

Aus dem
Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Genotypische Charakterisierung von porcinen
Pasteurella multocida aus dem Atmungstrakt von klinisch gesun-
den und erkrankten Schweinen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Astrid Bethe
Tierärztin aus Oranienburg

Berlin 2010

Journal-Nr.: 3465

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. L.H. Wieler
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. K. H. Lahrmann
Dritter Gutachter: Prof. Dr. H. Tönhardt

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Pasteurella multocida, respiratory diseases, pigs, polymerase chain reaction, ribotyping, multilocus sequence typing

Tag der Promotion: 27.05.2011

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-986-6

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meiner Familie

VERZEICHNIS VERWENDETER ABKÜRZUNGEN IV

1. EINLEITUNG 1

2. LITERATURÜBERSICHT 2

2.1. *Pasteurella multocida* 2

2.1.1. Erstbeschreibung des Erregers durch Louis Pasteur 2

2.1.2. Taxonomie von *P. multocida* 2

2.1.3. Methoden zur Isolierung, Identifizierung und Typisierung von *P. multocida*-Isolaten 4

2.1.3.1. Isolierung von *P. multocida* aus Probenmaterial und phänotypische Identifizierung von *P. multocida* 4

2.1.3.1.2 Phänotypische Identifizierung 5

2.1.3.2. Serologische und Antikörper-basierte Identifizierung und Typisierung von *P. multocida*-Isolaten 6

2.1.3.2.1 Serologische Identifizierung und Typisierung von *P. multocida*-Isolaten 6

2.1.3.2.2 Antikörper-basierte Identifizierung von *P. multocida* 7

2.1.3.3. Bestimmung der Kapseltypen bei *P. multocida*-Isolaten 8

2.1.3.4. Bandenbasierte Methoden zur Charakterisierung von *P. multocida* 10

2.1.3.4.1 Charakterisierung von *P. multocida* auf der Basis von äußeren Membran Protein-Profilen 10

2.1.3.4.2 Identifizierung und Charakterisierung von *P. multocida* mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 11

2.1.3.4.3 Restriktionsendonukleasen-Analyse (REA) 17

2.1.3.4.4 Ribotypisierung 18

2.1.3.4.5 Pulsfeld-Gelelektrophorese 19

2.1.3.4.6 Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) 19

2.1.3.4.7 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) 20

2.1.3.5. Sequenzanalysen-basierte Methoden zur Charakterisierung von *P. multocida*- Isolaten 20

2.1.4. *Pasteurella multocida* als Krankheitserreger 21

2.1.4.1. Pasteurellosen der Schweine 23

2.1.4.1.1 Progressive atrophische Rhinitis (PAR) 23

2.1.4.1.2 *Pasteurella*-Pneumonie der Schweine 24

2.1.5. Virulenzassoziierte Faktoren und deren Bedeutung bei der Impfstoffforschung 25

2.1.5.1. Ganzzellvakzinen (Totimpfstoffe; attenuierte Lebendimpfstoffe) 27

2.1.5.2. Immunogene Wirkung einzelner *P. multocida*-Antigene 29

2.1.5.2.1 Adhäsionsfaktoren 29

2.1.5.2.2 Kapseltypen 32

2.1.5.2.3 Lipopolysaccharid (LPS) 34

2.1.5.2.4 Äußere Membran Proteine (OMP) 36

2.1.5.2.5 Eisenakquirierungssysteme 38

2.1.5.2.6 *P. multocida* Dermonekrotoxin; DNT (*toxA*) 41

2.1.5.2.7 Neuraminidasen 43

2.1.5.2.8 Lipoproteine 44

2.1.5.2.9 AroA 45

3. MATERIAL UND METHODEN 48

3.1. Bakterienstämme 48

3.1.1. *P. multocida*-Wildtypisolate 48

3.1.2.	Kontroll- und Referenzstämme	49
3.2.	Bakteriologische Untersuchung von Organproben und Identifizierung von <i>P. multocida</i>	50
3.3.	Asservierung der Bakterienstämme und Anzucht für experimentelle Untersuchungen	50
3.4.	Molekulargenetische Methoden zur Charakterisierung der <i>P. multocida</i>-Isolate	50
3.4.1.	Gewinnung genomischer DNS	50
3.4.1.1.	Hitzelyse	50
3.4.1.2.	Aufreinigung genomischer DNS.....	51
3.4.1.3.	Extraktion von PCR-Produkten aus Agarosegel	51
3.4.1.4.	Aufreinigung der PCR-Produkte	51
3.4.2.	Konzentrationsbestimmung isolierter DNS	52
3.5.	Polymerase-Kettenreaktion	52
3.5.1.	Oligonukleotidprimer	52
3.5.2.	Reaktionsansätze und Thermocycler-Programme für die Multiplex-PCR-Untersuchungen	55
3.5.3.	Reaktionsansätze und Thermocycler-Programme für Einzel-PCRen.....	56
3.5.4.	Reaktionsansätze und Thermocycler-Programme für die Untersuchungen der für das <i>Pasteurella</i> filamentöse Hämagglutinin und das Immunglobulin-bindende Protein kodierenden Gensequenzen <i>pfhaB</i> und <i>igbP</i>	56
3.6.	DNS-DNS-Hybridisierung.....	60
3.6.1.	Dot-Blot-Hybridisierung.....	60
3.6.2.	Restriktionsendonuklease-Verdau	60
3.6.3.	Southern Blot (Kapillarblot).....	60
3.6.4.	16 S rRNA-Ribotypisierung.....	61
3.6.5.	Entwicklung des belichteten Röntgenfilmes	62
3.6.6.	Aufreinigen der Membran	62
3.6.7.	Auswertung der 16 S rRNA-Ribotypisierung	63
3.7.	Multilokus Sequenztypisierung (MLST)	63
3.7.1.	Darstellung der MLST-Daten in Minimum-Spanning-Tree (MSTree)	64
3.8.	Statistische Auswertung.....	64
4.	ERGEBNISSE.....	68
4.1.	Ergebnisse der Multiplex-PCR-Untersuchungen	68
4.1.1.	Genotypische Identifizierung von <i>P. multocida</i>	68
4.1.2.	Nachweis virulenzassoziierter Gene.....	68
4.1.2.1.	Nachweis von Kapseltypen, Vorkommen in Isolaten des oberen und unteren RT sowie in Abhängigkeit zu anamnestischen Informationen	68
4.1.2.2.	Nachweis virulenzassoziierter Gene, Verteilung im oberen und unteren RT sowie in Abhängigkeit zu anamnestischen Informationen	71
4.1.3.	<i>Pasteurella</i> filamentöses Hämagglutinin (<i>pfhaB</i>).....	73
4.2.	16S rRNA-Hybridisierung (Ribotypisierung).....	75
4.2.1.	Beziehungen zwischen Ribotypen, VAG, Kapseltypen und verfügbaren anamnestischen Informationen (geographische Herkunft, Krankheitsstatus, anatomische Herkunft).....	78
4.3.	Multilokus Sequenztypisierung (MLST)	79

5. DISKUSSION	85
5.1. Die auftretenden VAG-Muster zeigen eine geringe Variabilität innerhalb der derzeit in deutschen Schweinebeständen vorkommenden <i>P. multocida</i>	85
5.2. Die Mehrheit der untersuchten porcinen <i>P. multocida</i> gruppieren sich in nur drei 16S rRNA-Ribotypmustern	91
5.3. Erste MLST-Untersuchungen bestätigen eine geringe genetische Variabilität..	93
5.4. Immunogene Wirkung	97
6. ZUSAMMENFASSUNG	99
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	103
8. ANHANG	120
8.1. Nährmedien.....	120
8.1.1. flüssige Nährmedien	120
8.1.2. feste Nährmedien	120
8.2. Reagenzien.....	120
8.3. Lösungen, Puffer und Enzyme	121
8.3.1. Puffer, Lösungen und Enzyme für die Polymerase-Kettenreaktion	121
8.3.2. Puffer und Lösungen für die horizontale Agarosegel-Elektrophorese	121
8.3.3. Puffer und Lösungen für Southern Blot und DNS-DNS-Hybridisierung.....	122
8.4. Benötigte Materialien zum Aufbau eines Southern Blot (Kapillarblot).....	123
8.5. Protokoll zur 16S rRNA-Ribotypisierung	124
8.6. Bezugsquellen von Geräten, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....	125
8.7. Tabellarische Darstellung aller untersuchter Isolate, vorbereichtlicher Informationen sowie der Ergebnisse der durchgeführten PCR-Untersuchungen, Ribotypisierung und MLST	127

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

A.	<i>Actinobacillus</i>
A. bidest	Aqua bidest (zweifach destilliertes Wasser)
Abb.	Abbildung
AR	Atrophische Rhinitis
ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA
B.	<i>Bordetella</i>
BHI	Hirn-Herz-Bouillon (engl. Brain heart infusion broth)
bp	Basenpaare
BRSS	Blocking Reagenz Stock Solution
°C	Grad Celsius
Cap	Kapsel
CCUG	Culture Collection, University of Göteborg, Schweden
Cfu	Colony forming Units (koloniebildende Einheiten)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNT	Dermonekrotoxin
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBP	Enzootische Bronchopneumonie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERIC-PCR	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase-Kettenreaktion
f	Forward (sense)
FHA	Filamentöses Hämagglutinin
g	Gramm
G-C-Gehalt	Guanin-Cytosin-Gehalt
h	Stunde
HCl	Hydrochlorid (Salzsäure)
HgbP	Hämoglobin-bindendes Protein
H.	<i>Haemophilus</i>
HS	Hämorrhagische Septikämie
Ig	Immunglobulin
IHIT	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
i. m.	intramuskulär
i. n.	intranasal
i. p.	intraperitoneal

IROMP	Iron regulated outer membrane protein
Kap.	Kapitel
KbE	Koloniebildende Einheiten
kpb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
konz.	Konzentriert
KPS	Kapselpolysaccharid
l	Liter
Lkt	Leukotoxin
Lpp	Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
µg	Mikrogramm
µM	Mikromol
<i>M.</i>	<i>Mannheimia</i>
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
MLST	Multilokus Sequenztypisierung
mM	Millimolar
MSTree	Minimum spanning tree
Multiplex-PCR	Multiplex-Polymerase-Kettenreaktion
<i>N.</i>	<i>Neisseria</i>
n	number (Anzahl)
NaCl	Natriumchlorid
Nan	Neuraminidase
NaOH	Natriumhydroxid
NCTC	National Collection of Type Cultures, Colindale, Großbritannien
OM	Outer membrane (äußere Membran)
OMP	Outer membrane protein
oRT	Oberer Respirationstrakt
<i>P.</i>	<i>Pasteurella</i>
PAR	Progressive atrophische Rhinitis
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RA	Rhinitis atrophicans

REA	Restriktion Enzyme Analysis
REP-PCR	Repetitive Extragenic Palindromic-Polymerase-Kettenreaktion
resp.	respektive
Pfha	<i>Pasteurella</i> filamentöses Hämagglutinin
p. i.	post infectionem
Plp	<i>Pasteurella</i> Lipoprotein
pmol	Pikomol
PMT	<i>Pasteurella multocida</i> Toxin
PomA	<i>Pasteurella</i> outer membrane protein A
Psl	P6-like
r	reverse (antisense)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
sec	Sekunden
s. o.	siehe oben
sog.	sogenannt, sogenannte
spp.	Spezies
ssp.	Subspezies
ST	Sequenztyp
STC	Sequenztypkomplex
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TbP	Transferrinbindendes Protein
TE	Tris-EDTA
ToxA	Dermonekrotoxin A
TSYE	Trypton-Soja-Hefe-Extrakt (engl.: tryptic soy yeast extract)
U	Units
u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
uRT	Unterer Respirationstrakt
UV	Ultraviolett
V	Volt
v. a.	vor allem
VAG	Virulenzassoziiertes Gen
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1. EINLEITUNG

Seit der Entdeckung von *Pasteurella multocida* vor rund 130 Jahren konnten viele Informationen zu diesem bakteriellen Pathogen zusammengetragen werden. In der frühen Phase der mikrobiologischen Forschung gegen Ende des 19. Jahrhunderts wurde der Mikroorganismus als verursachendes Agens der Geflügelcholera identifiziert und diente gar zur Entwicklung eines der ersten Impfstoffe (115).

Mit größer werdenden Tierbeständen spielen Infektionserreger z. B. in den deutschen Schweine-, Rinder- oder Geflügelbeständen eine immer bedeutendere Rolle. Obwohl *P. multocida* als einer der wichtigsten Krankheitserreger im porcinen Respirationstrakt gilt und enorme wirtschaftliche Verluste durch verminderte Lebendgewichtszunahmen, erhöhte Behandlungskosten und vermehrte Organverwürfe verursacht, sind noch immer viele Fragen nach der Pathogenese und der Bedeutung der bekannten virulenzassoziierten Faktoren sowie der Diversität dieses bakteriellen Infektionserregers in deutschen Schweinebeständen ungeklärt. Auch sind bislang keine Studien mit einer umfassenden vergleichenden Charakterisierung von *P. multocida* aus klinisch kranken und klinisch gesunden Schweinen veröffentlicht. Solche Untersuchungen sind jedoch von enormer Bedeutung für das Verständnis des Infektionsverlaufes und der Ausbildung einer Erkrankung. Ziel dieser Arbeit ist es daher, mit Hilfe der molekularbiologischen Methoden der PCR, der 16S rRNA Ribotypisierung und der MLST einen ersten Beitrag dazu zu leisten, diese Lücke zu schließen und folgende Themen zu bearbeiten:

- Durch die Untersuchung von *P. multocida* sowohl von klinisch erkrankten als auch klinisch gesunden Tieren soll die Frage nach möglichen Unterschieden zwischen pathogenen und kommensalen Stämmen beleuchtet werden.
- Die Untersuchung von *P. multocida* aus dem oberen sowie unteren Respirationstrakt erfolgt im Hinblick auf Eigenschaften, die einen Selektionsvorteil im jeweiligen Habitat zu geben scheinen.
- Mittels 16S rRNA Ribotypisierung und computergestützter Auswertung der Ergebnisse soll ein Verwandtschaftsbaum aller untersuchten Isolate erstellt werden, der eine Aussage über die Phylogenie porciner *P. multocida* in deutschen Schweinebeständen erlaubt.
- Die Anwendung der MLST soll erstmals einen Ansatz zur Beschreibung der Populationsstruktur porciner *P. multocida* ermöglichen.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. *Pasteurella multocida*

2.1.1. Erstbeschreibung des Erregers durch Louis Pasteur

Louis Pasteur (27.12.1822 – 28.09.1895), französischer Physiker, Chemiker und Mikrobiologe, machte sich auf vielen Gebieten, unter anderem durch die Erforschung verschiedener Tierseuchen, verdient. Im Rahmen seiner Arbeiten bezüglich des Einflusses von Mikroorganismen auf die Gesundheit von Mensch und Tier gelang es dem Forscher Ende des 19. Jahrhunderts, den Erreger der Geflügelcholera erstmals nachzuweisen. Darüber hinaus konnte er durch multiple Passagen einen attenuierten *P. multocida*-Stamm herstellen, der als einer der weltweit ersten Impfstoffe vakziniertes Geflügel vor einer Erkrankung nach Infektion mit einem virulenten Stamm schützte (115, 217).

Die Arbeiten von Louis Pasteur fanden ihre Würdigung, als der italienische Graf Trevisan für das ätiologische Agens der Erkrankung den Gattungsnamen *Pasteurella* zu Ehren des Forschers und seiner Erfolge auf dem Forschungsgebiet der Geflügelcholera vorschlug (204, 292) und so die bis heute gültige Nomenklatur des Bakteriums, welches über die Zeit als „*Micrococcus gallicidus*“, „Bacterium“, „Octopsis“, „Coccobacillus“ oder auch „Euczstia“ bezeichnet wurde, prägte. Die Speziesbezeichnung „*multocida*“ („multus“ = viel; „caedo“ = tödend) folgte der Gattungsbezeichnung 1939 (250), denn diese wurde schon früher von verschiedenen Fachleuten verwendet, kombiniert mit den verschiedenen Gattungsnamen (164).

2.1.2. Taxonomie von *P. multocida*

Die taxonomische Einordnung der Familie der *Pasteurellaceae* unterliegt immer wieder umfangreichen Umstrukturierungen und Reklassifizierungen. Die ursprüngliche Klassifikation wurde aufgrund morphologischer Eigenschaften, z. B. der bipolaren Anfärbbarkeit der Bakterienzellen nach direktem Organabklatsch auf einem Objektträger, oder anhand phänotypischer Charakteristika vorgenommen (13, 176). Diese erweisen sich durch Inkonsistenz und Variabilität vieler biochemischer Reaktionen jedoch als zeitintensiv und fehlerbehaftet. Durch die Verfügbarkeit molekularbiologischer Methoden, DNS-DNS-Hybridisierungstechniken oder DNS-Sequenzanalysen, wurde die Reklassifizierung der bisherigen Vertreter der Familie der *Pasteurellaceae* sowie die Bildung neuer Genera innerhalb der Familie sowohl möglich als auch nötig. Sie ist bis heute nicht abgeschlossen (14, 15, 47).

Nicht nur die taxonomische Neueinordnung von zunächst als *Pasteurella* spp. missidentifizierten Isolaten zu anderen Familien, sondern gerade die Verhältnisse innerhalb der Familie unterlagen und unterliegen noch immer Neustrukturierungen. Mit zunehmender Qualität der zur Verfügung stehenden Untersuchungsmethoden wurden zahlreiche Vertreter der *Pasteurellaceae* reklassifiziert, so dass die Familie derzeit 15 Genera umfasst – Tendenz steigend (Tab. 1).

Tab. 1 Übersicht über die Genera innerhalb der Familie *Pasteurellaceae*

Genus	Wirtstierspezies	Erkrankungskomplexe	Referenz
<i>Actinobacillus</i>	Säugetiere, Mensch	Wundinfektion, Septikämie, Endocarditis, Arthritis, Pneumonie, Actinobacillose	(53, 82)
<i>Aggregatibacter</i>	Mensch	Kommensale; Peridontitis; Endocarditis	(212)
<i>Avibacterium</i>	Haus-, Wildgeflügel	Geflügelcholera-ähnliche Läsionen, Herzklappenendocarditis	(15, 82)
<i>Basfia</i>	Rind	Keine Informationen	(82, 157)
<i>Bibersteinia</i>	Schaf	Systemische Infektionen, Pneumonie	(14, 82)
<i>Chelonobacter</i>	Schildkröte	Isoliert aus erkrankten Schildkröten	(109)
<i>Gallibacterium</i>	Haus-, Wildgeflügel; (Rind)	Salpingitis, Oophoritis, Peritonitis, Pericarditis, Hepatitis, Enteritis, Infektionen des oberen Respirationstraktes, Septikämie	(47)
<i>Haemophilus</i>	Säugetiere, Haus-, Wildgeflügel, Mensch	Erkrankungen des Respirationstraktes, Meningitis, Glässersche Krankheit, Coryza contagiosa	(82, 216)
<i>Histophilus</i>	Rind	Infektiöse septikämisch-thrombosierende Meningoenzephalitis (ISTME)	(82)
<i>Lonepinella</i>	Koala	Keine Informationen	(105)
<i>Mannheimia</i>	Säugetiere, (Mensch)	Erkrankungen des Respirationstraktes	(83, 84)
<i>Nicoletella</i>	Pferd	Erkrankungen des Respirationstraktes	(156)
<i>Pasteurella</i>	Säugetiere, Haus-, Wildtiere, Mensch	Erkrankungen des Respirationstraktes, Septikämie, Abszessbildung, Wundinfektion; Porcines Dermatitis- und Nephropathie-Syndrom (unklar)	(18, 66, 85, 86, 287)
<i>Phocoenobacter</i>	Schweinswal	Keine Informationen	(92)
<i>Volucribacter</i>	Haus-, Wildgeflügel	Erkrankungen des Respirationstraktes, Septikämie	(46)

Das Genus *Pasteurella* Trevisan 1887 selbst wurde auf Grundlage von DNS-DNS-Hybridisierungen neu klassifiziert (204). Elf Spezies wurden innerhalb des Genus *Pasteurella sensu stricto* definiert und die Spezies *P. multocida* in die drei Subspezies *P. multocida* ssp. *multocida*; *P. multocida* ssp. *septica* sowie *P. multocida* ssp. *gallicida* unterteilt. Die instabile phänotypische Unterscheidung der drei Subtypen erfolgt durch Testung der Fermentation von Sorbitol und Dulcitol (204). Eine vierte Subspezies, *P. multocida* ssp. *tigris* ssp. nov., wurde neben *Neisseria weaveri* aus der Wunde eines Kindes nach Bissverletzung durch einen Tiger angezüchtet (33). Die Identifizierung erfolgte mittels biochemischer Charakterisierung sowie anschließender 16S rRNA Sequenzanalyse, welche eine hohe Übereinstimmung mit den in öffentlich zugänglichen Datenbanken (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) hinterlegten Sequenzen von *P. multocida* ssp. *multocida* (Genbank Acc.-Nr.: AF294410), ssp. *gallicida* (GenBank Acc.-Nr.: AF294412) sowie ssp. *septica* (GenBank Acc.-Nr.: AF294411) aufwies.

