert wird, kann der Kapsel-Biosynthese-Locus auf noch nicht bekannte Weise horizontal übertragen werden, so dass die bisher angenommene strikte Assoziation von Kapseltyp F-Stämmen an Geflügel nicht mehr existiert. Die Diagnostik von *P. multocida* ssp. sollte in dieser Richtung mehr Aufmerksamkeit erfahren, damit diese sich andeutende Entwicklung des Austausches von Kapselantigenen bzw. des Wirtswechsels besser eingeschätzt werden kann. Um dieser sich möglicherweise ändernden Epidemiologie der *P. multocida* ssp.-Stämme nachzugehen, insbesondere im Hinblick auf die pathogene Potenz der Kapseltyp F-Stämme für verschiedene Wirtstiere, wurde der Nachweis von *capF* in der in dieser Arbeit entwickelten diagnostischen Multiplex-PCR integriert.

Obwohl in der Vergangenheit über einen Zellkultur-Test mit embryonalen bovinen Lungenzellen Toxin-bildende Stämme von *P. multocida* auch bei Katzen und Hunden identifiziert werden konnten [232], wurde *toxA* bei keinem der 54 untersuchten Katzen- sowie acht Hunde-Isolate nachgewiesen. Neben der Tatsache, dass die untersuchten Isolate tatsächlich

toxA-negativ sein könnten, wären auch andere Möglichkeiten denkbar. So könnte einerseits die Spezifität des Zellkultur-Assays für den Nachweis von PMT in Frage gestellt werden, andererseits wäre es möglich, dass ein Verlust des phagenkodierten PMT *in vivo* bzw. *in vitro* häufiger stattfindet, als bisher angenommen. Es wäre denkbar, dass *toxA*-positive Stämme über einen Wirtswechsel auf Katzen und Hunde übertragen werden und dort der Phage aufgrund der fehlenden pathogenetischen Bedeutung des PMT für diese Tiere verloren geht. Die vorhandenen Daten lassen aber auch den Schluss zu, dass Katzen- und Hunde-Isolate aufgrund der Bildung eines vom PMT differierenden Toxins in dem erwähnten Zellkultur-Assay zytotoxisch gewirkt haben.

Eisenakquirierungssysteme bei P. multocida ssp. und spp. sowie bei Mannheimia sp.

Neue Erkenntnisse konnten in dieser Arbeit auch zur Bedeutung von Eisenakquirierungssystemen bei *Pasteurella*- und *Mannheimia*-Spezies gewonnen werden. Für *M. haemolytica* zeigt sich aufgrund der Prävalenzdaten von *trBA*, *tonB* und *irp*, dass ein nach derzeitigem Kenntnisstand funktionales System zur Akquirierung von Eisen, das sich in einer Kombination von Transferrin-bindenden Proteinen, Rezeptoren und Energielieferanten darstellt, weitaus häufiger in den mit einer höheren Virulenz assoziierten Biogruppe 1-Isolaten vorhanden war als in Stämmen sonstiger Biogruppen.

Während man bei *P. multocida* ssp. bis vor kurzer Zeit nur das Multicidin und einige nicht näher definierte äußere Membranproteine als Eisenakquirierungssysteme kannte, wurden in den vergangenen Jahren mit der Identifizierung des Transferrin-bindenden Proteins TbpA sowie der Hämoglobin-bindenden Proteine HgbA und HgbB drei Faktoren identifiziert, die zwei unterschiedliche Strategien der Eisenaufnahme im Wirt verfolgen [24, 65, 141, 235]. Obwohl eine Expression des Transferrin-Rezeptors bei *P. multocida* ssp. *multocida* bislang nur im Zusammenhang mit Kapseltyp A- und -B-Stämmen beschrieben worden ist, konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass *tbpA* auch in ruminale Kapseltyp D-Stämmen vorhanden ist. Neben Rindern und Büffeln konnte hier aber auch erstmalig das *tbpA*-Gen mit einer hohen Prävalenz von 80 % bei Isolaten von kleinen Wiederkäuern nachgewiesen werden. Bei *Histophilus somni* (ehemals *Haemophilus somnus*) wurden vor kurzer Zeit zwei separate Transferrin-Rezeptorsysteme identifiziert, wovon eines spezifisch war für bovines Transferrin und das andere alle ruminale Transferrine binden konnte [97]. Ob auch bei *P. multocida* evtl. verschiedene Transferrin-Bindungssysteme existieren, müsste aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnis, dass *tbpA*-positive Isolate nicht nur von Rindern

sondern auch von kleinen Wiederkäuern isoliert werden konnten, durch weitere Untersuchungen geklärt werden, beispielsweise in Form selektiver Affinitätstests.

1994 wurde das 82-kDA TbpA erstmals bei HS-assoziierten *P. multocida* Serotyp B:2,5-Stämmen von Büffeln und Rindern nachgewiesen [314]. Auffallend war, dass dieses Rezeptorprotein für Eisen bei Serotyp B:3,4-Stämmen, die aus Wundinfektionen dieser Tiere stammten, nicht exprimiert wurde. Man vermutete, dass die Fähigkeit, Transferrin als Eisenquelle zu nutzen, in direktem Zusammenhang mit der Virulenz von Serotyp B:2,5-Stämmen bei Büffel und Rind steht. In ähnlicher Weise spekulierten andere Autoren, dass TbpA-positive *P. multocida*-Stämme Pneumonie-assoziiert, und Rezeptor-negative Isolate entweder Kommensalen darstellen oder mit anderen klinischen Erkrankungen assoziiert sein könnten [235, 335]. Diese Vermutungen basierten jedoch lediglich auf der Untersuchung weniger Isolate und sind deshalb sehr spekulativ. Die in dieser Untersuchung gewonnenen Daten lassen jedoch durchaus den einer Assoziation des Transferrin-Rezeptors bzw. dessen kodierenden Gens zur HS zu. Eine ebensolche Assoziation zur EBP, wie sie von verschiedenen Autoren vermutet wurde, konnte jedoch nicht bestätigt werden. *TbpA* wurde im Gegenteil zu einem höheren Prozentsatz bei Isolaten klinisch gesunder Rinder und Kälber (54,8 %) nachgewiesen als bei solchen ohne nachgewiesene Assoziation zu einer klinischen Erkrankung (39,7 %). Auffälliger war diese Diskrepanz mit 71,4 % *tbpA*-positiven Isolaten von klinisch Gesunden gegenüber 19,7 % bei Wirten mit klinischer Erkrankung bezogen auf alle Wirtstierspezies. Natürlich beschränken sich diese Aussagen auf die genotypische Ausstattung der Isolate mit dem *tbpA*-Gen unter Ausklammerung jeglicher transkriptionaler Regulationsvorgänge *in vivo*, die in zukünftigen Studien berücksichtigt werden sollten.

Die oben erwähnte Theorie verschiedener Autoren über einen Zusammenhang zwischen der Präsenz des Transferrin-Rezeptors und dem häufigeren Vorkommen im Zusammenhang mit klinischen Erkrankungen wurde in einer späteren Studie zur genetischen Anordnung des *tbpA*-Gens im Chromosom von *P. multocida* ssp. zumindest auf genetischer Ebene unterstützt [235]. Bei der Untersuchung von sechs *tbpA*-positiven Isolaten fand man heraus, dass bei allen Isolaten das Gen stromaufwärts von einem IS1016-Element und stromabwärts von einem Leucyl-tRNS-Synthetase-Gen flankiert war. Während Insertions (IS)-Elemente die kleinsten (800 bis 2.000 bp) bakteriellen mobilen DNS-Elemente mit meist kurzen, endständigen „inverted repeats“ als Bindungsstelle für Transposasen darstellen, weiß man von mobilen genetischen Elementen, dass sie bevorzugt in tRNS-Genloci integrieren

[14]. Beides sprach zumindest auf der molekularen Ebene für eine Transposition des das *tbpA*-Gen enthaltenden Elementes von weniger virulenten auf stark virulente *P. multocida*-Isolate. So lange es allerdings keine experimentellen Studien zur Mobilisierung dieses genetischen Locus oder molekulare epidemiologische Studien zu dessen Vorkommen bei einer repräsentativen Zahl an Isolaten gibt, kann das oben Gesagte nur als Hypothese gelten.

Bei der *Pasteurellaceae*-Spezies *H. influenzae*, bei der die neuartige Insertionssequenz IS1016 erstmals identifiziert wurde, ist der Kapsel-Gencluster zwischen den „direct repeats“ dieses IS-Elementes lokalisiert. Man vermutete, dass bei einer bestimmten phylogenetischen Gruppe dieser Spezies der *cap*-Genlocus als transposables Element durch IS1016 mobilisiert worden war, und dass ein molekulares Substrat entstanden sein könnte, das über eine zusätzliche reversible Amplifikation der *cap*-Gene zu einer verstärkten Kapselproduktion geführt haben könnte [173]. Ähnliches nahm man für *H. influenzae*-Stämme der Biogruppe Aegypticus an, bei der die Assoziation des *cap*-Genlocus an das IS-Element IS1016 in direkter Korrelation mit der Virulenz der Stämme angesehen wurde [88]. Ein experimenteller Beweis für eine IS1016-vermittelte Transposition des Kapsel-Genlocus bei *H. influenzae* fehlt jedoch weiterhin, genau wie es beim *P. multocida* ssp. *tbpA* der Fall ist.