2.1.3. Methoden zur Isolierung, Identifizierung und Typisierung von *P. multocida*-Isolaten

2.1.3.1. Isolierung von *P. multocida* aus Probenmaterial und phänotypische Identifizierung von *P. multocida*

2.1.3.1.1 Isolierung von *P. multocida* aus Probenmaterial

Von zentraler Bedeutung für die erfolgreiche Isolierung von *P. multocida* aus oft mit anderen, schneller wachsenden bakteriellen Spezies kontaminiertem oder infiziertem Probenmaterial ist zum einen die kontaminationsarme Entnahme geeigneten Materials sowie die richtige Lagerung und Versendung.

Für die tägliche Diagnostik spielt die phänotypische Keimidentifizierung aus diagnostischem Probenmaterial eine große Rolle, auch wenn durch technische Neuerungen ein Nachweis spezifischer DNS vieler Bakterienspezies direkt aus dem Untersuchungsmaterial per PCR möglich ist. Soweit möglich, ist der Isolierung und Konservierung von Bakterien vor deren Charakterisierung immer der Vorzug zu geben, da nur auf diese Weise weitergehende Untersuchungen, Typisierungen und Konservierung der Bakterien ermöglicht werden. Sollte eine Isolierung nicht möglich sein, ist ein direkter DNS-Nachweis aus dem Probenmaterial, z. B. durch Einsatz einer speziesspezifischen PCR grundsätzlich möglich, jedoch nur unter Verschlechterungen der Spezifität und Sensitivität. Potentiell im Probenmaterial vorhandene PCR-Inhibitoren, wie Gallensalze, Kollagen, Hämoglobin oder Immunglobuline können zu falsch negativen Ergebnissen führen, weshalb diese Methodik nur im Bedarfsfalle eingesetzt

werden sollte und keinesfalls die klassische Mikrobiologie mit Anzucht der Erreger ersetzen darf (74).

Der früher zur Identifizierung von *P. multocida* genutzte Nachweis der Pathogenität für Nager, häufig in Form des Mausinokulationstests durchgeführt, ist heute aus Tierschutzgründen und durch die Verfügbarkeit alternativer Methoden als obsolet anzusehen.

2.1.3.1.2 Phänotypische Identifizierung

Auf Agarplatten mit Schafblutzusatz stellt sich *P. multocida* nach 24 bis 48 h Inkubation bei 37 °C in Form grau-weißlicher, nicht hämolysierender Kolonien dar, die in Abhängigkeit vom Kapseltyp dem mukoiden bzw. nicht-mukoiden Wachstumstyp zugeordnet werden können (244). Durch die Verstoffwechslung von Tryptophan zu Indol verströmen die Kolonien einen typischen, süßlichen Geruch. In der Färbung nach Gram sind die Bakterien als kleine, kokkoide Gram-negative Stäbchen zu erkennen. Mit Hilfe einfacher Färbungen, z. B. Methyleneblaufärbung, lassen sich *P. multocida* in Direktabklatschpräparaten infizierter Organe bipolar anfärben. Diese Eigenschaft geht mit der *in vitro*-Passage verloren.

Verdächtige Kolonien können im Katalase- und Cytochromoxidaschnelltest überprüft werden (244). Eine verzögert positive Reaktion im Cytochromoxidasetest ist typisch für Vertreter der Familie der *Pasteurellaceae*. Einige phänotypisch relevante Reaktionen für die Identifizierung von *P. multocida* sind in Tab. 2 aufgeführt (203, 205). In Gegenwart Hyaluronidasebildender Bakterien, z. B. *Staphylococcus aureus*, zeigen *P. multocida* des Kapseltyps A durch den Hyaluronsäureabbau im Kapselmaterialeine Verkleinerung der Koloniegröße, was zur Identifizierung und ersten Charakterisierung der Isolate herangezogen werden kann (De-kapsulationsphänomen).

Eine Schwierigkeit der konventionellen Identifizierung der *Pasteurella* spp., und somit auch *P. multocida* durch biochemische Charakterisierung, ergibt sich aus den häufig schwachen oder verzögerten Reaktionen der Vertreter dieser Familie. Unter Beachtung des Einflusses der Erfahrung des Untersuchenden besteht bei der Auswertung der Ergebnisse die Gefahr fehlerhafter oder inkonklusiver Diagnosen (101, 265).

Tab. 2 Morphologische und biochemische Charakteristika von *P. multocida* ssp. nach Mutters et al. 1985 (204)

	<i>Pasteurella multocida</i>
Koloniemorphologie	Grau-weißlich, glatt bis schleimig (M-, R-, S-Formen); keine Hämolyse auf Rinder- oder Schafblut
Zellmorphologie	Gram-negativ, kleine, kokkoide Stäbchen; bipolar anfärbbar im Direktausstrich infizierter Organe bei Verwendung monochromatischer Färbungen (z. B. Methylblau)
Katalase	positiv
Cytochromoxidase	positiv (verzögert)
Harnstoffspaltung	negativ
Indolbildung	positiv
Wachstum auf MacConkey-Agar	negativ
Ornithin Decarboxylase	positiv
Maltose	negativ
Mannit	positiv

Die für die Differenzierung der bekannten Subspezies von *P. multocida* genutzten biochemischen Charakteristika sind in Tab. 3 aufgeführt (33, 204).

Tab. 3 Biochemische Merkmale zur Unterscheidung der *Pasteurella multocida*-Subspezies nach Mutters et al. 1985 (204)

<i>P. multocida</i> ssp.	Sorbitol	Dulcitol	Mannitol	Arabinose	Xylose	Maltose	Trehalose	Harnstoff	Indol	Ornithin-decarboxylase
<i>multocida</i>	+	-	+	-	v	-	v	-	+	+
<i>septica</i>	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+
<i>gallicida</i>	+	+	+	v	+	-	-	-	+	+
<i>tigris</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+

v variabel; + positiv; - negativ

2.1.3.2. Serologische und Antikörper-basierte Identifizierung und Typisierung von *P. multocida*-Isolaten

2.1.3.2.1 Serologische Identifizierung und Typisierung von *P. multocida*-Isolaten

Im Laufe der Zeit wurden mehrere Klassifikationssysteme zur Einteilung von *P. multocida* aufgestellt. Eine Methode der Klassifikation nach Roberts in die Typen I bis IV durch passive Immunisierung von Mäusen und anschließender aktiver Belastung bildete 1947 den Anfang (249). Carter nutzte 1955 die serologische Typisierung auf der Basis der bis dato gefundenen Kapselantigene A – D (35). Mittels eines indirekten Hämagglutinationshemmtests (IHA) erfolgt hierbei die Differenzierung der bekapselten Stämme in die Serogruppen A bis D. Der

durch Rimler et al. (1987) beschriebene Kapseltyp F wurde nach seiner Identifizierung in die Differenzierung mit aufgenommen (245). Gewisse Übereinstimmungen zwischen den Systemen von Roberts und Carter sind trotz unzureichender Vergleichsarbeiten festgestellt worden, so scheinen die Typen I, II und V die Äquivalente zu den Serogruppen B, A und D darzustellen (244).

Auch Systeme somatischer Serotypisierungen wurden von zwei Arbeitsgruppen entwickelt (209, 244). Das Namioka-System basiert auf einem Röhrchenagglutinationstest unter Verwendung von aus Kaninchen gewonnenen Antiseren und definierte die Serotypen 1 bis 11 (209, 244). Heddleston hingegen nutzte somatische Antigene auf Grundlage des LPS, die die Einteilung der Isolate in 16 Serotypen mittels Durchführung eines Geldiffusions-Präzipitationstests ermöglichen (120). Im Gegensatz zu Namioka nutzte Heddleston Hühner für die Gewinnung des Antiserums, die eine bessere Reaktion auf das spezifische Antigen zeigen (244). Die Methoden Carters und Heddlestons haben sich gegenüber den übrigen genannten Methoden durchgesetzt (49, 81, 115). Trotzdem werden diese Methoden nur in einigen wenigen spezialisierten Laboratorien durchgeführt und konnten sich nicht in der täglichen Routinediagnostik etablieren. Hier sind die im Folgenden beschriebenen molekularbiologischen Methoden, allen voran die PCR, ein weitaus wichtigeres und gebräuchlicheres Mittel zur Diagnostik und Charakterisierung.

2.1.3.2.2 Antikörper-basierte Identifizierung von *P. multocida*

Für die Anwendung bei der klinischen Diagnostik einiger Pasteurellosen wurden kommerziell erhältliche ELISA-Systeme entwickelt. So wurde ein Sandwich-ELISA zum Nachweis des *P. multocida* Dermonekrotoxin (DNT) Ende der achtziger Jahre in Dänemark als Routinetest für die Diagnostik der progressiven atrophischen Rhinitis (PAR) eingesetzt (88). Auch für die Prävalenzbestimmung des Erregers in Nutz- und Wildgeflügel sowie die Kontrolle der Antikörperentwicklung nach Immunisierung von Geflügel kann die ELISA-Technologie eingesetzt werden (257).

Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten die Möglichkeiten des Einsatzes von ELISA-Systemen für die Identifizierung von *P. multocida* aus Nasentupfern klinisch gesunder Kaninchen oder den Nachweis spezifischer Antikörper bei klinisch inapparent infizierten Tieren (135, 153). Viele der Systeme wiesen jedoch durch kreuzreagierende Antigene Nachteile hinsichtlich ihrer Spezifität auf oder waren durch Serotypspezifität für den Feldeinsatz nur eingeschränkt geeignet (80).

Mittels Immunhistochemie konnte *P. multocida* bei an porcinem Dermatitis- und Nephropathie-Syndrom (PDNS) erkrankten Schweinen identifiziert werden, einer Erkrankung, deren Genese bis heute nicht geklärt ist. Verschiedene bakterielle und virale Erreger werden, ne-

ben unbelebten Faktoren wie Medikamenten, Chemikalien oder endogenen Antigenen, als Ursache der Immunkomplex-vermittelten Erkrankung diskutiert, darunter PCV2 (Porcines Circovirus 2), PRRS-Virus (Porcines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom-Virus) sowie *P. multocida* (286, 287). Durch Nutzung von Hühner-Anti-*P. multocida*- und Ziegen-Anti-Hühner-Antikörper als Primär- resp. Sekundärantikörper konnte Antigen von *P. multocida* in 26 von 30 untersuchten Nierengewebsproben nachgewiesen werden, in überwiegender Zahl vergesellschaftet mit dem immunhistochemischen Nachweis anderer bakterieller Pathogene, wie *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pyogenes*, *Haemophilus parasuis* oder *Arcanobacterium pyogenes* (287). Ob *P. multocida* hier als primär pathogen einzustufen ist, kann auch aufgrund fehlender Untersuchungen über das Vorkommen viraler Erreger im Krankheitsgeschehen nicht abschließend beantwortet werden. Der fast regelmäßig mögliche Nachweis des Bakteriums in Geweben wie den Epithelzellen der proximalen Nierentubuli erkrankter Tiere legt aber zumindest eine wichtige Rolle in der Pathogenese des PDNS nahe.

Für den Nachweis von *P. multocida*-Antigen in Geweben von experimentell mit hämorrhagischer Septikämie (HS)-spezifischen *P. multocida* infizierten Kälbern konnte ein Immunperoxidasetest genutzt werden (130). Ebenfalls als für den Nachweis von Antikörpern gegen *P. multocida* geeignet zeigte sich ein modifizierter Immunperoxidase-Assay, eingesetzt bei einem akuten Geschehen einer Pasteurellose bei Kaninchen (282).

2.1.3.3. Bestimmung der Kapseltypen bei *P. multocida*-Isolaten

Eine Form der Typisierung von *P. multocida*-Isolaten bildet die Bestimmung der Kapseltypen. Bisher bekannt sind die Kapseltypen A, B, D, E sowie F (29, 289). Für die Kapseltypen A und B konnten die kodierenden Gene in Form von Kapselbiosynthese-Loki dargestellt werden, die einem charakteristischen Aufbau in drei Regionen folgen (28, 52, 289) (Tab. 4). Während die Gene der Region 1 für Produkte kodieren, die im Transport der Kapselsubstanz an die Oberfläche eine Rolle spielen, sind die Proteine, die in Region 2 kodiert sind, am Aufbau des Kapselpolymers beteiligt und Region 3 kodiert für Produkte, welche die Phospholipid-Substitution der Polysaccharidkapsel ermöglichen (52). Mit der Sequenzanalyse der in den Kapselbiosynthese-Loki kodierten Gene konnten PCR-Protokolle (s. Kap. 2.1.3.4.2) entwickelt werden, die eine schnelle und sichere Zuordnung von Isolaten zu einem Kapseltyp ermöglichen und die Diagnostik von *P. multocida* erleichtern und beschleunigen.

Tab. 4 Übersicht über die bei *P. multocida* bekannten Kapseltypen mit Angabe etablierter PCR-Protokolle

Kapseltyp	Biologische Funktion, Wirkung	Aufbau des Kapselbiosyntheselokus	Primersequenz (F/P/RP)	Reaktionsbedingungen ^a	Nachgewiesenes Gen	Länge des Amplifikates (bp)	Referenz
A	<ul style="list-style-type: none"> Phagozytoseresistenz sowie Schutz vor Angriffen des Komplementsystems Schutz vor Austrocknung Adhäsion (unspezifisch) 	Aufbau beschrieben für <i>P. multocida</i> A:1 Region 1: A:1: <i>hexABCD</i> Region 2: A:1: <i>hyaABCDE</i> Region 3: A:1: <i>phyAB</i>	TGCCAAAATCGCAGTCAG/ TTGCCATCATTGTGTCAGTG		<i>hyaD/C</i>	1044	(52, 289)
B		Aufbau beschrieben für <i>P. multocida</i> B:2 Region 1: B:2: <i>cexABCD, lipA</i> Region 2: B:2: <i>bcbl/HGFEDCBA</i> Region 3: B:2: <i>lipB</i>	CATTTATCCAAGCTCCACC/ GCCCCGAGAGTTTCAATCC	94°C/30"; 55°C/30"; 72°C/1'	<i>bcblB</i>	760	(28, 289)
D		Aufbau der Region 2: IS-like remnant: <i>dcblBCEF</i>	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC/ CATCTACCCCACTCAACCATATCAG	25 Zyklen	<i>dcblF</i>	657	
E		Aufbau der Region 2: <i>ecblABEFGIJ</i>	TCCGCAGAAAATTATTGACTC/ GCTTGCTGCTTGATTTTGTG		<i>ecblJ</i>	511	(289)
F		Aufbau der Region 2: <i>fcblBCDE</i>	AATCGGAGAACGCAGAAAATCAG/ TTCCGCCGTCAAATTAATCTGTG		<i>fcblD</i>	851	
Heparosan-synthese II	<ul style="list-style-type: none"> Putative Vermittlung der Fähigkeit zur Veränderung der Kapselzusammensetzung Entgehen der Immunabwehr 	Das für die Heparosansynthese II kodierende Gen <i>hssB</i> liegt außerhalb des bekannten Kapselbiosynthese-Lokus, flankiert durch <i>alr</i> sowie <i>pgi</i>	ACAGGACAGTAAACATCCGC/ GTTGCTCATCATTGTCTCGAT	94°C/30" 55°C/30" 72°C/1'30"	<i>hssB</i>	1685	(70)

^a: allen angegebenen Thermocycler-Reaktionsbedingungen geht eine initiale Denaturierung bei 94°C/4' voraus. Nach Abschluss der 25 Zyklen folgt eine finale Extension bei 72°C/7'. Die Probe wird bis zum weiteren Bearbeiten bei 10°C gelagert.

2.1.3.4. Bandenbasierte Methoden zur Charakterisierung von *P. multocida*

In diesem sowie dem nächsten Kapitel (2.1.3.5.) sollen verschiedene molekularbiologische Methoden zur Charakterisierung von *P. multocida*, wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die DNS-DNS-Hybridisierung oder die erst 2010 für *P. multocida* entwickelte und veröffentlichte Multilokus Sequenztypisierung (MLST) dargestellt werden. Gerade die sequenzbasierten Methoden (s. Kap. 2.1.3.5.) erlauben eine sichere und reproduzierbare Unterscheidung der Isolate unterhalb von Subspezies- und Serotypebene und ermöglichen genaue phylogenetische Untersuchungen unabhängig vom durchführenden Labor sowie laborübergreifend einen einfachen Datenaustausch. Demgegenüber sind die bandenbasierten Methoden stark von Umgebungsfaktoren und der untersuchenden Person abhängig, was zu Problemen hinsichtlich der Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit innerhalb eines Labors und zwischen Laboratorien führt (294).

Nachfolgend werden die häufig zur Charakterisierung von *P. multocida*-Isolaten eingesetzten Methoden, bspw. Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Restriktionsendonuklease-Assay (REA) oder Ribotypisierung dargestellt. Im Gegensatz zu diesen konnten sich andere, wie die Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus- (ERIC)-PCR (263), die Repetitive Extragenic Palindromic- (REP)-PCR (263) oder Plasmidanalyse nicht für die Charakterisierung von *P. multocida* durchsetzen. Am Beispiel der Plasmidanalyse lassen sich mehrere Faktoren aufzählen, die eine Eignung dieser Technik für epidemiologische Studien in Frage stellen. So wurden in Studien stark schwankende Werte zur Verteilung von Plasmiden innerhalb der *P. multocida*-Population festgestellt, die von 5,9 % bis 54 % reichen (98, 251). Rúbies et al. (2001) konnten bei 37 % von insgesamt 218 porcinen *P. multocida* Plasmide nachweisen. Zwar konnten diese 37 % in sechs Plasmidprofile unterteilt werden, bei alleiniger Verwendung der Plasmidanalyse bestünde jedoch keine Möglichkeit zur Differenzierung der übrigen 63 % der Isolate.

Neben den etablierten Methoden wird auch die für *P. multocida* neue Multilokus Sequenztypisierung (MLST) dargestellt und erläutert, eine Methode, die für eine Vielzahl anderer bakterieller Spezies verwendet wird und eine schnelle und reproduzierbare Typisierung erlaubt.

2.1.3.4.1 Charakterisierung von *P. multocida* auf der Basis von äußeren Membran Protein-Profilen

Die Mobilität verschiedener Proteine der äußeren Membran im elektrophoretischen Feld bildet die Grundlage der makromolekularen Einteilung und Unterscheidung von *P. multocida*-Isolaten. Auf Basis der elektrophoretischen Mobilität des „major outer membrane“ Proteins OmpH konnten in einer Studie 34 mit PAR assoziierte Stämme in drei Muster eingeteilt und eine Assoziation zur im Meerschweincheninfektionstest ermittelten Pathogenität der Isolate

dargestellt werden (172). Durch die Charakterisierung des Proteins wurden unter verschiedenen Stämmen der einzelnen Kapseltypen unterschiedliche Muster gefunden (296). Die kombinierte Betrachtung der elektrophoretischen Mobilität des OmpH und des hitzemodifizierbaren Proteins OmpA wies eine geringe Variabilität der an der porcinen Pneumonie und PAR beteiligten *P. multocida*-Stämme nach (62). Auch bovine Isolate zeichneten sich durch eine geringe Heterogenität in ihren OMP-Profilen aus, während eine Korrelation zwischen OMP-Typ und Krankheitsstatus oder geographischer Herkunft nicht gefunden werden konnte (64). Im Gegensatz zu den porcinen und bovinen Isolaten scheinen *P. multocida* aviären Ursprungs eine höhere Diversität aufzuweisen. Die hohe Variabilität kann auf einen eher opportunistischen Charakter des Erregers mit geringer Virulenz der einzelnen Stämme hindeuten. Die Variationen des bakteriellen OMP-Profiles erlauben eine Charakterisierung, die in ihrer Genauigkeit und diskriminatorischen Aussagekraft der häufig allein durchgeführten Kapseltypisierung überlegen ist.