Um zur Klärung der Fragestellung beizutragen wurden in dieser Arbeit ergänzend die flankierenden DNS-Regionen der 91 *tbpA*-positiven *P. multocida* ssp.-Isolate mittels PCR untersucht. Während die stromabwärts des *tbpA* liegenden IS1016-Elementes gelegene Gensequenz, inklusive des Transposase-Gens *tnp*, in allen untersuchten Isolaten konserviert war, konnte nur bei 84 Isolaten die stromaufwärts von *tbpA* lokalisierte Genregion nachgewiesen werden. Bei sieben Isolaten konnte kein Produkt amplifiziert werden, das die *tbpA*- und *leu-cyl-tRNS*-Gene umspannte. Hier bleibt die Frage nach dem *tbpA*-Insertionslocus offen. Vorausgesetzt, dass es sich bei der *tbpA*-Genregion tatsächlich um einen horizontal erworbenen genetischen Locus handelt, wäre es denkbar, dass dieser in einem anderen *tRNS*-Gen inseriert ist. Dies könnte in zukünftigen Studien beispielsweise über eine Makrorestriktion entsprechender Isolate mit nachfolgender Southern Blot-Hybridisierung gegen die *tbpA*-DNS-Sonde geklärt werden. Ohne Zweifel bedarf diese Genregion bei *P. multocida* ssp. einer weiteren Charakterisierung, zumal Transposons auf der Populationsebene als Quelle genetischer Variationen dienen und Bakterien ein hohes Maß an adaptiver Potenz vermitteln [17].

Weiterhin war zu klären, ob auf diesem *P. multocida* ssp.-Genlocus eine operonale Struktur mit einem dem *tbpA* vorgeschalteten zweiten Tranferrin-Gen vorliegt, wie man es

beispielsweise bei *M. haemolytica*, aber auch bei anderen Vertretern aus der *Pasteurellaceae*-Familie kennt. Die Präsenz eines direkt vorgeschalteten zweiten Transferrin-Gens konnte jedoch aufgrund der oben genannten Daten ausgeschlossen werden. Zusätzlich erbrachte eine DNS-DNS-Hybridisierung mit der *M. haemolytica-trpbB*-Sonde bei keinem der untersuchten *P. multocida* ssp.-Isolate ein positives Ergebnis. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit (41,2 %) der DNS-Sequenzen beider Transferrin A-Gene (DNA-Star, ClustalW-Analyse) und der vermuteten ähnlich hohen Identität eines putativen *tbpB*-Gens von *P. multocida* ssp. zu dem von *M. haemolytica* ist das negative Hybridisierungsergebnis durchaus aussagekräftig und erlaubt die obige Schlussfolgerung.

Ergänzende Untersuchungen von nicht *P. multocida* ssp. *multocida*-Isolaten mittels PCR und DNS-DNS-Hybridisierung zeigten zudem, dass das Vorkommen von *tbpA* spezifisch für die Subspezies *P. multocida* ssp. *multocida* ist. Dies ist jedoch nicht verwunderlich, da bisher mit Ausnahme von *P. avium*- und *P. canis* Biotyp 2-Stämmen keine anderen *Pasteurella*-Spezies von Wiederkäuern isoliert worden sind und die vorliegenden Untersuchungen bestätigt haben, dass die Präsenz des Transferrin-Rezeptor-Gens offensichtlich spezifisch für *Pasteurella*-Spezies ruminaler Wirtstierspezies ist.

Während ein Teil des Eisens im eukaryotischen Wirt an Glykoproteine gebunden ist, wie Transferrine, liegt ein weiterer Teil intrazellulären Eisens sequestriert an Häminenthaltende Proteine vor, inklusive Hämoglobin [182]. Man nimmt an, dass bei *P. multocida* ssp. neben der Bindung von Transferrinen als Strategie zur Eisenaufnahme die Akquirierung von Hämin einen bedeutenden Beitrag zur Proliferation des Bakteriums innerhalb des Wirtes darstellt. Obwohl *P. multocida* ssp. kein klassisches Hämolyysin produzieren, konnten bei dieser Subspezies zwei Gene identifiziert werden, die in *E. coli* unter anaeroben Kultivierungsbedingungen einen hämolytischen Phänotyp vermitteln. Das *ahpA*-Gen sowie ein Esterase-Gen verleihen *P. multocida* offensichtlich die Fähigkeit zur Lyse von Erythrozyten und damit zur Freisetzung von Hämoglobin als Häminquelle *in vitro* [66, 145]. Entsprechend haben neuere Untersuchungen gezeigt, dass *P. multocida* ssp. zahlreiche Hämin- und Hämoglobin-bindende Proteine zur Verwertung dieser Eisenquellen besitzt [25].