2.1.3.4.2 Identifizierung und Charakterisierung von *P. multocida* mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Der Einsatz der PCR bei der Identifizierung und weiterführenden Charakterisierung von *P. multocida* und anderen Organismen lebt von der Beschreibung und Sequenzanalyse sowohl von an das core-Genom als auch das akzessorische Genom assoziierten Genen und Sequenzen, die das gezielte Generieren von Primern zur Identifizierung und Charakterisierung der Bakterienisolate durch Sequenzamplifikation ermöglichen (75, 85, 215, 289).

***P. multocida*-spezifische PCR-Protokolle**

Für die speziesspezifische Identifizierung von *P. multocida* wurden bislang zwei Gensequenzen beschrieben, die die Anwendung der PCR zur Speziesdiagnostik ermöglichen (149, 291).

Die Beschreibung eines *P. multocida*-OMP mit signifikanter Ähnlichkeit zum P6-Protein von *H. influenzae* und die Untersuchung auf ein 430 bp umfassendes Segment des kodierenden Gens *psl* führte zum Nachweis dieses Genfragmentes in allen untersuchten *P. multocida* Referenzstämmen der 16 Serotypen nach Heddleston sowie den Impfstämmen CU und M9. Die starke Ähnlichkeit zum kodierenden Gen von P6 führt jedoch zu Verlusten in der Spezifität dieses Protokolls, so dass auch bei *H. influenzae*, welche ebenfalls aus Geweben des Respirationstraktes isoliert werden können, ein positives Ergebnis zu erwarten ist (149). Unsicherheiten sind in diesem Zusammenhang auch durch die bislang fehlende Testung des PCR-Protokolls bei anderen bakteriellen Spezies gegeben.

In einer weiteren Studie konnten auf der Grundlage der subtraktiven DNS-DNS-Hybridisierung zweier *P. multocida*-Genome zwei weitere spezifische Sequenzen identifiziert

werden (291). Zum einen konnte unter Verwendung der Primer KTSP61 und KTT72 ein Fragment von 590 bp amplifiziert werden, das sich bei weiterer Überprüfung als spezifisch für die mit hämorrhagischer Septikämie assoziierten *P. multocida* erwies, die im somatischen System nach Carter und Heddleston als Typen B:2; B:5 sowie B:2,5 bezeichnet werden. Des Weiteren wurde unter Verwendung der Primer KMT1SP6 und KMT1T7 ein speziesspezifisches Fragment bei allen *P. multocida*-Isolaten sowie bei *P. canis* Biotyp 2, nicht jedoch den übrigen Vertretern der *Pasteurellaceae* oder anderen Familien, nachgewiesen. Diese unspezifischen Reaktionen wurden 2004 mit dem Vorschlag zur Reklassifizierung von *P. canis* Biovar 2 und *P. avium* Biovar 2 als Vertreter von *P. multocida* relativiert (45). Eine endgültige Entscheidung zur Reklassifikation der Biovare steht zum jetzigen Zeitpunkt noch aus.

Die beschriebene PCR zum Nachweis von *kmt1* wurde international von vielen Autoren übernommen (17, 63, 85, 146) und stellt eine hochsensitive Möglichkeit zur Identifizierung von *P. multocida* dar, die auch als schnelle und stabile Screening-Untersuchung einsetzbar ist.

Eine PCR zum speziesspezifischen Nachweis von *P. multocida* auf der Grundlage der 23S rRNA konnte 144 *P. multocida*-Isolate, darunter Vertreter der drei Subspezies, 18 Referenzstämme, 87 aviäre sowie 36 porcine Feldstämme, identifizieren (190). Die Amplifikation eines entsprechenden Fragments bei Stämmen der *P. canis* und *P. avium* Biovare 2 weist auch in diesem Protokoll auf die enge Verwandtschaft zwischen diesen Biovaren und *P. multocida* hin, während bei anderen Vertretern der *Pasteurellaceae* spp. sowie *Bordetella* spp., *E. coli* und *Staphylococcus* spp. kein Fragment amplifiziert wurde. Bemerkenswert sind die bei ca. 20 % der aviären *P. multocida*-Stämme von der erwarteten 1.432 bp Fragmentgröße abweichenden Amplifikate. Sowohl Einzelfragmente einer leicht erhöhten Größe sowie reproduzierbare Doppelbanden waren bei diesen Stämmen nachweisbar. Die Autoren führen diese Abweichungen in ihrer Hypothese auf das Vorhandensein von Intron (intervening region)-Sequenzen innerhalb des 23S rRNA-Operons zurück. Obgleich diese Methode eine sichere Diagnostik von *P. multocida*-Isolaten ermöglicht, konnte sie bislang das von Townsend et al. (1998) etablierte Protokoll nicht verdrängen.

Die Beschreibung weiterer PCR-Protokolle zur spezifischen Identifizierung von *P. multocida*, basierend auf putativ transkriptionalen Regulatorsequenzen (*Pm0762*, *Pm1231*), wurde 2004 veröffentlicht (168), konnte sich jedoch ebenfalls nicht gegen das bereits etablierte Protokoll zum Nachweis des *kmt1* durchsetzen.

Auch ein speziesspezifisches 5'-Taq Nukleaseassay für die Diagnostik von *P. multocida* unter Verwendung der 16S rRNA-Sequenz wurde entwickelt (54). Dieses mit der Detektion von Fluoreszenz arbeitende PCR-Verfahren ist der herkömmlichen PCR hinsichtlich ihrer Nachweisempfindlichkeit überlegen, stellt aber höhere Anforderungen an die Ausrüstung des Labors.

PCR-basierter Nachweis virulenzassoziierter Gene

Bisher konnten bei *P. multocida* virulenzassoziierte Gene kodierend für Produkte unterschiedlicher Funktionsbereiche identifiziert werden. Beispielhaft seien Proteine der äußeren Membran, Kapselpolysaccharide, Adhäsine, Toxine und Strukturen mit Funktion in der Eisenakquirierung genannt.

Die Sequenzanalyse und Charakterisierung der Kapselbiosynthese-Loki A:1 und B:2 sowie Nukleotidsequenzanalysen der Region 2 der Biosyntheseloki der übrigen drei bekannten Kapseltypen D, E sowie F bildeten die Grundlage für die Entwicklung einer Kapseltyp-Multiplex-PCR (289). Die Kombination kompatibler Primerpaare für den Nachweis spezifischer Sequenzen aus allen fünf Kapseltypen in einem Reaktionsansatz ermöglicht eine schnelle Charakterisierung von *P. multocida*-Isolaten hinsichtlich ihres Kapseltyps (63, 85, 141, 289).

Neben den beschriebenen Kapseltypen konnte ein zusätzliches, der Heparosansynthase ähnliches Enzym bei Stämmen der Kapseltypen A, D sowie F identifiziert werden. Lokalisiert zwischen den für die Alanin Racemase (*alr*) sowie die Glucose-6-Phosphat Isomerase (*pgi*) kodierenden Genen, wird das kodierende Gen *hssB* außerhalb des bekannten Kapselbiosynthese-Lokus gefunden und bei 55 – 100 % der untersuchten *P. multocida* der Kapseltypen A, D sowie F per PCR nachgewiesen (70). Das Vorkommen einer zusätzlichen Kapselsubstanz gibt dem Bakterium die Möglichkeit, die Zusammensetzung seiner Kapsel zu verändern und somit durch Veränderung der exprimierten antigenen Strukturen der Wirtsimmunabwehr zu entgehen.

Eine Übersicht über die bekannten Kapseltypen, die biologischen Funktionen sowie der verwendeten PCR-Bedingungen findet sich in Tab. 4.

Im Anschluss an die Sequenzanalyse des vollständigen Genoms des aviären *P. multocida*-Stammes Pm70 (Acc.-Nr.: NC_002663) wurden weitere, für putativ virulenzassoziierte Faktoren kodierende Gene identifiziert und PCR-Protokolle generiert. Die Auswahl an verfügbaren Primern umfasst für äußere Membranproteine, fimbrienassoziierte und nicht fimbrienassoziierte Adhäsine, Neuraminidasen, Superoxiddismutasen sowie in der Eisenakquirierung involvierte Proteine kodierende Gene (Tab. 5) (85).

Die für die OMPs kodierenden Gene *ompH* und *oma87* zum Beispiel können zur Charakterisierung von *P. multocida*-Isolaten herangezogen werden. Die Gene konnten als in der gesamten *P. multocida*-Population weit verbreitet nachgewiesen werden (85). Dies gilt auch für die für die Neuraminidasen kodierenden Gene *nanB* und *nanH*, das für eine Typ4-Fimbrie kodierende Gen *ptfA* sowie die für Eisenakquirierungssysteme kodierenden Gene *exbB/tonB* und *hgbA* (75, 85). Hingegen konnte das für das Transferrin bindende Protein kodierende

tbpA bislang hauptsächlich bei *P. multocida*-Isolaten nachgewiesen werden, die aus Probenmaterial von Wiederkäuern angezüchtet wurden (85, 215). TbpA kann nachweislich ruminantes Transferrin binden, jedoch nicht das Transferrin anderer Spezies (214, 215), scheint also den Stämmen einen Selektionsvorteil im Wiederkäuerorganismus zu vermitteln.

Das bei der Pathogenese der porcinen PAR wichtige Dermonekrotoxin (DNT) wird nach Identifizierung und Sequenzanalyse des kodierenden Gens *toxA* durch eine Reihe unterschiedlicher PCR-Protokolle nachgewiesen (32, 160, 206, 223). Weitgehend durchgesetzt hat sich der Nachweis eines 846 bp umfassenden Fragments nach Lichtensteiger et al. (1996) (167). Zum Direktnachweis des DNT aus Nasentupferproben, welcher aufgrund der häufig geringen Anzahl an *P. multocida* zu falsch negativen Ergebnissen bei einzelnen Carriertieren führen kann, wurde außerdem ein nested-PCR-Protokoll entwickelt (43). Durch die Nutzung der nested-PCR berechneten die Autoren eine Absenkung der Nachweisgrenze von 2.1×10^4 auf ca. 20 Organismen.

Für den simultanen Nachweis der beim Schwein in der Pathogenese der PAR häufig gemeinsam vorkommenden Pathogene *B. bronchiseptica* und *P. multocida* wurde zudem eine Multiplex-PCR etabliert, die neben der *P. multocida*-spezifischen Sequenz *kmt1* sowie einem *toxA*-Fragment auch das *B. bronchiseptica* *alcA*, ein Alcaligin-Synthese-Gen, sowie eine Region stromaufwärts des Flagellings *flaA* amplifiziert (233). Durch den Einsatz dieser PCR können in einem Protokoll die beiden wichtigen bakteriellen Pathogene nachgewiesen werden.

Tab. 5 Überblick über bekannte, putativ virulenzassoziierte Gene von *P. multocida* mit Angabe etablierter PCR-Protokolle

Virulenzassoziiertes Faktor	Biologische Funktion, Wirkung	Primersequenz (FP/RP)	Reaktionsbedingungen (25 Zyklen)	Nachgewiesenes Gen	Länge des Amplifikates (bp)	Referenz
Äußere Membranproteine OmpH	– Porine	CGCGTATGAAGGTTTAGGT / TTTAGATTGTGCGTAGTCAAC	94°C/30"	<i>ompH</i>	438	(85)
	– Rezeptorfunktion		57°C/30"			
	– Adhäsion (unspezifisch)		72°C/30"			
	– Beeinflussung der Chemotaxis neutrophiler Granulozyten		94°C/30"			
Oma87	– Immunmodulation	TGACTTGCGCAGTTGCATAAC	55°C/30"	<i>oma87</i>	949	(85)
P6-like	–	TCTGGATCCATGAAAAAATAACTA- AAGTA/ AAGGATCCTTAGTATGCTAA- CACAGGACGACG	72°C/1'	<i>psl</i>	439	(148)
	–		94°C/30"			
Fimbrienassoz. Adhäsion Typ-4-Fimbrie	–	TGTTGAAATTCAGCATTTTAGTGTGTC/ TCATGAAATTCATTATGCGCAA- AATCCTGCTGG	94°C/30"	<i>ptf</i>	500	(75)
	–		55°C/30"			
	–		72°C/1'			
Nicht-fimbrienassoz. Adhäsion PfhA	–	AGCTGATCAAGTGGTGAAC/ TGGTACATTGGTGAATGCTG	94°C/30"	<i>pfhA</i>	275	(85)
	–		56°C/30"			
Neuraminidasen NanB	–	GTCCTATAAAGTGACGCCGA/ ACAGCAAAGGAAGACTGTCC	94°C/30"	<i>nanB</i>	585	(85)
	–		72°C/45"			
	–		72°C/30"			
NanH	–	GAATATTTGGCGGCAACA/ TTCTCGCCCTGTCACT	94°C/30"	<i>nanH</i>	361	(85)
	–		56°C/30"			
Superoxid-Dismutase SodA	–	TACCAGAAATTAGGCTACGC/ GAAACGGTTGCTGCCCGCT	94°C/30"	<i>sodA</i>	361	(85)
	–		55°C/30"			
	–		72°C/45"			
SodC	–	AGTTAGTAGCGGGTTGGCA/ TGGTGCTGGGTGATCATCATG	94°C/30"	<i>codC</i>	235	(158)
	–		55°C/30"			
			72°C/30"			

Virulenzassoziiertes Faktor	Biologische Funktion, Wirkung	Primersequenz (FP/RP)	Reaktionsbedingungen (25 Zyklen)	Nachgewiesenes Gen	Länge des Amplifikates (bp)	Referenz					
Dermonekrototoxin ToxA	<ul style="list-style-type: none"> - Beeinflussung der Osteoklasten und Osteoblasten - Mitogene Aktivität - Rearrangierung des Zytoskeletts - Letal für Nagetiere und Vögel 	CTTAGATGAGCGACAAGGTT/ GGAATGCCACACCTCTATA	94°C/30" 55°C/30" 72°C/1'	toxA	848	(167)					
Eisenakquirierungssysteme	<ul style="list-style-type: none"> - Spezifische Hämoglobinbindung, Internalisierung von Eisen (HgbA, HgbB) - Eisenrezeptor, Bindung von wirtseigenem Transferrin (TbpA) - Bereitstellung der Energie für den Eisentransport über die Zellmembran (TonB) 	TGGCGGATAGTCATCAAG/ CCAAAGAACCCTACTACCCA	94°C/30" 53°C/30" 72°C/30"	hgbA	420	(85)					
							ACCGCGTTGGAATTATGATTG/ CATTGAGTACGGCTTGACAT	94°C/30" 54°C/30" 72°C/45	hgbB	789	(85)
ExbB-ExbD – TonB-Lokus	<ul style="list-style-type: none"> - Beeinflussung der Osteoklasten und Osteoblasten - Mitogene Aktivität - Rearrangierung des Zytoskeletts - Letal für Nagetiere und Vögel 	GGTGTGATATTGATGCGGC/ GCATCATGCGTGACCGGTT	94°C/30" 55°C/30" 72°C/1:30"	exbB- exbD- tonB	1144	(85)					

Die Tabelle beschränkt sich in der Auflistung auf Faktoren, deren genetische Grundlage bekannt und beschrieben ist. Typ-1- sowie Curli-Fimbrien und die Siderophore Multicidin wurden daher nicht in die Tabelle aufgenommen.

2.1.3.4.3 Restriktionsendonukleasen-Analyse (REA)

Die Restriktion des Gesamtgenoms eines Bakteriums erfolgt unter Verwendung von Restriktionsendonukleasen, welche eine definierte Basensequenz im Genom erkennen und den DNS-Doppelstrang an der entsprechenden Stelle schneiden. In einer sich anschließenden Gelelektrophorese werden die entstandenen DNS-Fragmente ihrer Größe nach im elektrischen Feld aufgetrennt und nachfolgend unter UV-Licht sichtbar gemacht (8).

Verschiedene Restriktionsendonukleasen wurden auf ihre Eignung zur Analyse von *P. multocida* hin untersucht. Während nur einzelne oder wenige Studien unter Verwendung von Enzymen wie *BglII*, *EcoRI*, *PstI*, *SmaI*, *SmaI/SalI* und *XhoI* durchgeführt wurden (49, 151, 269), ist der Einsatz von *HhaI* und *HpaII* aufgrund der höheren Aussagekraft und der besseren Auswertbarkeit der Ergebnisse in der Literatur weit verbreitet (26, 81, 222, 242, 264). So konnten bei Verwendung von *EcoRI* die untersuchten *P. multocida*-Isolate aus klinisch unauffälligen Kaninchen in einer Studie von El Tayeb et al. (2004) nicht differenziert werden, während mit *HindIII* sieben und mit *HpaII* 12 unterscheidbare Muster unter den Isolaten erkannt wurden (81). An diesem Beispiel wird deutlich, dass bei der Auswahl geeigneter Enzyme immer ein Kompromiss eingegangen wird zwischen der Verwendung von Enzymen, die das Genom selten schneiden und somit evtl. unterschiedliche Isolate als identisch angesprochen werden und Enzymen, die das Genom sehr häufig schneiden, wodurch nahe verwandte Isolate evtl. nicht als solche erkannt werden und z. B. die Gefahr besteht, Infektketten zu übersehen. Die bei der REA entstehenden Bandenmuster und deren diskriminatorische Aussagekraft sind in erster Linie von der spezifischen Erkennungssequenz der genutzten Endonuklease und der Zusammensetzung des zu untersuchenden Genoms abhängig. Bei der REA entstehen neben großen, deutlich voneinander getrennten DNS-Banden immer auch viele kleinere, sich in der Agarosegelelektrophorese nicht klar auftrennende Banden. Das Verhältnis aus dem auswertbaren und nicht auswertbaren Bereich ist von den oben genannten Faktoren abhängig. Ein möglichst gutes Verhältnis zugunsten der klar separierten, größeren Banden zum nicht in die Auswertung eingehenden Bereich der kleineren Fragmente ist Voraussetzung für die Aussagekraft des genutzten Enzyms (242, 264). Die Auswertung der REA und anderer bandenbasierten Methoden ist zudem subjektiv und stark von der Erfahrung des Untersuchers abhängig.

Vergleichende Studien an *P. multocida* verschiedener Wirtstierspezies unter Verwendung von *HhaI* und *HpaII* zeigten in Übereinstimmung, dass die Restriktion mit dem zuletzt genannten Enzym eine feinere Unterscheidung der Stämme zulässt (48, 81, 242, 264). So konnte beispielsweise *HpaII*, nicht aber *HhaI*, den Ausbruchsstamm eines Geflügelcholera-geschehens in Wildvögeln von nahe verwandten Isolaten aus Geflügelhaltungen differenzieren (48). Auch sind die Banden, die nach dem Restriktionsverdau mit *HpaII* entstehen, als größer und damit besser unterscheidbar beschrieben und verbessern die Möglichkeit einer

objektiven Auswertung der Ergebnisse. So konnte in einer Studie der Bereich von 4 – 24 kb des Verdaus mit *Hpa*II ausgewertet werden, hingegen war der auswertbare Bereich (2,5 – 10 kb) nach *Hha*I-Verdau kleiner (264).