Die in dieser Arbeit erhobenen Prävalenzdaten weisen darauf hin, dass im Gegensatz zum *tbpA* das Vorkommen der für zwei Hämoglobin-bindende Proteine kodierenden Gene *hgbA* und *hgbB* nicht auf Isolate bestimmter Wirtstierspezies beschränkt zu sein scheint. Au-

Berdem zeigte sich keine auffallende Assoziation zum Kapseltyp oder zur tierartlichen Herkunft der Isolate.

Neben *P. multocida* ssp. *multocida* besitzen auch andere *Pasteurellaceae*-Spezies, wie z.B. *H. influenzae*, verschiedene in die Hämin-Akquirierung involvierte äußere Membranproteine [63, 218]. Die Präsenz von mehr als einem Rezeptor mit der gleichen Funktion könnte für die Mikroorganismen insofern sinnvoll sein, als das sie ihre Fähigkeit zur Hämoglobin- oder Häminbindung erhöht und sie vor negativen Effekten von Mutationen in einem dieser Gene schützt. So konnte gezeigt werden, dass *P. multocida* HgbA- und HgbB-Mutanten nach wie vor in der Lage waren, Hämoglobin zu binden und in keiner Weise die Virulenz des Bakteriums beeinträchtigten [24, 65]. Auch bei einem *H. influenzae*-Isolat führte erst eine Mutation aller vorhandenen Rezeptor-Gene zum Verlust der Hämoglobin-Bindungskapazität [218].

Die Expression zahlreicher Rezeptoren in einem *P. multocida*-Isolat verleiht dem Bakterium darüber hinaus die Fähigkeit, sich an verschiedene zur Verfügung stehende Eisenquellen anzupassen. Damit wäre die Versorgung des Mikroorganismus mit dem lebensnotwendigen Eisen während aller Infektionsstadien gewährleistet und würde erheblich zum pathogenetischen Potential von *P. multocida* beitragen. Die Möglichkeit der Adaptation an verschiedene Wirtsgewebe bzw. -ressourcen mittels der Expression unterschiedlicher Eisenakquirierungssysteme mag ein Grund für das außerordentlich breite Wirtsspektrums dieser bakteriellen Spezies sein.

Die hohe Prävalenz von Eisenakquirierungsgenen in *P. multocida* ssp. und ihre Bedeutung im pathogenetischen Prozess unterschiedlicher Erkrankungskomplexe macht deren Geneprodukte zu attraktiven Kandidaten für Impfstoffe, die bei anderen bakteriellen Spezies, wie *A. pleuropneumoniae*, *H. influenzae* und *N. meningitidis*, bereits in ihrer Protektivität bestätigt werden konnten [137].

Kolonisationsfaktoren bei Pasteurella spp. und ssp.

Der Mechanismus der Ansiedlung an das respiratorische Epithel ist sowohl bei *P. multocida* ssp. als auch bei *M. haemolytica* nur unzureichend bekannt. Obwohl beide Spezies Fimbrien produzieren [91, 151, 211, 216, 253, 281] gibt es derzeit bei *M. haemolytica* keinen Hinweis darauf, dass diese offensichtlich nicht bei allen Stämmen vorhandenen Strukturen eine Rolle in der Pathogenese spielen [195]. Ein molekularer Nachweis der

M. haemolytica-Fimbrien war in dieser Arbeit aufgrund fehlender Sequenzinformationen ebenso wenig möglich wie der eines im Rahmen des Genomprojekts identifizierten aber noch nicht veröffentlichten Neuraminidase-Gens. So konnte bei *M. haemolytica* nur die Prävalenz der Glykoprotease, deren Substrate, die Sialoglykoproteine, sich auf der Oberfläche von Schleimhaut-Epithelzellen befinden, Aufschluss über die Fähigkeit des Mikroorganismus zur Adhärenz an Zellen des oberen Respirationstraktes liefern. Ähnlich wie bei den anderen getesteten virulenzassoziierten Genen war *gcp* bei nahezu allen Biogruppe 1-Isolaten vorhanden, während weniger als die Hälfte der anderen Biogruppen dieses Gen besaßen. Das Enzym scheint also für die pathogenetisch bedeutenderen Biogruppe 1-Isolate von Bedeutung zu sein, zumal auch von einer Wechselwirkung der Glykoprotease mit der Adhäsion an neutrophile Granulozyten sowie mit dem Wirtsimmunsystem berichtet wird [213]. Das regelmäßige Vorkommen von *Gcp* bei Biogruppe 1-Isolaten bekräftigt dessen in unveröffentlichten Studien gezeigte Bedeutung als potentieller Impfantigen gegen die enzootische Bronchopneumonie bei Rindern [213].