2.1.3.4.4 Ribotypisierung

Aufbauend auf die unter 2.1.3.4.3 beschriebene REA-Technik wird zur genotypischen Charakterisierung von *P. multocida* auch die Methodik der Ribotypisierung eingesetzt, für welche die in der REA der Größe nach aufgetrennten DNS-Fragmente mit Hilfe des Southern Blot Verfahrens auf eine positiv geladene Nylonmembran verbracht werden (8, 195). Durch den Einsatz einer spezifischen, Digoxigenin-markierten DNS-Sonde werden im Anschluss nur solche Fragmente des zu untersuchenden Genoms markiert und sichtbar gemacht, die der Sonde homologe Sequenzen enthalten und an die diese Sonde spezifisch hybridisieren kann. Während in der REA die mehreren hundert generierten Banden die Auswertung erschweren, wird die in der Ribotypisierung dargestellte Bandenmenge deutlich reduziert und die Auswertung erleichtert (17). Trotzdem ist auch bei dieser Methodik die Auswertung des sich ergebenden Bildes stark von der auswertenden Person abhängig.

Die Anwendungsbereiche der Ribotypisierung fanden sich in der Vergangenheit im Bereich von Langzeituntersuchungen resp. globalen Betrachtungen bakterieller Populationen. Weite Verbreitung bei der Charakterisierung von *P. multocida* hat die Ribotypisierung von mit *Hpa*II verdauter, elektrophoretisch aufgetrennter DNS in Verbindung mit einer gegen das kodierende Gen der 16S-23S rRNA oder 16S rRNA gerichteten Sonde (17, 48, 141).

Auf diese Weise konnten 107 Isolate unterschiedlicher Wirtstierspezies und geographischer Herkunft in 15 Ribotypen unterteilt werden, die ein gehäuftes Auftreten von bestimmten Ribotypen bei den einzelnen Wirtstierspezies erkennen ließen (141). Auch bei einer Untersuchung von vier Ausbrüchen porciner Pasteurellose konnte mittels Ribotypisierung unter Verwendung einer 16S rRNA-Sonde gezeigt werden, dass *P. multocida*-Isolate aus einem Ausbruch von pneumonischer Pasteurellose mit denen eines Ausbruches von systemischer Pasteurellose identisch waren (16). Dies war nicht nur ein deutlicher Hinweis auf einen epidemiologischen Zusammenhang zwischen zwei Beständen, sondern ebenso darauf, dass, in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen und dem immunologischen Status des Wirtstieres, ein *P. multocida*-Isolat unterschiedliche Krankheitsbilder hervorrufen kann.

2.1.3.4.5 Pulsfeld-Gelelektrophorese

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) wird bei vielen Bakterien als „Goldstandard“ für epidemiologische Kurzzeitstudien, die Untersuchung von lokalen Ausbrüchen oder die Darstellung von Infektionsketten angesehen (12, 110). Unter Verwendung der selten schneidenden Restriktionsendonukleasen *Apal* oder *SmaI* wird diese Technik auch zur Charakterisierung von *P. multocida* zur Anwendung gebracht (110, 165, 184). Durch die Verwendung selten schneidender Endonukleasen wird bei dieser Methodik das Genom in wenige große Fragmente, häufig der Größe 10 bis 800 kb, geschnitten und im „pulsierenden“ (wechselnden) elektrischen Feld aufgetrennt (17). In vergleichenden Untersuchungen an *P. multocida*-Isolaten wurden die durch PFGE erzielten Ergebnisse mit denen der weniger zeit- und kostenintensiven Methoden Repetitive extragenic palindromic- (REP)-PCR und Enterobacterial repetitive intergenic consensus- (ERIC)-PCR verglichen (110, 165). Gerade die REP-PCR zeigte in einer Studie eine durchaus konsistente Übereinstimmung der identifizierten Subgruppen aviärer *P. multocida* mit denen, die durch die PFGE erkannt wurden. Die Autoren betrachten diese Methode daher als adäquaten Ersatz für die PFGE bei fehlender entsprechender Laborausstattung oder fehlender Untersuchungszeit (17, 110). Beiden Methoden ist jedoch, wie den unter 2.1.3.4.3 und 2.1.3.4.4 genannten, eine mangelnde Standardisierbarkeit der Ergebnisse von Labor zu Labor, aber auch innerhalb eines Labors bei Untersuchungen über längere Zeiträume, sowie die Problematik des Datentransfers gemeinsam.

2.1.3.4.6 Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)

Eine weitere für die Charakterisierung von *P. multocida* genutzte Genotypisierungsmethode stellt die RAPD-Analyse (randomly amplified polymorphic DNA) dar. Mit kurzen, mehrfach im Genom bindenden Primern werden hier zufällig DNS-Abschnitte amplifiziert. Die in der nachfolgenden Elektrophorese der Größe nach aufgetrennten Fragmente erlauben nach visueller oder computergestützter Analyse der spezifischen Bandenmuster eine epidemiologische Aussage (4). Neben den geringen Anforderungen an Laborausstattung bietet die Möglichkeit, ohne vorangehende Informationen zur Genomsequenz Primer zu generieren, einen Vorteil. Die Untersuchung von 21 mit PAR assoziierten *P. multocida* konnte diese Stämme unter Verwendung eines ready-to-go RAPD Analysis Kit in drei RAPD-Cluster sowie in Subcluster unterteilen (79). Den geringen Kosten und Anforderungen an die Laborausstattung stehen einige wichtige Kritikpunkte gegenüber. So ist die Methodik stark von den zu Grunde liegenden Bedingungen abhängig, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse, innerhalb eines und zwischen unterschiedlichen Laboratorien, fast unmöglich macht.

2.1.3.4.7 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Diese Methode beinhaltet den DNS-Verdau unter Verwendung einer oder zweier Restriktionsendonukleasen. Nach Ligation von Adapteroligonukleotiden kann das entstandene Produkt als Template in der sich anschließenden PCR eingesetzt werden, welche mit verschiedenen selektiven oder nicht selektiven Primerkombinationen durchgeführt werden kann. In zwei resp. einer Studie an aviären bzw. porcinen *P. multocida*-Isolaten wurde eine hohe diskriminatorische Kraft der Technik nachgewiesen (133, 194, 264). So konnten 97 porcine Isolate in 18 Profile unterteilt und 72 aviäre, mit Krankheit assoziierte *P. multocida* 32 Profilen zugeordnet werden (194, 264), was eine höhere Diversität der aviären *P. multocida* im Vergleich zu den porcinen Isolaten vermuten lässt. Wie die RAPD kann auch die AFLP ohne genaue Kenntnisse der DNS-Sequenz durchgeführt werden. Die Anzahl der generierten Banden kann jedoch, im Vergleich zur RAPD, durch Verlängerung der genutzten Primer variiert werden. Auch bei dieser Technik sind die mangelnde Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse als Nachteile der Methode anzusehen.

2.1.3.5. Sequenzanalysen-basierte Methoden zur Charakterisierung von *P. multocida*-Isolaten

2.1.3.5.1 MLST

Seit der Entwicklung der Multilokus Sequenztypisierung (MLST) für *N. meningitidis* 1998 steht eine standardisierte und reproduzierbare nukleotidsequenzbasierte Methode zur Charakterisierung von Mikroorganismen zur Verfügung (180). Aufgebaut auf dem Prinzip der Multilokus Enzym Elektrophorese (MLEE), welche die Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität wasserlöslicher Housekeeping-Enzyme zur Typisierung bakterieller Isolate nutzt, werden bei der MLST DNS-Sequenzvariationen durch Mutation oder Rekombination im genetischen Code von Housekeeping-Genen als Grundlage zur Bewertung des phylogenetischen Hintergrunds der Stämme genutzt (90). Die Verlagerung des Fokus von der Bewertung der elektrophoretischen Mobilität der Proteine auf die genetische Ebene ermöglicht das Vergleichen von Ergebnissen verschiedener Laboratorien und somit globale Studien. Housekeeping-Gene sind bei allen Stämmen einer Spezies vorhanden und unterliegen keinem hohen Selektionsdruck, bieten aber ausreichend Variabilität, um eine Unterscheidung verschiedener Allele zu ermöglichen (179). Nach Sequenzanalyse der Housekeeping-Genfragmente wird der Kombination der generierten Allele ein Sequenztyp zugeordnet. Derzeit sind für mehr als 70 verschiedene Bakterienspezies webbasierte MLST-Sequenzdatenbanken etabliert (www.pubmlst.org/databases.shtml; Stand: November 2010), die den Abgleich der generierten Allele mit den bisher bekannten ermöglicht.

Die erste Erwähnung eines MLST-Schemas für *P. multocida* findet sich in der Literatur von 2004 (64). Die Autoren der Studie untersuchten 153 bovine Isolate sowie Isolate aviären, ovinen und porcinen Ursprungs hinsichtlich der Sequenzen der sieben Housekeeping-Gene *adk*, *aroA*, *deoD*, *gdhA*, *g6pd*, *mdh* und *pgi* und konstruierten einen Baum, der die Summe aller Astlängen minimiert (minimum evolution tree) (64). Parallel wurden die Isolate auch hinsichtlich ihrer OMP-Profile untersucht. Während die im OMP-Profil übereinstimmenden Stämme jeweils einem MLSA (Multilokus Sequenzanalyse)-Typ zuzuordnen waren, waren in einem MLSA-Typ jedoch mehrere OMP-Profile zu finden, was dieser Methode eine höhere diskriminatorische Kraft zuspricht (64). Die das Schema zur Verfügung stellende Website (http://pubmlst.org/pmultocida_multihost/) umfasst zurzeit 125 überwiegend aus Großbritannien stammende Isolate.

Ein zweites Schema unter Verwendung der Gene *adk*, *est*, *gdh*, *mdh*, *pgi*, *pmi* sowie *zwf* wurde anhand von 63 *P. multocida* sieben verschiedener Geflügelcholera-Ausbrüche sowie drei Referenzstämmen entwickelt und Anfang des Jahres 2010 in einer Internet-Datenbank (http://pubmlst.org/pmultocida_rirdc/) veröffentlicht, die bislang 193 *P. multocida* aus Australien und verschiedenen europäischen Ländern umfasst (279). Bei der Untersuchung von 21 umfassend charakterisierten Stämmen aus sieben Geflügelcholera-Ausbrüchen zeigte sich die starke Fähigkeit des Schemas, verwandte Isolate als solche zu erkennen. Mit Hilfe der MLST konnten die Stämme der Ausbrüche I und V demselben ST zugeordnet werden. Diese Aussage konnte durch die Ergebnisse weiterer Untersuchungen, wie REA, Ribotypisierung und PFGE, untermauert werden (279). Zum jetzigen Zeitpunkt stehen für beide Schemata noch keine umfassenden Untersuchungen großer Isolatanzahlen zur Verfügung, so dass eine endgültige Bewertung nicht möglich ist, jedoch überwiegt die aktive Nutzung des Schemas und der Datenbank von Subaaharan et al. (2010) durch internationale Arbeitsgruppen.

2.1.4. *Pasteurella multocida* als Krankheitserreger

Weltweit sind bei einer Vielzahl von Wirtstierspezies, wie Wiederkäuern, Kaninchen, Schweinen, Geflügel und Karnivoren, Infektionen des Respirationstraktes, septikämische Erkrankungen, sowie die Ausbildung von Abszessen als Folge von Wundinfektionen mit *P. multocida* bekannt und beschrieben (4, 18, 26, 61, 85). Auch beim Menschen sind Infektionen mit *P. multocida*, überwiegend nach Bissen oder Kratzern von Katzen oder Hunden, von Bedeutung (127, 301). In Mitteleuropa stellen die respiratorischen Pasteurellosen die häufigste Gruppe der auftretenden Erkrankungen, während die septikämischen Erkrankungen eher sporadisch auftreten.

Allgemein werden durch *P. multocida* verursachte Erkrankungen in primäre und sekundäre Pasteurellosen unterteilt. *P. multocida* gilt in der Pathogenese der primären Pasteurellosen

als gesichertes verursachendes Agens, ohne dass zusätzliche Infektionen für die klinische Ausprägung der Erkrankung nötig sind (236, 298). Sekundäre Pasteurellosen, häufig in Form respiratorischer Erkrankungen, sind hingegen in ihrer klinischen Ausprägung von multiplen prädisponierenden Faktoren, wie vorangegangenen Infektionen, herabgesetzter Immunität oder Hygiene- und Managementmängeln abhängig. Eine eindeutige Zuordnung der einzelnen Erkrankungen zu den primären resp. sekundären Krankheitsformen ist jedoch nicht immer möglich. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die durch *P. multocida* ausgelösten Erkrankungen bei verschiedenen Wirtstierspezies. Auf die porcinen respiratorischen Pasteurellosen wird im Anschluss ausführlicher eingegangen.

Tab. 6 *P. multocida* als Krankheitserreger bei unterschiedlichen Wirtstierspezies

Wirt	Erkrankung	häufig beteiligte Kapseltypen (Serotypen)	Besonderheiten	Referenz
Geflügel	Geflügelcholera	A (A:1, A:3, A:4); F; {D, B, n.t.}	(per-)akute und chronische Verlaufsformen; hohe Morbidität und Mortalität	(23, 61, 222, 235)
Rinder, Büffel	hämorrhagische Septikämie	B, E	(per-)akute Verlaufsformen; hohe Morbidität und Mortalität; Status von "arrested carrier" möglich; vornehmlich in Ländern Afrikas und Asiens, selten in westlichen Ländern; Beteiligung an HS-ähnlichen Krankheitsbild bei Kamelen diskutiert	(66, 117, 124)
Kaninchen	respiratorische Erkrankung (Rhinitis bzw. Pneumonie)	A; {D, F, n.t.}	akute und chronische Verlaufsformen; Zuordnung zu den primären oder sekundären Pasteurellosen wird nicht einheitlich gehandhabt	(81, 141)
Kleine und große Wiederkäuer	Pneumonie	A, D, {F, n.t.}	häufig im Gefolge weiterer bakterieller oder viraler respiratorischer Infektionen sowie unter schlechten Haltungs-, und Managementbedingungen	(57, 85, 113, 211)
Hund, Katze	Wundinfektion, respiratorische Erkrankung	A, D; {F, n.t.}	subkutane Abszesse durch Bissverletzungen von Artgenossen sind häufige Hauterkrankungen bei Katzen	(9, 85, 97)
Mensch	Wundinfektion nach Bissen oder Kratzern; Komplikationen möglich	Keine Angaben	Hauptinfektionsquelle: Biss- oder Kratzverletzungen durch Hund oder Katze; bei Immunsuppression Komplikationen möglich, z. B. Osteomyelitis, Arthritis, Tenosynovitis, Endocarditis, Hirnabszesse	(9, 76, 106)
Schwein	Rhinitis atrophicans	D, A	pathogenetisch wichtiger Virulenzfaktor: <i>P. multocida</i> Dermonekrotoxin; häufig nach Infektion mit <i>B. bronchiseptica</i>	(62, 67, 220)
	Pneumonie	A, D, {F, n.t.}	häufig vergesellschaftet mit weiteren bakteriellen oder viralen Erregern	(16, 143)
	PDNS	Keine Angaben	Bedeutung des Mikroorganismus bei der Pathogenese nicht geklärt	(287)

{ }: seltener isolierte Kapseltypen; n.t.: nicht typisierbar

2.1.4.1. Pasteurellosen der Schweine

2.1.4.1.1 Progressive atrophische Rhinitis (PAR)

Vertreter der *P. multocida*-Serogruppen A und D, vor allem letztere häufig mit der Fähigkeit zur Bildung des Dermonekrotoxins ausgestattet (DNT; s. auch Kap. 2.1.5.2.6), sind nachweislich an der Pathogenese der bis Februar 2011 in Deutschland meldepflichtigen Progressiven Atrophischen Rhinitis (PAR) der Schweine beteiligt, einer fortschreitenden, chronisch-entzündlichen Erkrankung des Atmungstraktes, in deren Verlauf es durch die Wirkung des DNT zu Störungen im Knochenauf- und -umbau sowie zu Deformierungen im Oberkieferknochenbereich kommt (62, 67).

Charakteristisch für die klinische PAR ist das im betroffenen Bestand gehäufte Auftreten einer in ihrer Ausprägung variablen Verkürzung und Verformung des Oberkiefers durch die Atrophie des Nasenmuschelgewebes (255). Neben der asymmetrischen Verformung des Oberkiefers sind für die klinische Diagnose Nasen- und Augenausfluss sowie charakteristische Schnüffelgeräusche relevant (255). Grundlage für die genannten anatomischen Veränderungen sind die Effekte des intrazellulär wirksamen DNT auf die Wirtstierzellen. So werden die Osteoblasten in ihrer Funktion gehemmt, während die Osteoklasten keine Beeinflussung erfahren. Dies resultiert in einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Knochenauf- und -abbau und den genannten sichtbaren Veränderungen des Gesichtsschädels (196). Die Erkrankung führt selten zu Todesfällen, jedoch aufgrund der verminderten Futteraufnahme und resultierenden verminderten Wachstumsraten sowie durch den Behandlungs- und Medikamentenaufwand zu erheblichen ökonomischen Verlusten (87, 115, 295).

Neben der PAR kann durch eine Infektion mit *B. bronchiseptica* eine milde, nicht progressive Form der Rhinitis Atrophicans (RA) ausgelöst werden. *B. bronchiseptica* prädisponiert die Tiere außerdem für eine nachfolgende Kolonisation durch *P. multocida*, welche die Nasenhöhle ohne vorangegangene Gewebsschädigung nur schlecht besiedeln können (39, 78, 111, 255). Erst die Kombination beider Erreger führt zu einer schweren Atrophie der Nasenmuscheln und zur progressiven Erkrankungsform (239).

Experimentell konnte die PAR sowohl durch Infektion mit toxigenen *P. multocida*-Isolaten (220) als auch durch Inokulation des aufgereinigten bakteriellen Toxins DNT reproduziert werden, wodurch die Bedeutung des DNT als Pathogenitätsfaktor nachgewiesen wurde (72). Neben ELISA-Systemen, die für den Toxinnachweis zur Verfügung stehen (25), bestätigt der molekularbiologische Nachweis eines Fragmentes des DNT per PCR heute zeitnah den klinischen Verdacht der PAR.

Eine Untersuchung aus Kanada zeigte, dass Stämme der Serogruppen A und D sowohl aus Nasentupfern von Tieren aus Farmen mit klinischer PAR als auch in Beständen ohne klinische Symptomatik isoliert werden können, wobei DNT-positive *P. multocida* nur in Betrieben

mit klinischer PAR nachgewiesen werden konnten (159). Die Studie gibt leider keine Auskunft über das Vorhandensein und die Verteilung von DNT-produzierenden Stämmen bei erkrankten und nicht erkrankten Tieren, da sich die Darstellung der Ergebnisse nur auf die Bestandsebene beschränkt.

2.1.4.1.2 *Pasteurella*-Pneumonie der Schweine

Neben der PAR hat *P. multocida* auch Bedeutung bei der Ausprägung einer weiteren respiratorischen Erkrankung, der *Pasteurella*-Pneumonie der Schweine (7).

Diese äußert sich klinisch durch die typischen Erscheinungen einer Atemwegserkrankung; mit Fieber, Abgeschlagenheit, erschwelter Atmung, Husten, Inappetenz, schlechter Futterverwertung und verminderter Lebendgewichtszunahme sowie vermehrten Organverwürfen am Schlachthof (40). Wie auch bei den Wiederkäuern sind neben *P. multocida* verschiedene andere bakterielle und virale Infektionserreger, wie *Mycoplasma* spp. (enzootische Pneumonie) oder Porcine Circoviren an der Pathogenese dieser Erkrankung beteiligt. Weitere, häufig im porcinen Respirationstrakt mit *P. multocida* vergesellschaftete bakterielle Erreger sind *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *A. suis*, sowie *B. bronchiseptica* (16, 143).

Die überwiegend den Kapseltypen A und D, in geringerem Maße auch F zugehörigen, mit porciner Pneumonie assoziierten Stämme können zur Diagnostik und weiterführenden Charakterisierung aus Tracheal- oder Lungengewebe erkrankter Tiere isoliert werden (7, 85). Im Vergleich der Nachweishäufigkeiten verschiedener bakterieller Pathogene aus bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) resp. Gewebeproben stellte sich die BALF bei allen untersuchten respiratorischen Pathogenen, darunter *P. multocida*, *A. pleuropneumoniae* und *B. bronchiseptica*, als mindestens geringgradig überlegen gegenüber der Isolierung aus Gewebe dar (193).