Im Gegensatz zu *M. haemolytica* sind in den letzten Jahren bei *P. multocida* ssp. neben dem für Typ 4-Fimbrien kodierenden *ptf* auch die zwei Neuraminidase-Gene *nanB* und *nanH* als potentielle Adhäsionsfaktoren identifiziert worden. In dieser Arbeit wurden erstmals Prävalenzuntersuchungen dieser Gene an einer Vielzahl von *Pasteurella*-Isolaten durchgeführt, die eine Einschätzung der pathogenetischen Bedeutung dieser Virulenzfaktoren erlauben. *Ptf* und *nanB* wurden fast regelmäßig in *P. multocida* ssp.-Isolaten nachgewiesen, aber auch *nanH* besaß eine sehr hohe Prävalenz (87,2 %).

Typ4-Fimbrien gelten bei einer Vielzahl Gram-negativer Spezies, insbesondere bei Schleimhautpathogenen wie *N. meningitidis* und *Pseudomonas aeruginosa*, als Schlüsselement in der Anheftung der Mikroorganismen an die epithelialen Wirtszell-Oberflächen. Sequenzähnliche Fimbrientypen von *Dichelobacter nodosus* und *Moraxella bovis* bzw. deren Untereinheiten stellen bereits die Basis effektiver Impfstoffe gegen die Moderhinke beim Schaf bzw. gegen die infektiöse bovine Keratokonjunktivitis beim Rind dar [281]. Das regelmäßige Vorkommen des *ptf*-Gens bei *P. multocida* ssp.-Isolaten und die in früheren Studien belegten immunologischen Eigenschaften des exprimierten Proteins unterstreichen die Bedeutung dieser Virulenzdeterminante als potentielles Impfantigen. Zukünftige Impf- und Challengeversuche könnten klären, inwieweit das Fimbrienantigen zur Protektion verschiedener Wirtstiere gegen *P. multocida*-Infektionen beitragen kann, und ob nicht nur ein homologer sondern auch ein heterologer Schutz hervorgerufen werden kann.

Im Vergleich zu einer Studie von Ruffolo et al. (1997), in der das Vorkommen dieses Fimbrientyps für Kapseltyp A-, B- und D-Stämme gezeigt werden konnte, konnte in dieser Arbeit belegt werden, dass Typ 4-Fimbrien genauso häufig mit den Kapseltypen E und F sowie mit kapsellosen Stämmen assoziiert sind [281]. Ebenso konnte *ptf* in *P. multocida* ssp. *gallicida*- und ssp. *septica*-Isolaten nachgewiesen werden, während es in keiner der sonstigen untersuchten *Pasteurellaceae*-Spezies vorhanden war. Dies ist insofern nicht verwunderlich, als dass die meisten dieser sonstigen *Pasteurellaceae*-Spezies weder respiratorische noch systemische Erkrankungen hervorrufen, sondern in der Regel mit Wundinfektionen assoziiert sind, wo eine Anheftung über Fimbrien keine Rolle spielt.

Gleiches gilt für die Neuraminidase-Gene *nanH* und *nanB*, die ebenfalls ausschließlich in *Pasteurella multocida* ssp.-Isolaten nachgewiesen werden konnten. Der nahezu regelmäßige Nachweis dieser potentiellen Adhäsingene bei *P. multocida* ssp. *multocida* verleiht dieser Subspezies eine genetische Ausstattung, die einem einzelnen Isolat die Expression von zwei verschiedenen Sialidasen erlaubt. Die hohe pH-Toleranz dieser Enzyme erlaubt deren Aktivität in unterschiedlichen Wirts-Kompartimenten und könnte dem Mikroorganismus nicht nur einen erheblichen Wachstumsvorteil liefern, sondern ihm nach derzeitigem Kenntnisstand auch über eine Demaskierung von Wirtsrezeptoren die Ansiedlung und Invasion von Wirtszellen ermöglichen [214].

Das bis dato eher begrenzte Wissen über die Fähigkeit von *P. multocida* ssp. zur Adhäsion an das respiratorische Epithel als primäre Zielzellen konnte zumindest in der Hinsicht erweitert werden, als dass von allen untersuchten *P. multocida* ssp.-Isolaten immerhin 86,9 % eine Kombination aller drei Kolonisationsfaktoren aufwiesen. Mit der Fähigkeit zur Expression von Fimbrien und insbesondere von zwei Sialidasen in einem Isolat ist eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Etablierung des Bakteriums in verschiedenen Wirtsorganismen bzw. deren Geweben geschaffen. Auch dies könnte ein Grund für das außerordentlich breite Wirtsspektrum von *P. multocida* ssp. sein. Auch bei anderen bakteriellen Spezies, wie *Salmonella*- und *Clostridium*-Spezies, sowie *Streptococcus pneumoniae* wurden Neuraminidasen identifiziert [309]. Bei *S. pneumoniae* konnte gezeigt werden, dass Sialidase-defiziente Mutanten im Vergleich zum Wildtyp Schleimhautoberflächen weniger stark kolonisierten und eine geringere Persistenz auf diesen Strukturen aufwiesen [309]. Außerdem führte eine Immunisierung von Chinchillas mit nativer oder rekombinanter Neuraminidase dieser Spezies zu einer signifikanten Reduktion der nasopharyngealen Kolonisation und zu Verringerung der Inzidenz einer Otitis media bei den Tieren [196]. Ob die *P. multocida* –