Verschiedene Veröffentlichungen sprechen heute von *P. multocida* als einem der wichtigsten Sekundärerreger im porcinen Atmungstrakt (16, 39). Abweichend von dieser schon lange bestehenden Einteilung als Sekundärerreger wird ebenfalls die Möglichkeit diskutiert, dass eine geringe Anzahl an *P. multocida*-Stämmen mit vergleichsweise hoher Virulenz als Primärerreger bei der porcinen Pneumonie anzusehen ist (62). Die Autoren charakterisierten 158 porcine *P. multocida*-Isolate, vornehmlich assoziiert mit Pneumonie (n = 125) oder PAR (n = 17) mittels Kapseltypbestimmung, PCR-basiertem Nachweis des für das DNT kodierenden Gens *tox A* sowie der Bestimmung des Molekulargewichts der oberflächenassoziierten Proteine OmpH und OmpA. Bei den mit Pneumonie assoziierten Isolaten handelte es sich zu 88 % um nicht toxinbildende *P. multocida* des Kapseltyps A mit einem der OMP-Profile 1.1, 1.2, 3.1 oder 5.1 resp. des Kapseltyps D mit dem OMP-Profil 6.1. Hingegen waren 76 % der mit PAR assoziierten Isolate toxinbildende *P. multocida* des Kapseltyps D mit dem OMP-

Profil 4.1 oder Isolate des OMP-Profiles 6.1, die entweder den Kapseltyp A oder D zuzuordnen waren. Somit könnten tatsächlich nur bestimmte Subpopulationen mit den Erkrankungen assoziiert zu sein, jedoch fehlen vergleichende Daten von Isolaten aus klinisch gesunden Tieren.

Ein Vergleich des (REA)-Profils von 12 *P. multocida*-Isolaten aus PAR-Geschehen mit 10 Stämmen aus sporadischen Pneumonie-Ausbrüchen nach Verdau mit *CfoI* demonstrierte ebenfalls eine vergleichsweise starke Homogenität unter den PAR verursachenden Isolaten. Die Autoren konnten bei keinem der mit Pneumonie assoziierten Stämme *toxA* nachweisen, was die Theorie zulässt, dass dieses Gen in der Pathogenese der porcinen Pneumonie keine Rolle spielt und zudem im Habitat „unterer Respirationstrakt“ offensichtlich keinen selektiven Vorteil bietet (71).

Experimentell konnten charakteristische pathologische Veränderungen der pneumonischen Pasteurellose bei fünf Wochen alten SPF-Tieren durch intrabronchiäre Inokulation mit einer Kombination aus dem Zytotoxin Apx von *A. pleuropneumoniae* und einem *P. multocida*-Stamm des Kapseltyps A (4×10^9 KbE) erzielt werden. Im Gegensatz dazu führte die alleinige Inokulation des Zytotoxins resp. von *P. multocida* nur zu geringen Organveränderungen ohne erfolgreiche Reisolierung von *P. multocida* (53). Während hier also der Einfluss prädisponierender Faktoren für die Ausbildung einer Pneumonie erforderlich scheint, konnte in einer weiteren Studie durch die alleinige intratracheale Infektion von Schweinen mit einer Infektionsdosis von 10^{10} KbE eines *P. multocida* Kapseltyp A-Stammes das Krankheitsbild der Pneumonie ausgelöst und die pathologischen Anzeichen einer schweren Bronchopneumonie bei der Sektion sieben Tage post infectionem nachgewiesen werden (112). Die Ergebnisse der genannten Studien lassen, neben dem lange beschriebenen Einfluss von Co-Infektionen und Haltungsbedingungen, auf eine Abhängigkeit der Pathogenese von der Virulenz des jeweils verwendeten Stammes schließen. Die Zuordnung der porcinen pneumonischen Pasteurellose zu den primären oder sekundären Pasteurellosen ist somit bisher in der Literatur nicht abschließend geklärt.

2.1.5. Virulenzassoziierte Faktoren und deren Bedeutung bei der Impfstofforschung

Bis heute ist die durch Vakzinierung erreichbare Schutzwirkung gegen *P. multocida*-bedingte Erkrankungen des Respirationstraktes bei Schweinen und anderen Tierarten nicht zufriedenstellend. In Studien konnten mit Totvakzinen oder mit *in vitro* hergestellten Antigenen keine protektiven Effekte gegen eine heterologe Belastung erzielt werden (1, 103). Hingegen führt eine natürliche Infektion zu einer serotypübergreifenden Immunität und auch die experimen-

telle Vakzinierung verschiedener Tierarten mit Antigenen *in vivo* angezüchteter Stämme oder attenuierten Lebendimpfstoffen konnte diese vermitteln (50, 243, 246, 299).

Ein großer Vorteil von Lebendvakzinen besteht in der Möglichkeit der oralen Verabreichung über das Trinkwasser. Dies stellt insbesondere in der Geflügelhaltung eine erhebliche Erleichterung gegenüber der arbeitsaufwändigen parenteralen Einzeltierimpfung dar. Dem gegenüber steht durch die meist unbekanntere Grundlage der Attenuierung älterer *P. multocida*-Lebendvakzinen die Möglichkeit der Reversion zum virulenten Phänotyp und somit die Gefahr eines Krankheitsausbruches. Dieses Risiko ist ein Grund dafür, dass es zum jetzigen Zeitpunkt in Deutschland keine zugelassenen Lebendvakzinen gegen *P. multocida* gibt. In den letzten Jahren werden Lebendvakzinen mit genetisch definierten, attenuierten *P. multocida*-Stämmen getestet und versprechen einen sichereren und wirksameren Impfstoff. Die Zahl an genetisch definierten Mutanten ist bei *P. multocida* aufgrund der nicht ganz einfachen genetischen Manipulierbarkeit jedoch noch sehr gering.

Allgemein werden die Schwierigkeiten bei der Herstellung wirksamer Vakzinen neben der serologischen Vielfalt des Pathogens durch seine Beteiligung an infektiösen Faktorenkrankheiten verursacht. Für eine erfolgreiche Bekämpfung solcher Erkrankungskomplexe sind stets über therapeutische und prophylaktische Maßnahmen hinaus vor allem Veränderungen im Haltungsmanagement nötig, was die konsequente Mitarbeit der Tierhalter voraussetzt.

Für die effektive Ausbildung einer Immunität nach Vakzinierung sind neben der Auswahl eines geeigneten Impfstammes auch die Umgebungs- und Haltungsfaktoren sowie verschiedene Mechanismen des Immunsystems zu beachten. So kommt zusätzlich zur angeborenen Abwehr und der Ausbildung einer systemischen Immunreaktion auch der erworbenen lokalen Immunität im Respirationstrakt eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Atemwegserkrankungen zu. Die Ausprägung einer Schleimhautimmunität ist nach systemischer Vakzinierung in erheblichem Maße von der Art und Dosis des Antigens und des verwendeten Adjuvants sowie von der Applikationsstelle abhängig (198). Neben der serologischen Immunantwort entscheidet außerdem auch die spezifische zelluläre Abwehr über den Ausgang einer *P. multocida*-Infektion. Die Beteiligung der zellvermittelten Immunität konnte anhand der Veränderungen der Lymphozytenpools sowie der Makrophagenpopulation und der Beteiligung von T-Zellen an der Aktivierung von neutrophilen Blutzellen und stationären Makrophagen während natürlicher und experimenteller Infektion mit *P. multocida* nachgewiesen werden (155, 198).

Im Folgenden soll neben der kurzen Darstellung der wichtigsten bekannten, virulenzassoziierten Faktoren ein Überblick über den bisherigen Stand der Immunitäts- und Impfstoffforschung bei *P. multocida* gegeben werden. Zudem wird in Tab. 7 ein Überblick über die aktuell in Deutschland verfügbaren Impfstoffe zur Prophylaxe von Pasteurellosen dargestellt. Die

meisten der bislang bei *P. multocida* identifizierten virulenzassoziierten Gene (VAG) kodieren für Produkte mit Funktionen in den Bereichen Kolonisierung und Adhäsion, Eisenakquirierung oder Anti-Wirtsabwehr. Lange bekannt ist zudem das in der Pathogenese der porcinen PAR wichtige Dermonekrotoxin. Durch die im Jahre 2001 veröffentlichte Genomsequenz eines aviären *P. multocida* Kapseltyp A-Isolates wurden im 2.257.487 bp umfassenden Gesamtgenom weitere putative VAG gefunden (188), deren Charakterisierung als logischer Schritt für ein verbessertes Verständnis von Pathogenese, Bekämpfung und Prophylaxe von *P. multocida*-Infektionen folgen muss.

Tab. 7 Darstellung der in Deutschland zugelassenen Impfstoffe und Sera gegen Pasteurellosen bei Haustieren

Handelsname	Zulassung für	Inhaber der Zulassung	Impfantigen	leb./inakt.	Darreichungsform
Poulvac Pabac IV	Pasteurellose bei Huhn, Ente, Pute	Fort Dodge, Würselen, Dtld	<i>P. multocida</i> Serotypen 1, 3, 4 und 3x4	inakt.	Emulsion
Nobilis FC inac	Pasteurellose bei Huhn, Pute, Gans, Ente	Intervet, Unterschleißheim, Dtld	<i>P. multocida</i> Serotypen 1, 3, 4, 5	inakt.	ölige Emulsion
Cunivak PAST	Ansteckender Kaninchenschnupfen/ Pasteurellose bei Kaninchen	IDT Biologika, Dessau-Rosslau, Dtld	<i>P. multocida</i> Typ A, Typ D Toxoid, <i>B. bronchiseptica</i>	inakt.	wässrige Suspension
Porcilis AR-T	Rhinitis atrophicans beim Schwein	Intervet, Unterschleißheim, Dtld	<i>B. bronchiseptica</i> <i>P. multocida</i> TypD-Toxoid	inakt.	Emulsion
Porcilis AR-T DF	Rhinitis atrophicans beim Schwein	Intervet, Unterschleißheim, Dtld	<i>B. bronchiseptica</i> <i>P. multocida</i> -Protein d0	inakt.	wässrige Suspension
Porcilis Atrinord	Rhinitis atrophicans beim Schwein	Intervet, Unterschleißheim, Dtld	<i>P. multocida</i> -Toxinfragment	inakt.	wässrige Suspension
Respiporc ART+EP	Rhinitis atrophicans und Enzootische Pneumonie beim Schwein	IDT Biologika, Dessau-Rosslau, Dtld	<i>P. multocida</i> Typ A <i>P. multocida</i> Typ D-Toxoid <i>B. bronchiseptica</i>	inakt.	wässrige Suspension

Informationen sind der Tierärztlichen Umschau TU spezial „Impfstoffe und Sera“ entnommen (Ausgabe 8/2010, 1. August 2010)

2.1.5.1. Ganzzellvakzinen (Totimpfstoffe; attenuierte Lebendimpfstoffe)

Bei der experimentellen aerogenen Immunisierung von Schweinen mit hitzeinaktivierten *P. multocida* des Kapseltyps A (P880 Jena) und einer zugehörigen lebenden, temperatursensitiven Mutante konnte eine signifikante Beeinflussung der lokalen Immunantwort anhand des Anstiegs des Antikörpertiters in der Lunge gemessen werden, wobei die Verwendung der Mutante einen signifikant höheren Anstieg des IgA-Titers induzierte. Bei subkutaner Vakzinierung konnte hingegen zwar eine systemische, jedoch keine lokale Immunantwort beobachtet werden.

bachtet werden (198). Die in der gleichen Studie getestete Stimulation der Lungenclearance konnte nach systemischer und aerogener Immunisierung nachgewiesen werden, eine Verminderung pneumonischer Veränderungen war jedoch nur nach aerogener Vakzinierung erkennbar. Die Abhängigkeit der systemischen Immunantwort auf Aerosolimmunisierung von Typ und Dosis des Antigens sowie der Applikationsart ist bekannt. So konnte bspw. bei der aerogenen Immunisierung von Schweinen mit *Actinobacillus* spp.-Antigenen ein systemischer Anstieg von IgG und IgM beobachtet werden (123).

Die immunogene Wirkung einer molekulargenetisch hergestellten, kapseldefizienten Mutante des Serotyp A-Stammes X-73 wurde experimentell im Mäuse- sowie im Hühnersuch getestet (50, 51). Konnte die hitzeinaktivierte Mutante nicht zur Ausbildung einer protektiven Immunität führen, so schützten die lebenden Zellen bei intramuskulärer Vakzinierung sowohl Mäuse als auch Hühner vor homologer Belastung sowie Belastung mit dem Serotyp A:3, nicht jedoch A:4 (50).

Die Vakzinierung mit formalininaktivierten *P. multocida* konnte Puten im Experiment gegen eine homologe Belastung immunisieren, die Tiere waren jedoch nicht gegen eine Belastung mit anderen Serotypen geschützt. Unterschiede in der Immunreaktion auf lebende resp. inaktivierte Erreger zeigten sich in der folgenden, zweiten Belastung der überlebenden vakzinierten und nicht vakzinierten Tiere, da die Tiere nun sowohl gegen Belastung mit homologen als auch anderen Serotypen geschützt waren (119). Somit scheinen die Kreuzprotektivität vermittelnden Antigene nur oder nur in effizientem Maßstab unter *in vivo*-Bedingungen exprimiert zu werden.

Im direkten Vergleich einer inaktivierten kommerziellen Geflügelcholera-Vakzine, bestehend aus *P. multocida* der Serotypen A:1, A:3 und A:4, und einer trivalenten, formalininaktivierten Vakzine aus lokal isolierten virulenten *P. multocida*-Stämmen der genannten Serotypen, konnte kein signifikanter Unterschied der Antikörpertiter oder der Schutzwirkung festgestellt werden, jedoch war die Schutzwirkung der nicht-kommerziellen, formalininaktivierten Vakzine leicht erhöht. Das in der gleichen Studie beschriebene, durch Vermehrung in embryonierten Hühnereiern hergestellte, formalininaktivierte Bakterin (*P. multocida* A:1) konnte ebenfalls vergleichbare, gute Immunität gegen homologe Belastung und Infektion mit Stämmen der Serotypen A:1, A:3 und A:4 erzielen (183). Aufgrund der geringen Ausbeute von sechs Impfdosen pro embryoniertem Hühnerei ist die Herstellung großer Mengen Impfantigen unter Zuhilfenahme embryonierter Hühnereier derzeit kommerziell nicht praktikabel.

Nach intratrachealer Belastungsinfektion von mit einer attenuierten Lebendvakzine subkutan immunisierten Kälbern konnte im Gegensatz zu ungeimpften Tieren eine Verminderung der pathologisch-anatomischen Veränderungen sowie des Einstroms neutrophiler Zellen in die bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) festgestellt werden, was auf die Ausbildung einer lokalen Immunantwort hinweist (187).

Die Ausbildung einer lokalen Immunantwort in Form eines Anstieges der CD2⁻ SWC1⁺ Lymphozyten und CD25⁺-Zellen, einer T-Zellaktivierung sowie einer Abnahme der Gesamtzahl Ig⁺-Zellen in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) konnte nach aerogener Immunisierung von Schweinen mit einer temperatursensitiven Mutante des Kapseltyps A beobachtet werden (155).

Ein weiterer Ansatz für die Entwicklung potenter und sicherer Vakzinen ist die Verwendung bakterieller Zellhüllen, frei von Bestandteilen des Cytoplasmas und DNS. Durch die Erhaltung der Oberflächenantigene kann die körpereigene Immunabwehr gezielt zur Bildung von Antikörpern angeregt werden (142). Solche Ghost-Vakzinen in Form von „leeren“ *P. multocida*- sowie *M. haemolytica*-Zellen konnten bei Kaninchen Antikörper induzieren, die auch die jeweilig andere Bakterienspezies erkannten und somit Hoffnung auf die Vermittlung heterologer Immunität ohne den vergleichsweise riskanteren Einsatz attenuierter Lebendvakzinen schürt (182). Dosisabhängig konnten Mäuse in einem zweiten Teilversuch durch die *P. multocida* Ghost-Vakzinen auch gegen eine homologe Infektion geschützt werden.

2.1.5.2. Immunogene Wirkung einzelner *P. multocida*-Antigene

Bakterielle Oberflächenproteine stellen durch den Kontakt zum Wirtsgewebe bei vielen Pathogenen wichtige Reize für die Aktivierung des Immunsystems dar und werden bei der Prophylaxe verschiedener Infektionskrankheiten erfolgreich zur Vermittlung einer protektiven Immunität eingesetzt (231). Oberflächenantigene, die serotypübergreifend bei *P. multocida* nachgewiesen werden können, stellen daher besonders interessante Ziele für die Entwicklung neuer Impfstoffe dar. Gleichzeitig unterliegen diese exponierten Strukturen häufig einem hohen Selektionsdruck, was die Ausbildung einer effektiven, über Jahre hinweg wirksamen und Serotyp- bzw. Stamm-übergreifenden Immunität durch einen Impfstoff erschwert.

Begründet in der wirtschaftlichen Bedeutung der Geflügelcholera hat die Forschung zur Identifizierung von Antigenen, welche Schutz gegen die am häufigsten aus dem Geschehen isolierten Serotypen A:1, A:3 und A:4 vermitteln, hohes Gewicht. Verschiedene, hauptsächlich oberflächenassoziierte Antigene konnten im Tierversuch eine gewisse serotypübergreifende Schutzwirkung erzielen (50, 186, 241).

2.1.5.2.1 Adhäsionsfaktoren

Fimbrienassoziierte Adhäsine

Viele der bei *P. multocida* bekannten Adhäsionsfaktoren ähneln in ihrem Aufbau und ihrer genetischen Grundlage denen anderer mikrobieller Spezies. So wurden in einer elektronenmikroskopischen Studie mindestens zwei unterschiedliche Fimbrien, die morphologisch den Typ1- und den „Curli“-Fimbrien von *E. coli* entsprechen, beschrieben (137).

Typ1-Fimbrien werden von vielen pathogenen und einigen nicht pathogenen Vertretern der *Enterobacteriaceae* produziert und vermitteln die Adhärenz an Erythrozyten zahlreicher Tierarten, an Hefezellen und weitere Zelltypen. Für „Curli“-Fimbrien wird allgemein angenommen, dass sie über die Bindung an extrazelluläres Fibronectin Adhärenz vermitteln; für porcine *P. multocida* konnte jedoch weder eine Agglutination von Erythrozyten noch ein Haften an immobilisierten Mukus des porcinen Respirationstraktes nachgewiesen werden (137).

Weiterhin wurde bei *P. multocida* eine ca. 18 kDa schwere fimbrienähnliche Struktur (PtfA) identifiziert, deren Aminosäuresequenz eine starke Ähnlichkeit zu denen der Proteinuntereinheiten von Typ4-Fimbrien aufwies (254). Typ4-Fimbrien sind bei verschiedenen pathogenen Bakterienspezies nachweislich an der Adhärenz an das Wirtszellgewebe beteiligt (91). Antiseren gegen *P. multocida* PtfA zeigten deutliche Kreuzreaktivität gegen rekombinantes *Moraxella bovis* β -Pilin sowie die native *Dichelobacter nodosus* Fimbrienuntereinheit, jedoch nur schwache Reaktionen mit Gonokokken-Fimbrien (254). Ein gegen das gelöste fimbriale Protein eines *P. multocida* B:2-Stammes gerichtetes Hyperimmunserum zeigte sich im Western Blot reaktiv gegenüber dem Typ4-Fimbrienprotein eines *P. multocida* A:1- sowie eines *P. aeruginosa*-Isolats. Die Autoren beschrieben durch einen Sequenzvergleich der zwei *P. multocida*-PtfA einen N-terminalen, stark konservierten Bereich, der für die immunogene Wirkung verantwortlich zu sein scheint (266). Um diese These zu untermauern, sollte ein Nachweis dieses als konserviert beschriebenen Bereiches bei weiteren *P. multocida*-Isolaten unter Berücksichtigung des Kapseltyps nachgewiesen werden.

Die Expression der *P. multocida* Typ4-Fimbrien ist abhängig von den vorherrschenden atmosphärischen Bedingungen. Unter mikroaerophilen Bedingungen erhöhte sich sowohl die Anzahl fimbrientragender Zellen als auch die Anzahl an Fimbrien pro Bakterienzelle (254, 266), was *in vivo* zu einer verbesserten Besiedlung respiratorischer Schleimhäute mit vorherrschender erhöhter CO₂-Spannung führen kann.