Neuraminidasen in gleicher Weise als potentielle Impfantigene genutzt werden können, muss in entsprechenden Challengeversuchen erst untersucht werden. Das nahezu regelmäßige Vorkommen beider Kolonisationsfaktoren bei Isolaten dieser Subspezies stellt zumindest theoretisch eine optimale Voraussetzung für einen Einsatz dieser Proteine als Impfantigene dar.

Schließlich wurde das Vorkommen des als putativen Adhäsions- und Serumresistenzfaktor diskutierten *Pasteurella* filamentösen Hämagglutinins (Pfha) bei *P. multocida* ssp. und *P. species* untersucht, zu dessen Prävalenz es bis heute aufgrund fehlender molekularer epidemiologischer Untersuchungen keine Vorstellungen gab [111, 211]. Im Gegensatz zu den sonstigen Adhäsion-Genen weist *pfha* mit 37,0 % eine niedrige Prävalenz bei *P. multocida* ssp.-Isolaten auf und konnte darüber hinaus bei keinem der anderen in die Untersuchung einbezogenen *Pasteurellaceae*-Spezies, mit Ausnahme von *P. multocida* ssp. *septica*, nachgewiesen werden. Prozentual am häufigsten wurde *pfha* bei Kapseltyp B- und E-Stämmen (je 100 %), gefolgt von F- (57,1 %), A- (40,6 %) und nur bei wenigen D-Isolaten (4,8 %) nachgewiesen. Es kann zwar von keiner strikten Assoziation von *pfha* zu einem bestimmten Kapseltyp gesprochen werden, jedoch war der seltene Nachweis bei nur zwei Kapseltyp D-Stämmen auffällig, die beide vom Schwein stammten. Ebenso wenig gab es, mit Ausnahme der zwei Isolate vom Menschen, keine Wirtsspezies, bei der das Gen überhaupt nicht vorkam. Am häufigsten wurde es bei Isolaten von Bison und Büffel (100 %), Kaninchen (75,0 %), Rind und Kalb (46,2 %) sowie Geflügel (45,0 %) nachgewiesen, während eine niedrige Prävalenz bei Isolaten vom Schwein (21,2 %) und von Katzen (18,5 %) auffielen.

Aus dieser Verteilung ergibt sich natürlich die Frage der pathogenetischen Bedeutung von Pfha im Infektionsprozess. Während man von dem *Bordetella*-Homolog FhaB weiß, dass es die Adhäsion des Bakteriums an die Wirtszellen bestimmt und bereits als Hauptkomponente azellulärer Impfstoffe gegen den Keuchhusten beim Menschen eingesetzt wird, gibt es zu Pfha keinerlei funktionale Studien [288]. Die vermuteten adhäsiven Eigenschaften dieses Hämagglutinins basieren ausschließlich auf dem beim *B. pertussis* FhaB oder dem beim *H. ducreyi*-Lsp1 und -Lsp2 nachgewiesenen Phänotyp [318]. Aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zum Serumresistenzprotein p76 von *H. somnus* (66 % auf AS-Ebene) ging man außerdem davon aus, dass Pfha als Serumresistenzfaktor fungieren könnte [55]. Auch hier fehlen jedoch funktionale Studien zur Verifizierung dieser Hypothese. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass *pfha*-Mutanten eine deutliche Virulenzabschwächung im Maus-Infektionsmodell erfahren haben [111]. Da das septikämische Maus-Modell jedoch weniger die pathogenetischen Vorgänge der EBP widerspiegelt als vielmehr die septikämisch verlaufenden

P. multocida-Infektionen, wie Geflügelcholera und HS, ist der Aussagewert dieser Untersuchung eingeschränkt. Ebenso wenig gibt diese Studie Aufschluss darüber, in welchem Schritt der Pathogenese das Hämagglutinin wirkt. Aufgrund der nun vorliegenden Prävalenz-Daten konnte in jedem Fall gezeigt werden, dass PfhA nicht, wie bisher angenommen wurde, ausschließlich mit der Enzootischen Bronchopneumonie assoziiert ist, sondern auch bei anderen Wirtstieren und im Zusammenhang mit anderen Erkrankungskomplexen vorkommt.