Weitere, für Proteine mit Ähnlichkeiten zu Fimbrien- oder Fibrillen-bildenden Proteinen anderer bakterieller Spezies kodierende Gene konnten durch die Sequenzanalyse des *P. multocida* Gesamtgenoms identifiziert werden, darunter eine Genomregion mit signifikanter Ähnlichkeit zum Fpl Pilin Lokus bei *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, welches für einen Subtyp der Typ4-Fimbrien kodiert und hinsichtlich Funktion und Aufbau bei *P. multocida* weiter untersucht werden sollte (115, 188).

Ebenfalls vor kurzem identifiziert wurde das fibronectinbindende, 115 Aminosäuren (AS) umfassende Oberflächenprotein PM1665. Im Gegensatz zu den zahlreichen bekannten fibronectinbindenden Proteinen anderer pathogener Bakterien bindet dieses nicht an das N-terminale Ende, sondern an die zentrale zellbindende Region des Fibronectins, welche die RGD-Sequenz enthält, die die Bindung des Fibronectins an Integrine der Zelloberfläche er-

leichtert (197). Ob diese Bindungsstelle einen Vorteil gegenüber der N-terminalen Bindung hinsichtlich Adhäsion und/oder der Immunevasion bewirkt, ist bislang nicht untersucht.

Nicht fimbrienassoziierte Adhäsine

***Pasteurella* filamentöses Hämagglutinin (*pfhaB1*, *pfhaB2*)**

Mit Hilfe der Signature Tagged-Transposon-Mutagenese (STM) konnten die für das *Pasteurella* filamentöse Hämagglutinin (PfhA) kodierenden Gene *pfhaB1* und *pfhaB2* erstmalig nachgewiesen und als Virulenz-vermittelnd beschrieben werden. Die beiden Gensequenzen unterscheiden sich lediglich in einer zentralen Deletion von *pfhaB1*, wodurch die unterschiedliche Länge der Gene (7.845 vs. 11.757 bp) erklärt wird (188). Die Unterscheidung in diese beiden Gene wird in der Literatur nicht einheitlich gehandhabt, so dass im Weiteren die Bezeichnung *pfhaB* stellvertretend genutzt wird, sollten nicht zusätzliche Informationen zur Verfügung stehen.

Im Maus-Septikämiemodell konnte *in vivo* nachgewiesen werden, dass eine Inaktivierung der genannten Gene zu einer Attenuierung des Stammes führte (93). Im Zuge der Genomanalyse des Stammes Pm70 wurden die genannten Gene identifiziert und als signifikant ähnlich zu *fha* von *Bordetella pertussis*, kodierend für ein filamentöses Hämagglutinin (Fha), beschrieben (188). Fha wird neben dem *B. pertussis*-Toxin eine zentrale Rolle bei der Adhäsion von *B. pertussis* an Wirtszellen von Nasopharynx und Trachea zugeschrieben (152, 293). An der Wirksamkeit des Impfstoffes gegen den Keuchhusten beim Menschen ist Fha zu einem Gutteil mit verantwortlich (152, 154). Die Ähnlichkeit zu diesem wichtigen Impfantigen macht auch das PfhA im Hinblick auf die Entwicklung von Impfstoffen zu einem potentiellen Kandidaten und somit zu einem interessanten Forschungsgegenstand.

Neben der Ähnlichkeit zum bereits genannten Fha von *B. pertussis* wurden N-terminal und zentral gelegene Übereinstimmungen mit der AS-Sequenz von Proteinen bei *Haemophilus ducreyi* (LspA1 und LspA2), *N. meningitidis* (PspA) und *P. aeruginosa* (ORF PA2462; PA41) gefunden (31, 188, 278, 300). Weiterhin konnte eine Ähnlichkeit zu dem Serumresistenz-vermittelnden Protein P76 von *Histophilus somni* am C-terminalen Ende des PfhA gezeigt werden, aus der sich die putativen Funktionen des Proteins, namentlich die Vermittlung von Serumresistenz sowie die Vermittlung der Adhäsion, ableiten lassen (188).

Um diese Annahmen zu überprüfen, wurde im Puteninfectionsmodell eine *P. multocida* *pfhaB2*-Insertionsmutante im Vergleich zum entsprechenden A:3 Wildtypstamm (P-1059) untersucht. Die Mutante zeigte sich nach intranasaler Infektion als stark, nach intravenöser Gabe lediglich als leicht attenuiert, was die These der Adhäsionsvermittlung an das respiratorische Epithel unterstützt (285). Die Überlebensfähigkeit der Mutante in 90 % Putenserum war gegenüber dem Wildtyp unverändert. Die Empfindlichkeit gegenüber dem antikörperabhängigen Komplementweg wird somit durch Abwesenheit von *pfhaB2* nicht beeinflusst (285).

Die immunogene Wirkung dreier Fragmente des PfhA wurde im Putenversuch betrachtet. Die Tiere wurden zweimalig intramuskulär mit den gepoolten Peptiden immunisiert und im Anschluss intranasal mit dem Wildtypstamm belastet (283). Während alle Kontrolltiere nach der Infektion unter Symptomen der Geflügelcholera verstarben und *P. multocida* aus den Organen reisoliert werden konnte, überlebten 14 der 17 vakzinierten Tiere die Infektion ohne Ausbildung von klinischer Symptomatik und ohne nachweisbare bakterielle Organlast zum Zeitpunkt der Euthanasie (283). Die Ähnlichkeit zu *B. pertussis* Fha und dessen erfolgreicher Einsatz in azellulären Vakzinen gegen den Keuchhusten macht weitergehende Studien zur immunogenen Wirkung des PfhA mit dem Ziel der Entwicklung einer serotypübergreifend Immunität vermittelnden Vakzine mehr als erforderlich.

2.1.5.2.2 Kapseltypen

Die Funktion der Kapselpolysaccharide liegen in der Vermittlung unspezifischer Adhäsion während der frühen Phase der Infektion, der Vermittlung von Toleranz gegenüber äußeren Einflüssen wie Austrocknung sowie durch die Resistenz gegen komplementvermittelte Zellyse und Phagozytose einen Schutz gegen Wirtsabwehrmechanismen (28, 138, 247). Die Phagozytoseresistenz vermittelnde Wirkung der Kapsel konnte anhand von genetisch definierten kapsellosen *P. multocida*-Mutanten in Mäuse- und Hühnersuchen nachgewiesen werden (27, 51). Auch ist die Vermittlung von Invasivität durch bakterielle Kapseln, wie der K1-Kapsel von *E. coli*, welche chemisch dem Kapseltyp B von *N. meningitidis* entspricht, bekannt (247). Die Zusammensetzung aus Monosacchariden und verschiedenen Substituenten führt zu einer hohen Variabilität beim Aufbau bakterieller Kapseln, jedoch kommen chemisch identische Kapseln auch bei unterschiedlichen bakteriellen Spezies vor, wie am Beispiel von *E. coli* und *N. meningitidis* angeführt.

Bislang wurden für *P. multocida* fünf Kapseltypen (A, B, D – F) sowie nicht-typisierbare Isolate definiert. Letztere können entweder unkapselte Stämme, schwer typisierbare Kapseltyp A-Stämme oder neue Kapseltypen darstellen (34, 245). Die Zusammensetzung der Kapseltypen ist bislang für die Typen A (hauptsächlich Hyaluronsäure), D (Heparosan) und F (Chondroitin) aufgeklärt (68, 69). Die polymeren Strukturen der Kapseltypen B und E sind hingegen nicht hinreichend untersucht, jedoch ist eine Beteiligung von Arabinose, Mannose und Galaktose am Aufbau des Kapseltyps B nachgewiesen (29, 200). Die z. T. zu wirtseigenen Geweben identische Struktur der *P. multocida*-Kapseln erlaubt nur eine sehr geringe Antikörperantwort des Wirtes bei einer Infektion.

Die für die Synthese und den Transport des Kapselmaterials verantwortlichen Gene wurden bei *P. multocida* innerhalb eines Kapselbiosynthese-Lokus mit Ähnlichkeiten zu den Kapselbiosynthese-Loki von *H. influenzae* oder *E. coli* gefunden (50, 52, 247). Am Beispiel eines Kapseltyp A Stammes wurde der in drei Regionen unterteilte Genloкус untersucht. Die Pro-

dukte der Region 1 konnten als am Export, Produkte der Region 2 an der Biosynthese der Monomere und Produkte der Region 3 an der Phospholipidsubstitution und somit der Verankerung der Kapselsubstanz in der äußeren Zellmembran beteiligt nachgewiesen werden (52). Eine Studie zur Charakterisierung des Kapselbiosynthese-Lokus eines Kapseltyp B:2 Stammes beschreibt einen entsprechenden Aufbau (28). Bei vergleichenden Analysen der Positionen dieser Loci sowie der benachbarten Gensequenzen erwiesen sich diese als stark konserviert, wodurch die Möglichkeit des kompletten Austausches der Loci bei Rekombinationen dieser Regionen zu bedenken ist (28).

Während der Untersuchungen der für die Polymerisation der jeweiligen Kapselsubstanz zuständigen Enzyme konnten Hinweise auf das Vorkommen eines der Heparosansynthase ähnlichen Enzyms gefunden werden. Das kodierende Gen *hssB* wurde außerhalb des bekannten Kapselbiosynthese-Lokus nachgewiesen (70). Das Auftreten mehrerer Polysaccharidsynthasen kann, möglicherweise in Abhängigkeit von der Infektionsphase im Wirt, zur Veränderung der Kapselzusammensetzung und somit zur molekularen Mimikri und Umgehung der körpereigenen Wirtsabwehr beitragen (70).

Verschiedene Studien untersuchten die Wirkung der Kapselsubstanz auf das Adhäsionsvermögen und die Virulenz von *P. multocida*. Die Mehrzahl dieser Arbeiten konnte eine höhere Adhärenz und Virulenz bekapselter Stämme im Gegensatz zu kapsellosen Varianten, spontan oder durch enzymatische Entfernung der Kapsel, zeigen (29, 139, 228). In Abweichung davon detektierten Glorioso et al. (1982) nach Entfernung der Kapsel eine verbesserte Adhäsion an HeLa Zellen (104) und auch die Bindungskapazität an Mukus des porcinen Respirationstraktes und die *in vitro* Adhäsion an porcine Trachealringzellen war bei unbekapselten Varianten eines Kapseltyp D-Stammes erhöht, was auf eine partielle Maskierung von bakteriellen Adhäsinen durch das Kapselmaterial hinweisen kann (139).

Die Resistenz gegenüber dem Serumkomplementsystem und der komplementvermittelten Lyse ist ein weiterer wichtiger Faktor für das Überleben eines Erregers im Wirt. Für *P. multocida* konnte eine erhöhte Empfindlichkeit kapselloser Varianten gegen die bakterizide Wirkung des Komplementsystems mehrfach nachgewiesen werden (51, 114, 268). Hansen und Hirsh diskutieren in diesem Zusammenhang die Hypothesen, dass die zur Aktivierung des Komplementsystems nötigen bakteriellen Strukturen durch das Kapselmaterial maskiert sind oder der Membranangriffskomplex durch die Kapsel am Kontakt mit der bakteriellen Zellwand gehindert wird (114). Beide Möglichkeiten würden die höhere Resistenz bekapselter Stämme begründen, zur sicheren Klärung bedarf es aber weiterführender Untersuchungen, idealerweise unter Verwendung genetisch definierter akapsulärer Mutanten, um eine Reversion des Phänotyps und darin begründete Verfälschungen der Ergebnisse auszuschließen. So zeigte im Gegensatz zu den bisher dargelegten Ergebnissen das Wachstum einer durch Insertion einer Tetrazyklinresistenzkassette hergestellten kapsellosen Mutante

eines B:2 Stammes keine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber komplementvermittelter Wirtsabwehr beim Wachstum in bovinem Serum bei gleichzeitiger Abnahme der Virulenz im Mäuseversuch (27).

Da die Geflügelcholera häufig durch Stämme der Serotypen A:1, A:3 sowie A:4 verursacht wird, ist die Entwicklung einer serotypübergreifenden Schutz vermittelnden Vakzine das angestrebte Ziel verschiedener Arbeiten, jedoch sind bisher lediglich einzelne Teilerfolge zu verzeichnen. So konnte die hochdosierte Inokulation einer unbekapselten Mutante des Typstammes X-73 (A:1) in Hühnern eine protektive Immunität gegen homologe Belastung und Infektion mit *P. multocida* des Serotyps A:3, nicht jedoch A:4 vermitteln (50). Auch konnte sowohl unter Verwendung einer definierten kapseldefizienten Mutante des X-73 als auch beim Einsatz einer X-73 *aroA*-Mutante zwar homologe Protektion sowie Schutz gegen Infektion mit P-1059 (A:3), nicht jedoch gegen P-1662 (A:4) beobachtet werden (50, 128). Das rekombinante kapselassoziierte Protein rCP39 des Stammes P-1059 (A:3) konnte Hühner bei subkutaner Verabreichung wirksam gegen die Belastung mit dem Wildtypstamm schützen und serotypübergreifend Schutz gegen Belastung mit dem Serotyp A:1 (X-73) vermitteln (277). Die Effektivität gegen eine Infektion mit Stämmen des Serotyps A:4 wurde nicht getestet.

Weiterhin zeigten sich die mit dem Kaliumthiocyanat-Kapselextrakt formalininaktivierter *P. multocida* A:3-Stämme immunisierten Mäuse gegen die nachfolgende homologe Belastung geschützt. Darüber hinaus wurde im Vergleich zur nicht-immunisierten Kontrollgruppe der Erreger schneller aus dem Lungengewebe vakzinierter Tiere entfernt, so dass 72 - 96 Stunden post infectionem keine Bakterien mehr aus dem Organ anzüchtbar waren (267). Neben dem LPS, Fimbrien- und Oberflächenproteinen wird auch die Kapsel als mögliches Impfantigen angesehen (1). Direkte Untersuchungen dieser Antigene im Hinblick auf protektive Effekte sind in der Literatur bis heute jedoch kaum verfügbar (57). Unterschiedliche Antigene werden als potentiell Immunität vermittelnd für die Bekämpfung der bovinen Pasteurellose beschrieben. Obwohl die Immunantwort bei dieser Erkrankung noch nicht verstanden wird, scheinen hohe Serum-Antikörpertiter gegen Proteine der äußeren Membran eher für eine Immunität verantwortlich zu sein als Antikörper gegen andere Antigene (57).

2.1.5.2.3 Lipopolysaccharid (LPS)

In der Literatur finden sich Hinweise auf eine vom klassischen LPS-Aufbau, mit Lipid A, Core-Region und O-spezifischer Seitenkette abweichende Bauweise des *P. multocida* LPS. In einer elektrophoretischen Analyse 34 porciner *P. multocida*-Stämme zeigten diese hinsichtlich des Vorkommens klassischer O-Antigene ein inkonsistentes Verhalten (172). Untersuchungen an Vertretern aller 16 Serotypen nach Heddleston mittels Sodium-Dodecylsulfate-

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erbrachten keinen Hinweis auf das Vorhandensein O-spezifischer Seitenketten (240) und auch andere Autoren gehen von der Abwesenheit eines polymeren O-Antigens beim *P. multocida* LPS aus und zählen dieses zum rauen LPS-Typ (162, 274). Eine strukturelle Analyse der Kern-Oligosaccharide mehrerer *P. multocida*-Stämme zeigte eine konservierte innere und eine variable äußere Kernstruktur, die sich in unterschiedlichen Substituenten an den äußeren Galaktosidaseresten äußert (273, 274). Analysen des aufgereinigten LPS identifizierten Glukose, Galaktose, L-Glycero-D-Mannose-Heptose, N-Acetylglukosamin und N-Acetylgalaktosamin als am Aufbau beteiligt (274).

Das endotoxämische Potential des *P. multocida* Lipid A ist von verschiedenen Faktoren abhängig, wie der Wirtstierspezies und dem beteiligten *P. multocida*-Isolat. Die Inokulation von *P. multocida*-LPS in Hühnerembryonen und Mäusen ermittelten eine hohe Empfindlichkeit dieser Tiere gegen das Antigen, während von Puten eine hohe Resistenz bekannt ist (96, 189). Im Rindermodell konnten für die hämorrhagische Septikämie (HS) typische Symptome nach Inokulation von aufgereinigtem LPS eines *P. multocida* B:2-Stammes reproduziert werden, so dass eine entscheidende Rolle dieser Struktur bei der Pathogenese der Erkrankung anzunehmen ist (131).

Mittels STM konnte eine LPS-Mutante mit inaktivierter Heptosyltransferase erzeugt werden. Die Inaktivierung dieses Enzyms resultiert in einer stark verkürzten LPS-Struktur und einer Attenuierung sowohl im Maus- als auch im Hühnermodell. Aus dem Verhalten der Mutante im Tierversuch schloss die Arbeitsgruppe, dass unverändertes LPS eine Voraussetzung für die Replikation von *P. multocida in vivo* und die Auslösung einer Erkrankung ist (116). Obwohl der genaue Wirkungsmechanismus der LPS-Bestandteile bei *P. multocida* ungeklärt ist, wurde gezeigt, dass *P. multocida*-LPS auch die Adhäsion neutrophiler Granulozyten und die Transmigration durch Endothelzellen beeinflusst (95).

Verschiedene Studien berichten von einer eher geringen protektiven Wirkung des *P. multocida*-LPS und einer Abhängigkeit der immunogenen Wirkung von der Wirtstierspezies, dem verwendeten LPS-Typ oder der Inokulationsroute (115, 185, 246). Im vergleichenden Versuch wurden Mäuse mit Immuns Serum, aufgereinigten OMP- oder LPS-Antikörpern immunisiert. Bei der Sektion 48 h nach der folgenden Belastung konnte eine Reduktion der KbE um 3300, 201 resp. 1,1 festgestellt werden (171). Die protektive Wirkung der LPS-Antikörper war somit im Vergleich mit den OMP-Antikörpern als gering einzustufen (171).

Aufgrund einer festgestellten, signifikant erhöhten Antikörperreaktion und einer Verstärkung der Hypersensibilitätsreaktion auf BSA konnte die immunologische Aktivität der in Form von LPS resp. crude capsular antigen im Hühnerversuch getesteten Antigene, sowohl auf die humorale als auch die zelluläre Abwehr, gezeigt werden (186).

2.1.5.2.4 Äußere Membran Proteine (OMP)

Proteine der äußeren Membran erfüllen eine Reihe von Aufgaben im spezifischen und unspezifischen transmembranalen Molekültransport sowie in der Eisen- und Nährstoffaufnahme des Bakteriums (30). Der Kontakt zwischen den Proteinen und dem Wirt macht die bakteriellen Strukturen durch die Stimulation der Wirtsabwehr für die Vakzineforschung zu vielversprechenden Forschungsgegenständen.

Während OMPs *in vivo* gewachsener *P. multocida* serotypübergreifenden Schutz vermitteln, vermögen OMPs von *in vitro* vermehrten Isolaten nur Protektivität gegen eine homologe Belastung zu erzeugen (102, 119, 121). Die OM-Fractionen von unter Eisenmangelbedingungen angezüchteten *P. multocida* konnten nach aktiver Immunisierung von Mäusen diese vor einer Erkrankung durch nachfolgende homologe Belastung und Belastung mit weiteren Serotypen schützen, jedoch wurde beobachtet, dass diese Schutzwirkung mit steigender Infektionsdosis abnahm (253). Weitere Untersuchungen konnten die passiv protektive Wirkung äußerer Membranproteine im Mausmodell darstellen (218, 272).

Trotz der Vielzahl an OMPs sind im Vergleich zu den leichter zu isolierenden zytoplasmatischen Proteinen bislang nur wenige Membranproteine weitergehend charakterisiert (118).

Oma87

Ein 87 kDa großes Hauptprotein der äußeren Membran mit signifikanter Ähnlichkeit zum protektiven Oberflächenprotein D15 von *H. influenzae* konnte bei allen fünf Kapsel- und 16 Serotypen von *P. multocida* nachgewiesen werden (170, 252). Die weite Verbreitung in Kombination mit der Ähnlichkeit zu D15, dessen N-terminales Proteinfsegment protektive Epitope enthält, macht auch Oma87 als potentiellen Impfstoffbestandteil interessant (306). Die passive Immunisierung von Mäusen mit Antiseren gegen Oma87 konnte Schutz gegen eine homologe Belastung vermitteln, vermittelte jedoch keine Protektivität bei Infektion mit anderen Serotypen (1, 252). Auch ein das N-terminale Fragment des Oma87 enthaltende Fusionsprotein konnte keinen serotypübergreifenden Schutz vermitteln (191).