Phylogenetische Analyse der *Pasteurella* spp. und ssp. *ompH*-Gene

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung haben gezeigt, dass die äußeren Membranproteine Psl, Oma87 und OmpH regelmäßig bei *P. multocida* ssp. vorkommen, unabhängig vom Kapseltyp, von der tierartlichen Herkunft der Isolate, sowie vom Gesundheitsstatus der Tiere. Über das Vorkommen der entsprechenden Gene in weiteren *Pasteurella*-Spezies gab es allerdings bis dato keine (für *oma87* und *ompH*) bzw. nur eingeschränkte (für *psl*) Untersuchungen [161]. Im Rahmen dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass alle drei Membranprotein-Gene auch in anderen *Pasteurellaceae*-Spezies vorkommen. Durch eine erhebliche Variabilität in der Größe des Gens innerhalb der *P. multocida* ssp. und spp. fiel allerdings ausschließlich *ompH* auf.

Da auf der Basis der *ompH*-Gensequenz verschiedener *P. multocida* ssp. *multocida*-Kapsel- und -Serotypen bereits in früheren Studien Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb dieser Subspezies aufgezeigt wurden und *ompH* darüber hinaus als potentiell Impfantigen bei der Bekämpfung der Geflügelcholera diskutiert wurde [204], erschien eine genauere Betrachtung der Variabilität der *ompH*-Gene einzelner *Pasteurella*-Isolate interessant. Auf der Basis der Sequenzähnlichkeit von bereits bekannten sowie den zwölf in dieser Arbeit neu identifizierten *Pasteurella-ompH*-Genen wurde mit Hilfe der Neighbour-Joining-Methode ein Dendrogramm erstellt [167]. Die Ergebnisse dieser phylogenetischen Analyse stützten erstaunlicherweise im Wesentlichen die von anderen Autoren bereits beschriebene, auf Basis der 16S rRNS-Sequenzen erstellte verwandtschaftliche Struktur der Familie der *Pasteurellaceae*. In einer phylogenetischen 16S rRNS-Studie von Dewhirst et al. (1993) verteilten sich verschiedene Spezies der Gattungen *Pasteurella*, *Actinobacillus* und *Haemophilus*, sowie nicht eindeutig zuzuordnende Taxons auf insgesamt sieben Cluster [85]. Eines dieser Hauptcluster, bestehend aus Vertretern der Gruppe *Pasteurella sensu stricto* sowie weiteren *Pasteurella*-Spezies, teilte sich weiter in vier phylogenetische Gruppen auf, die in ihrer Zusammensetzung den auf der Basis der *ompH*-Sequenzen gebildeten vier Hauptclustern entsprechen. So befanden sich in der erwähnten phylogenetischen Studie die an Vö-

gel adaptieren Spezies *P. gallinarum*, *P. avium* und *P. volantium* mit wenigen weiteren Spezies in einem der Teilcluster, während sich alle sonstigen *Pasteurella sensu stricto*-Isolate, mit Ausnahme der Spezies *P. langaaensis*, die sich allein in einem weiteren Teilcluster befand, zusammen in einer weiteren phylogenetischen Gruppe sammelten. Phylogenetisch noch weiter entfernt befand sich die Spezies *P. anatis* und wies dementsprechend, ähnlich wie die offensichtlich an Vögel adaptierten *Pasteurella*-Spezies, einen sehr geringen Verwandtschaftsgrad zu den sonstigen Vertretern der *Pasteurella sensu stricto*-Gruppe auf.

Die geringere Verwandtschaft der erwähnten *Pasteurella*-Spezies könnte ein Grund dafür sein, dass in dieser Arbeit lediglich bei einem *P. gallinarum*-Isolat ein *ompH*-Gen identifiziert werden konnte, während dies bei *P. avium*, *P. anatis* und *P. volantium* nicht der Fall war. Hinzu kommt, dass die *ompH*-Sequenz von *P. gallinarum* nicht nur in der Größe, sondern auch in der hohen genetischen Divergenz von 68,9 % auffallend von den anderen identifizierten Genen abwich. Auch die separate phylogenetische Stellung von *P. langaaensis* innerhalb der Familie der *Pasteurellaceae*, die sich in einer erst kürzlich publizierten Arbeit in der Konstituierung der phylogenetischen Gruppe „Langaa“ niederschlug [50], findet in der verwandtschaftlichen Beziehung der *ompH*-Gene insofern ihre Parallelen, als dass das *ompH* dieser Spezies mit 70,4 % die größte Abweichung in der DNS-Sequenz zu einem *P. multocida* ssp. *multocida ompH*-Gen aufwies. Das auf der Basis der 16S rRNS-Sequenz gebildete gemeinsame Teilcluster der *P. multocida* ssp. sowie von *P. canis*, *P. stomatis* und *P. dagmatis* findet ebenfalls eine Übereinstimmung sowohl in den errechneten Daten zur Identität und Divergenz der *ompH*-Gensequenzen dieser Spezies als auch in der Bildung einer gemeinsamen phylogenetischen Gruppe im Dendrogramm.