OmpH

Ein weiteres Protein, OmpH, konnte als oberflächenexponiert und immunogen identifiziert und der Superfamilie der nicht-spezifischen Porine zugeordnet werden (41, 173). Mit Hilfe der planaren Lipiddoppellayertechnik wurde eine Erhöhung der Membranpermeabilität und somit die Funktion des 37,5 kDa großen Proteins als Porin experimentell nachgewiesen (41, 174). Auch die Aminosäuresequenz des OmpH, mit hohem Glycin-, geringem Prolingehalt und dem Fehlen von Cystein, wird als typisch für unspezifische bakterielle Porine beschrieben (41). OmpH konnte in 15 von 15 untersuchten Serotypen nachgewiesen werden. Die AS-Sequenzen des Proteins verschiedener Isolate wiesen, mit Ausnahme zweier hypervariabler Regionen, starke Übereinstimmungen auf (174, 175). Ob diese hypervariablen Regio-

nen Epitope tragen, die zur Induktion serotypspezifisch protektiver Antikörper führen, ist bislang nicht abschließend untersucht. OmpH zählt damit nicht zu den hochgradig konservierten Proteinen und wird aufgrund der Heterogenität seines Molekulargewichtes auch zur Unterscheidung und Charakterisierung von *P. multocida*-Isolaten eingesetzt, wie in Kap. 2.1.3.4.1 beschrieben (62, 64).

Zur protektiven Wirksamkeit des rekombinanten Proteins finden sich unterschiedliche Informationen in der Literatur. So konnte das vollständige, rekombinante OmpH Mäuse effektiv gegen eine nachfolgende Belastung schützen und wird von den Autoren als vielversprechender Vakzinekandidat zur Prophylaxe von Pasteurellosen angesehen (161). SPF-Hühner hingegen waren nach Vakzinierung mit nativem, nicht aber mit rekombinantem OmpH gegen homologe Belastung geschützt (174). Daten zur serotypübergreifenden Schutzwirkung fehlen an dieser Stelle leider, jedoch konnte ein Folgeversuch zur genaueren Charakterisierung des Porins und dessen Sekundärstruktur einen der hypervariablen, extrazellulären Schleifenbereiche als immunogen im homologen Belastungsmodell beschreiben (175).

OmpA (Omp28)

Ein hitzemodifizierbares, 28 kDa großes Oberflächenprotein mit signifikanter N-terminaler AS-Sequenzhomologie zu Vertretern der OmpA-Proteinfamilie konnte durch SDS-PAGE identifiziert werden (100, 181). Vertreter der OmpA-Proteinfamilie bilden Rezeptoren für bestimmte Bakteriophagen, spielen eine Rolle im Rahmen der Ausbildung stabiler Aggregate bei der F-Pilus vermittelten Konjugation und tragen zur Stabilität der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien bei (60, 270). Die Immunisierung von CD-1 Mäusen mit aufgereinigtem Omp28 resultierte in der Ausprägung eines signifikant höheren Antikörpertiter im Vergleich zur Kontrollgruppe, es wurde jedoch keine protektive Immunität gegenüber homologer intraperitonealer Belastung ausgebildet (100). Im Gegensatz hierzu waren mit äußerer Membran, formalininaktivierten *P. multocida* oder kommerzieller Vakzine immunisierte Tiere signifikant vor der Belastung geschützt (100).

P6-like

Der Nachweis eines 16 kDa großen OMP gelang bei einem aus Kaninchen isolierten *P. multocida*-Isolat (149). Sowohl die N-terminale AS-Sequenz als auch das 453 bp umfassende kodierende Gen *psl* ließ Ähnlichkeiten zu P6 (*ompP6*) von *H. influenzae* erkennen (149). Die Amplifikation des bei allen *P. multocida* Serotypen vorkommenden Gens wurde von den Autoren als speziesspezifisches Diagnostikum vorgeschlagen, jedoch wird auch *ompP6* von *H. influenzae* amplifiziert, so dass die Spezifität dieses Protokolls sinkt (148).

Als OMP mit starker Ähnlichkeit zum im Tiermodell als protektiv beschriebenen P6 wurde aufgereinigtes, rekombinantes Psl im Putenversuch auf seine immunogene Wirkung getestet (150). Obwohl bei parenteraler Applikation des rekombinanten Proteins rPsl Antikörper gebildet wurden, waren die Tiere nicht gegen die Belastung mit einem virulenten *P. multocida*-

Stamm geschützt. Von den genannten Hypothesen zur Begründung des Ergebnisses, (I) rPsl induziert keine Psl-spezifischen Antikörper; (II) die Kapsel des virulenten Stammes verhindert die Bindung zwischen Antikörper und Epitop, oder (III) Psl ist, im Gegensatz zu P6, bei *P. multocida* nicht oberflächenassoziiert, geben die Autoren aufgrund der Ergebnisse durchgeführter Untersuchungen der Begründung den Vorrang, dass das Kapselmaterial den Zugang der Antikörper zum Protein verhindert (150).

2.1.5.2.5 Eisenakquirierungssysteme

Da freies Eisen aufgrund seiner Toxizität nur in sehr geringer Menge im Wirt vorliegt, müssen bakterielle Pathogene dieses für sie essentielle Element aus Eisenproteinverbindungen wie Transferrin, Lactoferrin oder Hämoglobin freisetzen, um es anschließend im eigenen Stoffwechsel nutzen zu können. Für die Eisenakquirierung sind zwei unterschiedliche Mechanismen beschrieben, wobei Mechanismus (I) den direkten Kontakt zwischen Bakterium und Eisenproteinkomplex benötigt und durch Reduktion zum Lösen des Eisens aus den Wirtsproteinen führt, während Mechanismus (II) über die Sezernierung bakterieller Proteine mit hoher Eisenaffinität, den so genannten Siderophoren, erfolgt (232).

Wie bei den meisten bakteriellen Pathogenen üblich, besitzt auch *P. multocida* mehrere in die Eisenakquirierung involvierte Proteine, sowohl in Form von Siderophoren als auch von Rezeptoren der äußeren Membran zur Bindung eisentragender Wirtsproteine (57). Eine signifikante Veränderung der Expression von 135 Genen unter eisenlimitierten Bedingungen konnte beobachtet werden, wobei in Abhängigkeit der Natur der Eisenquelle unterschiedliche Gene in ihrer Expression beeinflusst wurden (219). Untersuchungen des Proteinstroms der äußeren Membran von *P. multocida* ließen ebenfalls eine Vielzahl an eisenregulierten Proteinen (IROMPs) erkennen (42). Durch die Auswertung der Sequenzdaten des Gesamtgenoms konnte dargestellt werden, dass über 2,5 % des Genoms für in die Eisenaufnahme involvierte Produkte kodieren (188).

Siderophore

Der Nachweis eines Siderophors bei *P. multocida* mit von der klassischen Phenolat- oder Hydroxamat-Struktur abweichendem Aufbau konnte durch Wachstumsexperimente unter Eisenrestriktion erbracht werden (132). Die genaue Wirkungsweise des als Multocidin bezeichneten Siderophors, ebenso wie die Sequenz des kodierenden Gens, konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

TonB/ExbB/ExbD

Gram-negative Bakterien besitzen eine Reihe oberflächenassoziiierter Liganden zur Bindung von Eisen und Eisensiderophoren an die Zelloberfläche. Die anschließende Translokation der Moleküle in den periplasmatischen Raum ist ein energieabhängiger Prozess, welcher ein

funktionierendes Ton-System, bestehend aus den drei mit der äußeren sowie der Zytoplasmamembran interagierenden Proteinen TonB, ExbB und ExbD, erfordert (232). Die Aufgabe des TonB besteht in der Energiebereitstellung für die Rezeptoren der äußeren Membran, welche dann Eisen, Eisenchelate und auch Vitamin B₁₂ durch die äußere Membran in den periplasmatischen Raum translozieren und dem Bakterium zur Verfügung stellen (232). Die kodierenden Gene *exbB*, *exbD* und *tonB* bilden eine physikalisch verlinkte Einheit, werden jedoch unabhängig voneinander transkribiert (20). Die Inokulation entsprechender *P. multocida*-Insertionsmutanten im Mäusemodell zeigten durch die auftretende Attenuierung, dass jedes der Gene eine wichtige Funktion für die Virulenz des Erregers erfüllt (20). Versuche zur immunisierenden Wirkung der Gene sind der Literatur bislang nicht zu entnehmen.

Hämoglobin-bindende Proteine A; B (*hgbA*; *hgbB*)

Protein Pm0300, welches mit Pm0298 und Pm0299 einer transkriptionalen Einheit angehört, wurde durch Klonierung und Überexpression in *E. coli* als Hämoglobin-bindendes Protein (Hgb) erkannt und als HgbA bezeichnet. Die Inaktivierung des kodierenden Gens *hgbA* führt nicht zu einer Veränderung der Virulenz oder der Fähigkeit zur Bindung von Hämoglobin, woraus die Autoren das Vorhandensein weiterer Hämoglobin-bindender Proteine ableiteten (21). Gene mit partieller Sequenzähnlichkeit zum *hgbA* wurden unter anderem bei *A. pleuropneumoniae* gefunden und charakterisiert (271). Ein weiteres Protein (Pm0337; HgbB) mit 68 % Ähnlichkeit zu einem Hämoglobin/Hämoglobin-Haptoglobin-bindenden Protein bei *H. influenzae* wurde zunächst bei einem aviären *P. multocida*-Stamm nachgewiesen (55). Auch hier konnte nach Inaktivierung des Gens keine Verminderung der Virulenz oder Hämoglobinbindungsfähigkeit festgestellt werden (55). Beide Proteine, HgbA und HgbB, weisen Eigenschaften typischer TonB-abhängiger OMP auf, wie das Vorhandensein einer TonB-Box am N-terminalen Ende (21, 55). Anhand des sequenzierten *P. multocida* Genoms konnten insgesamt acht putativ Hämin- und/oder Hämoglobin-bindende Proteine identifiziert und im Anschluss auf ihre immunogene Wirkung untersucht werden. Im Mäuseversuch vermochte die experimentelle Inokulation der einzelnen Proteine zwar die Bildung spezifischer Antikörper, jedoch keine Protektivität gegen die folgende Belastung zu vermitteln (22).

Transferrin-bindendes Protein A (*tbPA*)

Das ebenfalls zur Gruppe der TonB-abhängigen IROMPs gehörende TbpA vermittelt die Freisetzung von Eisen aus wirtseigenem Transferrin und besteht bei verschiedenen Vertretern der *Pasteurellaceae* aus zwei in der äußeren Membran verankerten Proteinuntereinheiten TbpA und TbpB, wobei TbpB direkt mit dem Substrat interagiert, während TbpA als Pore fungiert und den Durchtritt des Eisens in den periplasmatischen Raum ermöglicht (232). Während bei anderen bakteriellen Spezies die kodierenden Gene *tbpA* und *tbpB* in operonaler Verbindung vorliegen, konnte bei bovinen *P. multocida* einzig *tbpA* nachgewiesen wer-

den, flankiert durch ein für eine Leucyl-tRNA Synthase kodierendes Gen sowie ein IS1060 Element und reguliert durch den Level extrazellulären Eisens (214, 215). Die Bindung und Internalisierung von Transferrin wird hier anscheinend allein durch TbpA vermittelt. In den bislang verfügbaren Studien konnte das Protein resp. das kodierende Gen ausschließlich in aus Wiederkäuern, wie Rindern, Schafen oder Büffeln, angezüchteten Stämmen nachgewiesen werden (85, 215, 262). Die einzigen abweichenden Ergebnisse mit dem Nachweis von *tbpA* bei unterschiedlichen Kapseltypen und Wirtstierspezies wurden 2005 von Shivachandra et al. veröffentlicht (262).

Stämme boviner Herkunft sind in der Lage, Transferrin von Wiederkäuern zu binden, nicht jedoch Transferrin porcinen, aviären, equinen oder humanen Ursprungs sowie Kaninchentransferrin (214, 215, 297). Ob TbpA eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese boviner Pasteurellosen erfüllt und als spezifischer Virulenzmarker zur Abgrenzung von zur bovinen kommensalen Flora gehörenden *tbpA*-negativen *P. multocida* genutzt werden kann, bedarf weiterer gerichteter Forschungsarbeit. Untersuchungen zur immunologischen Bedeutung von TbpA von *P. multocida* fehlen bisher. Kälber, die mit TbpA und TbpB von *M. haemolytica* immunisiert wurden, zeigten nach der folgenden Belastung mit *M. haemolytica* die beste Protektion durch Aktivierung sowohl der humoralen als auch zellgebundenen Abwehr. Aufgrund der Ergebnisse der entweder mit TbpA oder TbpB immunisierten Tieren konnte die Antikörperantwort TbpB zugeordnet werden, während für TbpA die Aktivierung der zellgebundenen Abwehr angenommen wird (226).

Heme acquisition system receptor

Bei der Untersuchung von Membranfraktionen von unter Eisenmangelbedingungen angezüchteten *P. multocida* auf ihre antigenen und protektiven Eigenschaften wurde ein Protein von 96 kDa, welches als heme acquisition system receptor (HasR) charakterisiert wurde, als immunodominant identifiziert (227). Vergleichende Vakzinierungsstudien unter Verwendung von OMP- sowie IROMP-angereicherten Fraktionen zeigten eine erhöhte Resistenz von Rindern gegen die folgende Belastung, jedoch konnte kein Vorteil in der Verwendung von I-ROMPs gezeigt werden. Im kodierenden Gen *hasR* konnte upstream des Startcodons eine konservierte Fur-Box sowie am N-terminalen Proteinende eine TonB-Box aufgefunden werden, was auf eine Abhängigkeit des HasR von diesen Systemen schließen lässt (227).

Ferric uptake regulator-Proteine (Fur)

Die Herstellung einer *fur*-Mutante und damit verbundener Überexpression von IROMPs stellt Bedingungen ähnlich denen in Eisenmangelmedien her. Eine *fur-ompH*-Insertionsmutante konnte Mäuse effektiv und serotypübergreifend gegen die folgende Belastung schützen. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass erstmalig *in vitro* gewonnene, hitzeinaktivierte Antigene und durch Beschallung aufgebrochene Zellen eine serotypübergreifende Protektion vermitteln konnten (99). Interessanterweise wurde für OmpH in vorangegangenen Studien eine

homologe Schutzwirkung gezeigt, so dass die serotypübergreifende Schutzwirkung zunächst überraschte. Als mögliche Ursachen für dieses Phänomen werden von den Autoren folgende Theorien aufgestellt: (I) der Anstieg der relativen Konzentration immunogener IROMPs durch die Abwesenheit des Haupt-OMPs OmpH und (II) die Exposition eines neuen Antigens oder ein Konzentrationsanstieg eines speziellen Antigens durch die Neuorganisation der Zusammensetzung der äußeren Membran (99). Welche der genannten Theorien zutrifft oder ob beide eine Rolle bei der Immunitätsausbildung spielen, muss durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden.

2.1.5.2.6 *P. multocida* Dermonekrotoxin; DNT (*toxA*)

Gerade in der Pathogenese der porcinen PAR spielt das von *P. multocida*-Stämmen der Kapseltypen D und A gebildete, intrazellulär wirksame Dermonekrotoxin eine wichtige Rolle (147). Die klinischen Symptome der porcinen PAR (s. Kap. 2.1.4.1.1) können experimentell durch Verabreichung von aufgereinigtem, natürlichem oder rekombinantem DNT ausgelöst werden (89, 160). Obwohl toxinpositive Stämme überwiegend aus Krankheitsgeschehen bei Schweinen isoliert werden, konnten solche Stämme auch aus anderen Wirten, beispielsweise Kaninchen, Rindern, Schafen, Geflügel und Menschen angezüchtet werden (5, 85).

Das für das aus einem einzelnen 146 kDa großen Polypeptid von 1.285 AS bestehende DNT kodierende Gen *toxA* gilt als durch einen lysogenen Phagen der Familie *Siphoviridae* kodierter Bestandteil des *P. multocida* Genoms (160, 229). Die Sequenzanalyse des *toxA* ergab einen mit 35 % entsprechend deutlich vom *P. multocida* Genom (40,8 - 43,9 %) abweichenden GC-Gehalt (160). Das Gen verfügt über keine Signalsequenz und keinen bekannten Exportmechanismus, was zu der Annahme führte, dass die lytische Phase des Bakteriophagen den Toxinexport induziert (229). Die funktionelle Region, verantwortlich für die mitogene und enzymatische Aktivität, wurde am C-terminalen, Domänen zur Zellbindung und Internalisierung am N-terminalen Ende gefunden (230). Das Toxin verfügt somit über Charakteristika sezernierter Exotoxine, konnte jedoch zunächst in ultrastrukturellen Studien im bakteriellen Zytoplasma nachgewiesen werden und wurde in *in vitro* Kultur nicht sezerniert (207).

Das DNT scheint an Gangliosidrezeptoren der Wirtszelloberfläche zu binden und via Endozytose in die Zielzelle zu gelangen (225). Im Folgenden kommt es über die G-Proteinuntereinheit $G_q\alpha$ zu einer Aktivierung der Phospholipase C- β_1 und durch Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat zur Bildung von Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (202, 275, 303). Die Freisetzung von IP_3 und Diacylglycerol wiederum führt zur Mobilisierung von intrazellulärem Kalzium und zur Aktivierung der Proteinkinase C (275).

Als potentes Mitogen für verschiedene Zelltypen wie Fibroblasten oder Osteoblasten führt DNT zum Rearrangement des zellulären Zytoskeletts sowie zur Aktivierung dendritischer Zellen (19, 308). Im Tierversuch ist DNT hochtoxisch für Nager; eine intraperitoneale Injekti-

on ist letal für Mäuse und eine intradermale Injektion verursacht bei Meerschweinchen Dermonekrosen. Diese Wirkung war namensgebend und wurde lange Zeit zur Identifizierung toxinbildender *P. multocida* genutzt (208).

Im Zellkulturversuch konnte die Wirkung des DNT auf die Morphologie und Aktinpolymerisation in dendritischen Zellen ebenso nachgewiesen werden wie die Inhibierung der Migration dieser Zellen (19). Als antigenpräsentierende Zellen haben dendritische Zellen eine Schlüsselfunktion in der Entwicklung der sekundären Immunantwort, so dass deren Beeinträchtigung einen großen Einfluss auf den Ausgang einer Infektion hat.

Aufgrund der hohen wirtschaftlichen Bedeutung der PAR und der Identifikation des pathogenetisch wichtigen DNT sind verschiedene Vakzinen getestet worden. Die bisherigen Ansätze für Impfstoffe gegen die PAR umfassen neben einigen Totimpfstoffen (145) vor allem inaktivierte oder rekombinante Subunitbestandteile des DNT (87, 166, 210, 222). Da Punktmutationen an einem von drei sauren Resten des Toxins zu einer vier- bis sechsfachen Reduktion der Toxinaktivität bei weitgehend unveränderter Toxinstruktur führen, können immunogene Toxoide in wirksamen Vakzinen eingesetzt werden (10). Auch konnte ein durch Deletionsmutagenese des geklonten *foxA* Gens hergestelltes Toxoid Mäuse und deren Nachkommen gegen die Belastung mit aufgereinigtem DNT schützen (224). Die genetische Modifikation des Toxins durch Austausch zweier Schlüsselaminosäuren führte zur Ausbildung eines nicht toxinogenen Proteins, welches Schweine vor der Ausbildung der PAR bei Infektion mit einem toxinbildenden Wildtypstamm schützte (288). Natives DNT wird nur in geringer Menge von den Bakterienzellen gebildet und stellt an sich in der natürlichen Infektion als eher schwaches Antigen dar (166, 261). Formalininaktiviertes DNT-Toxoid hingegen ist für die Induktion einer starken protektiven Immunantwort bekannt (87, 295). Die Identifizierung eines atoxischen, rekombinanten Derivates mit vergleichbarer Antigenität vereinfacht nicht nur die Bereitstellung der benötigten Mengen an Toxoid, sondern umgeht auch die Handhabung großer Mengen toxischer Substanz bei der Impfstoffherstellung (166, 224).