Die hier gewonnenen Daten lassen also den Schluss zu, dass die verwandtschaftliche Beziehung der *Pasteurella ompH*-Gene die phylogenetische Beziehung der *Pasteurellaceae*-Spezies widerspiegelt und diese taxonomische Gliederung unterstützt. Weitere phylogenetische Untersuchungen dieses äußeren Membranproteins unter Einbeziehung einer größeren Anzahl an Isolaten und der Bestimmung von verschiedenen Alleltypen könnten unter Umständen sogar Hinweise auf den evolutionären Ursprung des *ompH*-Gens bei *Pasteurella*-Spezies geben, wie es beispielsweise bei der Untersuchung des äußeren Membranproteinkodierenden *ompA*-Gens bei *Mannheimia*-Spezies und *P. trehalosi*-Isolaten gelungen ist [74]. Die Auswertung von Sequenzvariationen innerhalb des *ompH*-Gens verschiedener *Pasteurella*-Spezies könnten zudem wichtige Vergleichsdaten zu phylogenetischen Studien darstellen, die auf der Analyse sogenannter „Housekeeping-Gene“ im Rahmen eines Multilokus Sequen-

ce Typing (MLST) gewonnen werden könnten [102]. Auf diese Weise könnte die evolutionäre Entwicklung von Spezies dieser bakteriellen Gattung auf der Basis eines Gens, dessen Produkt als Protein der äußeren Membran einem ständigen Selektionsdruck unterliegt, mit der von hoch konservierten Genen, die weitaus weniger Umweltreizen ausgesetzt sind, verglichen werden. Es ist in der Tat erstaunlich und konnte hier erstmalig gezeigt werden, dass ein Gen, dessen Produkt aufgrund seiner Lokalisation einem hohen Selektionsdruck unterliegt, trotz allem die taxonomische Stellung der entsprechenden Spezies untermauert.

Schlussfolgerung

In dieser Arbeit ist es gelungen, wesentliche neue Einblicke in das Vorkommen und die Verteilung jener virulenzassoziiierter Gene zu erhalten, die prospektive eine Rolle in der Pathogenese von *Pasteurella*- und *Mannheimia*-Infektionskrankheiten spielen. Noch nie wurde unseres Wissens nach eine derart umfangreiche molekulare Analyse durchgeführt. Auf dieser Basis gelang die Etablierung von zwei Multiplex-PCRen, die in zukünftigen Studien die Differenzierung von *Mannheimia*- und *Pasteurella*-Spezies sowie die Charakterisierung verschiedener *Pasteurella*-Spezies ermöglichen. Es konnten Hinweise gefunden werden, dass sich die Epidemiologie der *P. multocida* ssp. in einem Wandel befindet, der u. a. in einem vermehrten horizontalen Genaustausch, einer Verschiebung der Spezifität von Isolaten einzelner Kapselantigene sowie eines sich andeutenden Wirtswechsel begründet ist. Die Daten machen deutlich, dass in Zukunft dringend ausgedehnte epidemiologische Studien durchgeführt werden sollten, um beispielsweise das Besiedlungspotential verschiedener Wirtstiere zu erkennen. Auch für eine bessere Beurteilung des Vorkommens von Mischkulturen bei einem Tier stellen die in dieser Arbeit entwickelten Multiplex-PCRen erstmals eine ideale Voraussetzung dar.

Die genotypische Charakterisierung insbesondere von *P. multocida* ssp. ist weiterhin als Ansatz für die Entwicklung neuer und effektiver Kontrollen gegen die damit assoziierten Erkrankungskomplexe zu sehen. Dies ist in Anbetracht der Tatsache unerlässlich, dass v. a. die Enzootische Bronchopneumonie und die Rhinitis Atrophicans weltweit erhebliche wirtschaftliche Verluste in der Rinder-, Schweine- und Schafproduktion mit sich bringen und bis zum heutigen Tage Therapiemöglichkeiten und Impfstoffe in ihrer Wirksamkeit begrenzt sind.

Diese Arbeit hat darüber hinaus wichtige Grundlagen für anstehende Gen-Expressionsstudien im Rahmen von *in vitro*- sowie für *P. multocida* auch im Rahmen von *in vivo*-Infektionsversuchen gelegt, sowie für die gezielte Auswahl von Kandidaten-Genen für zukünftige Impfversuche.

Die Ergebnisse der phylogenetischen Auswertung der *ompH*-Gensequenzen können zukünftig zur Unterstützung anderer Untersuchungen zur taxonomischen und phylogenetischen Klassifizierung von *Pasteurella*-Spezies herangezogen werden und stellen eine sinnvolle Ergänzung derartiger Analysen dar, als dass sie die evolutionäre Entwicklung dieser Mikroorganismen vor dem Blickwinkel eines unter ständigem Selektionsdruck stehenden äußeren Membranproteins beleuchten.