Verschiedene Forschungsgruppen konnten nachweisen, dass Impfstoffe, die aufgereinigtes, formalininaktiviertes DNT oder rekombinantes Toxoid enthalten, bei einer Muttertierschutzimpfung die Ferkel vor der Ausbildung klinischer Symptome der PAR schützen (87, 210, 221). Auch wurden atoxische DNT-Derivate mit deletierten Bereichen oder Proteinfragmente identifiziert, die eine protektive Immunantwort vermitteln (166, 210, 224). Im direkten Vergleich eines atoxischen DNT-Derivates mit aufgereinigtem, formalininaktiviertem Toxin konnten hinsichtlich kolostraler Antikörpertiter, Serumantikörpertiter, Schlachtgewicht und Futterverwertung keine Unterschiede festgestellt werden, während beide Impfgruppen signifikant bessere Ergebnisse aufwiesen als die ungeimpfte Kontrollgruppe (210). Weitere Studien untersuchten die immunogene Wirkung verschiedener DNT-Fragmente. Beide konnten so-

wohl der N- als auch C-terminalen, nicht aber der zentralen Region protektive Eigenschaften nachweisen (166, 261).

Eine DNS-Vakzine, welche das *toxA* in modifizierter, atoxischer Variante enthält, wurde auf ihre immunologische Wirkung im Mäuse- und Schweineversuch hin erprobt und konnte in beiden Tiermodellen eine Antikörperantwort auslösen (234). Wirkverstärker in Form von Adjuvantien können bei solchen Vakzinen vermieden werden, was die Verträglichkeit der Impfstoffe erhöht.

Da die PAR häufig durch toxinogene *P. multocida* nach vorangegangener Infektion durch *B. bronchiseptica* ausgelöst wird, sind auch entsprechende Kombinationsimpfstoffe erhältlich. Sowohl die Wahl der Adjuvantien als auch die antigene Zusammensetzung der Impfstoffe haben großen Einfluss auf die Höhe des vermittelten Schutzes (177, 178), wobei Toxoid enthaltende Impfstoffe generell eine höhere Protektivität gegen die Erkrankung vermitteln als Vakzinen, die inaktivierte *P. multocida* enthalten (223, 224).

2.1.5.2.7 Neuraminidasen

Neuraminidasen (Sialidasen) setzen aus Polymeren wie Glykoproteinen, Glykolipiden, Oligo- und Polysacchariden Sialinsäuren frei, die vom Bakterium als Kohlenstoffquelle genutzt werden können (115). Durch die Reduktion der antibakteriellen Schutzwirkung von Glykoproteinen, z. B. in Speichel oder Serum, wirken die Enzyme zusätzlich als Virulenzfaktoren und begünstigen durch die Freilegung spezifischer Oberflächenrezeptoren respiratorischer Epithelzellen die Kolonisierung des Wirtszellgewebes (107, 163, 244). Während die nutritive Funktion der Sialinsäuren nicht essentiell für das Auslösen einer systemischen Erkrankung zu sein scheint, sind jedoch nicht zur Sialinsäureaufnahme befähigte *P. multocida* Mutanten in ihrer Virulenz attenuiert, was sowohl im intravenösen als auch im intratrachealen Puteninfektionsmodell dargestellt wurde (276, 284).

Für *P. multocida* ist die Produktion sowohl einer zellgebundenen als auch einer extrazellulären Neuraminidase nachgewiesen, die sich in ihrer Substratspezifität unterscheiden (77, 192, 259, 302). Während NanH im Experiment lediglich Enzymaktivität gegenüber 2-3' Sialyllaktose zeigte, konnte für NanB sowohl gegenüber 2-3' als auch 2-6'-Sialyllaktose Aktivität nachgewiesen werden (192). Interessanterweise sind beide Neuraminidasen mit einem Molekulargewicht von 250 bzw. 345-500 kDa deutlich größer als Neuraminidasen anderer bakterieller Spezies. So liegen z. B. die Molekulargewichte der bei *C. perfringens*, *V. cholerae* und *S. pneumoniae* bekannten Neuraminidasen bei 61; 68 und 81 kDa (11).

Neuraminidasen und deren kodierenden Gene wurden sowohl in pathogenen als auch in apathogenen Isolaten nachgewiesen, jedoch scheinen pathogene Isolate eine größere Menge der Enzyme zu bilden (199). Die immunogene Wirkung der zellgebundenen Neuraminidase von *P. multocida* wurde erstmalig im Mäuseversuch getestet. Auch wenn die Entfernung

von Anti-LPS-Antikörpern nicht vollständig gelang, wird doch zumindest ein Teil des durch passive Immunisierung erzielten Schutzeffektes gegen homologe Belastung auf Neuraminidase-Antikörper zurückgeführt (136).

2.1.5.2.8 Lipoproteine

Das Vorkommen des oberflächenexprimierten Lipoproteins Plp-40, welches die Verankerung des Kapselmaterials an der Zelloberfläche zu vermitteln scheint, wurde in Abhängigkeit vom Serotyp untersucht (37, 38, 213, 256). Bei der Untersuchung von Serotyp A-Stämmen mit stark ausgeprägter Kapselproduktion und deren durch wiederholte Passagen hergestellten kapsellosen Varianten wurde ein Zusammenhang zwischen der Menge des Kapselmaterials und der Menge an Plp-40 nachgewiesen. Da die vorgenommene Serotypbestimmung die Serotypen D und F unbeachtet lässt, ist bisher eine Aussage zur Verteilung des Proteins über die verschiedenen Serotypen nicht abschließend möglich, jedoch wurden bei sechs von sieben getesteten Serotyp A-Stämmen aber nur bei zwei von sechs als unbekapselt beschriebenen Stämmen nachweisbare Mengen des Proteins gefunden (38).

Ein gewisser serotypübergreifender Schutz gegen die häufig an der Geflügelcholera beteiligten Serotypen A:1 und A:3 konnte von mehreren Arbeitsgruppen durch die Verwendung bestimmter äußerer Membranproteine erreicht werden (241, 277, 281, 305). Auffällig ist in diesem Zusammenhang die häufige Beschreibung eines Proteins mit dem Molekulargewicht von ca. 39 kDa, welches übereinstimmend Schutz gegen homologe Belastung sowie gegen Belastung mit den Serotypen A:1 und A:3 vermittelt, nicht jedoch gegen Belastung mit dem Serotyp A:4 zu schützen vermag. Während Rimler, Tabatabai und Sthitmatee et al. Proteine dieser Größe aus P-1059 (A:3) isolierten, konnte Wu zwei Lipoproteine (PlpB sowie PlpE) aus einem Stamm des Serotyps A:1 (X-73) aufreinigen. Ob es sich bei den Proteinen der verschiedenen Arbeitsgruppen um dieselben oder unterschiedliche Proteine handelt, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden (241, 277, 280, 305).

Das rekombinante Lipoprotein PlpE konnte bei einmaliger Immunisierung Mäuse gegen homologe Belastung (A:1) sowie serotypübergreifend gegen die Serotypen A:3 und in geringerem Maße A:4 schützen (305). Im Infektionsversuch mit Hühnern konnte ebenfalls eine gute homologe Schutzwirkung erzielt werden, jedoch war die schwächer ausgeprägte serotypübergreifende Schutzwirkung auf den Serotyp A:4 beschränkt. Der Mechanismus der Immunitätsentwicklung durch das bei 15 untersuchten Referenzstämmen von *P. multocida* nachgewiesenen Lipoproteins ist bisher noch unbekannt (305).

Mittels *in vivo* expression technology (IVET) konnten zwei für Lipoproteine kodierende Gene identifiziert werden. Die korrespondierenden Produkte weisen eine Ähnlichkeit von 78 % bzw. 88 % zur AS-Sequenz der Membranlipoproteine Protein D und PCP von *H. influenzae*

auf. In nicht typisierbaren *H. influenzae* wurde PCP als antigenetisch konserviert beschrieben und als möglicher Kandidat für die Herstellung rekombinanter Subunitvakzinen gesehen (108, 134). Das oberflächenassoziierte Protein D verleiht *H. influenzae* durch die Bindung an Immunglobulin D eine Möglichkeit zur Immunevasion (3, 258). Weiterhin ist das 42 kDa große Protein in den Glycerolmetabolismus involviert, verursacht im nasopharyngealen Zellkulturmodell Schäden an Epithelzellzilien und ist virulenzassoziiert - Protein D-defekte *H. influenzae* zeigen gegenüber dem Wildtyp eine 100fache Virulenzreduktion (144, 201). Durch Anwendung der Immunopräzipitation konnte gezeigt werden, dass zwar *P. multocida* PCP, nicht jedoch das Protein D-Äquivalent (GlpQ) oberflächenexprimiert ist, obwohl Antiserum gegen die äußere Membran mit GlpQ interagierten (169). Vakzinierungsversuche an Mäusen und Hühnern unter Verwendung sowohl der nicht-lipidtragenden als auch der lipidtragenden Proteinform führten bei keiner getesteten Tierspezies zur Ausbildung einer belastbaren Immunität (169).

Im Zuge einer Proteomicsstudie wurde eine Vielzahl von *P. multocida* Proteinen untersucht und per Immunoblotverfahren hinsichtlich ihrer antigenen Eigenschaften analysiert (6). Diese Studie konnte 12 immunogene, *in vivo* exprimierte Proteine identifizieren, darunter die vier putativen Lipoproteine PM0442, PM0659, PM0979 sowie PM1614 (6). Die Ergebnisse der Evaluierung ihrer protektiver Effekte im Tier stehen zurzeit noch nicht zur Verfügung.

2.1.5.2.9 AroA

Für verschiedene infektionsmedizinisch bedeutsame bakterielle Pathogene wie *B. pertussis* oder *Y. enterocolitica* sind *aroA*-Mutanten als hochgradig attenuiert und im Mausmodell als effiziente Lebendvakzinen beschrieben (24, 248). Das Gen kodiert für ein Enzym mit Bedeutung in der Synthese der aromatischen Aminosäuren. Für *P. multocida* konnte ein nahezu vollständiger Virulenzverlust von *aroA*-Mutanten im Mäusemodell nachgewiesen werden (129). Im Hinblick auf die mögliche Eignung als Impfstoffbestandteil wurden resistenzfreie *aroA*-Mutanten des X-73 (A:1; PMP1) sowie P-1059 (A:3; PMP3) erzeugt und auf ihre Virulenz und Protektivität hin überprüft. Beide Mutanten stellen sich im Mausmodell hochgradig attenuiert dar und vermitteln eine homologe Immunität. PMP3 konnte darüber hinaus eine Protektivität gegen die nachfolgende Infektion mit Stämmen der Serotypen A:1 sowie A:4 erzielen (128). Eine ähnliche Studie untersuchte die immunogene Wirkung HS-assoziiertes Kapseltyp B-Stämme im Mäuseversuch. Nach einmaliger intranasaler (i.n.) Inokulation konnte, im Gegensatz zur intraperitonealen (i.p.) Verabreichung, nur eine schwache Immunität gegen homologe i.p. Belastung induziert werden, die Schutzwirkung nach i.n. Belastung war höher (280). Eine i.n. Boosterung konnte die Überlebensrate nach i.p. Infektion mit homologen und heterologen Serotypen stark erhöhen. Als weitere Immunisierungsrouten wurde die

subkutane Injektion gewählt, welche erst nach zweimaliger Injektion einen partiellen Schutz vermittelte (280).

Die intramuskuläre Injektion von *P. multocida aroA*-Mutanten bei Kälbern verursachte sowohl nach Erstimpfung als auch nach Boosterung einen signifikanten Anstieg der Körpertemperatur und Allgemeinstörungen in einem Ausmaß, dass von den Autoren NSAID eingesetzt wurden, konnte aber 100 % der Tiere effektiv gegen die subkutanen Infektion mit dem HS-Wildtypstamm immunisieren. Demgegenüber mussten zwei der drei nicht immunisierten Kontrollkälber sowie drei von vier intranasal immunisierten Kälber innerhalb von 14 Tagen post infectionem euthanasiert werden (125). Eine Studie zur Bestimmung der Impfdosis gegen die HS wurde unter Einsatz der Dosen 10^9 , 10^8 sowie 10^7 KbE bei subkutaner Belastungsinfektion durchgeführt (58). Die Kälbergruppe, die zweimal im Abstand von vier Wochen mit 10^7 KbE immunisiert wurde, zeigte die beste Kombination aus Immunantwort, Immunität sowie Sicherheit der Impfung, die anhand von Veränderungen der Rektaltemperatur und des Verhaltens bewertet wurden (58). Bei der Bewertung der Ergebnisse und dem Übertragen auf die Feldsituation ist jedoch die abweichende Infektionsroute, die im Gegensatz zur natürlichen Infektion die Schleimhautbarriere vollständig umgeht, zu beachten.

Zusammenfassung:

Die hier dargestellten Informationen geben den derzeitigen Kenntnisstand zur Identifizierung und Typisierung von *P. multocida* wieder, sowie einen Überblick über die Erkrankungen bzw. Erkrankungskomplexe bei den unterschiedlichen Wirtstierspezies mit Fokus auf den porcinen Pasteurellosen und den bis dato bekannten virulenzassoziierten Genen unter Berücksichtigung durchgeführter Immunisierungsstudien. Bemerkenswert ist, dass trotz der abgeschlossenen Sequenzanalyse des Gesamtgenoms eines aviären Isolates nur wenige Studien hinsichtlich neuer, bisher unbeschriebener VAG veröffentlicht wurden. Auch Pathogenesestudien konnten bislang aufgrund der schwierigen genetischen Manipulation der Spezies nicht in zufriedenstellendem Maße durchgeführt werden. Im Hinblick auf die Identifizierung bestimmter Faktoren, die für die Vermittlung von Wirtsspezifität oder Virulenz bestimmend sein könnten, sind, mit Ausnahme der Identifizierung des Dermonekrotoxins, keine erfolgreichen Studien bekannt. Die Möglichkeit solcher Faktoren, die eine pathogenetische Bewertung des Vorkommens von *P. multocida* in diagnostischem Untersuchungsmaterial erleichtern, bleibt nach wie vor bestehen, setzt aber unter anderem die Durchführung von Expressionsstudien voraus, um die verschiedenen Kompartimente und das Verhalten unterschiedlicher *P. multocida*-Isolate in diesen in Verbindung setzen zu können und Unterschiede im Expressionsmuster zu erkennen. Von anderen pathogenen Spezies, wie *Campylobacter jejuni*, ist ein Fehlen klassischer Virulenzfaktoren bekannt (59). Die Pathogenität wird bei diesen auf die sehr variablen metabolischen Eigenschaften der Bakterien zurückgeführt. Der jetzige Wissensstand lässt auch dies als mögliche Grundlage der Auslösung von Infektionskrankheiten durch *P. multocida* zu, so dass auch Metabolismusstudien zur künftigen Charakterisierung des Infektionsverlaufs von Pasteurellosen einbezogen werden sollten.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Bakterienstämme

3.1.1. *P. multocida*-Wildtypisolate

Zur Untersuchung gelangten 382 *P. multocida*-Isolate des porcinen Atmungstraktes aus unterschiedlichen geographischen Gebieten Deutschlands, der Isolationszeitraum umfasst die Jahre 1999 bis 2006. Die Isolate stammen aus dem oberen Respirationstrakt (oRT; n = 205) einschließlich Nase, Conchen und Tonsillen sowie dem unteren Respirationstrakt (uRT; n = 157) einschließlich tracheobronchialer Region und Lunge.

Die überwiegende Anzahl (n = 342) der in der vorliegenden Studie untersuchten Isolate wurde von Einrichtungen von Bund und Ländern in Form von Reinkulturen zur Verfügung gestellt. Das Institut für Veterinärpathologie der Universität Leipzig sandte tiefgefrorene Organproben von 87 Schweinen zur bakteriologischen Untersuchung ein, darunter Lungen- und Trachealgewebe, Nasenschleimhaut und Conchenmaterial sowie Lymphknoten und Tonsillen. Am Schlachthof entnommene Lungen- und Trachealgewebe sowie Tonsillen von 18 Schlachtschweinen wurden vom Bundeshybridzucht-Programm (BHZP) Lüneburg; Niedersachsen zur Verfügung gestellt. Aus den eingesandten Organproben der beiden Institutionen konnten n = 12 resp. n = 7 *P. multocida*-Isolate angezüchtet werden. Einundzwanzig Stämme, in der Routinediagnostik des Institutes für Mikrobiologie und Tierseuchen (IMT) der FU Berlin aus porcinen Organproben oder Nasentupfern isoliert, wurden der institutseigenen Stammsammlung entnommen.

Für die insgesamt 382 *P. multocida*-Isolate ist der klinische Vorbericht wie folgt: 188 Isolate stammten aus klinisch erkrankten Tieren, welche in 155 Fällen mit entzündlichen Veränderungen der Lunge, in 25 Fällen mit Progressiver atrophischer Rhinitis (PAR) oder PAR-Verdacht und in neun Fällen mit verschiedenen Symptomen assoziierte Stämme beinhalten. Die Anzahl an von gesunden Tieren isolierten Stämmen liegt in einer vergleichbaren Größenordnung (n = 170). Für 24 Stämme sind keine vorberichtlichen Informationen zum Gesundheitsstatus verfügbar. Die Stämme repräsentieren mindestens 150 deutsche Haltungsbetriebe, wobei die Anzahl der Stämme pro Betrieb zwischen eins (n = 94 Betriebe) und 14 (n = 1 Betrieb) variiert. Von 55 *P. multocida*-Isolaten sind keine Informationen hinsichtlich der geographischen Herkunft bekannt (Tab. 8).

Tab. 8 Übersicht der geographischen Verteilung von 382 *P. multocida*-Isolaten

Bundesland	Stämme gesamt (n)	Stämme klinisch gesunder Tiere (n)	Stämme klinisch kranker Tiere (n)	Stämme ohne vorberichtliche Informationen (n)
Baden-Württemberg	161	99	52	10
Bayern	13	2	11	0
Brandenburg	10	0	10	0
Hessen	2	2	0	0
Mecklenburg-Vorpommern	7	0	0	7
Niedersachsen	33	7	26	0
Nordrhein-Westfalen	60	39	21	0
Sachsen	12	2	10	0
Sachsen-Anhalt	13	5	8	0
Schleswig-Holstein	14	0	14	0
Thüringen	1	0	1	0
unbekannt	56	14	35	7
Gesamt	382	170	188	24

3.1.2. Kontroll- und Referenzstämme

Zur Untersuchung der virulenzassoziierten Gene und speziesspezifischen DNS-Sequenzen der untersuchten *P. multocida*-Stämme wurden die in Tab. 9 aufgeführten Kontroll- und Referenzstämme herangezogen.

Tab. 9 Kontroll- und Referenzstämme und deren virulenzassoziierte Gene

Herkunftsbezeichnung	Serotyp	cap-Gen	Virulenzassoziierte Gene	Bezugsquelle	Wirt
NCTC10322	A	capA	<i>kmt1</i> , <i>exbB/tonB</i> , <i>oma87</i> , <i>nanH</i> , <i>nanB</i> , <i>pfha</i> , <i>hgbA</i> , <i>ptfA</i>	(260)	Schwein
ATCC12945	A	<i>capA</i>	<i>kmt1</i> , <i>exbB/tonB</i> , <i>oma87</i> , <i>nanH</i> , <i>nanB</i> , <i>pfhaB</i> , <i>hgbB</i> , <i>hgbA</i> , <i>ptfA</i>	(260)	unbek.
NCTC10323	B	capB	<i>kmt1</i> , <i>exbB/tonB</i> , <i>oma87</i> , <i>nanH</i> , <i>nanB</i> , <i>tbpA</i> , <i>hgbB</i> , <i>hgbA</i> , <i>ptfA</i>	(260)	Rind
ATCC12948	D	capD	<i>kmt1</i> , <i>exbB/tonB</i> , <i>oma87</i> , <i>nanH</i> , <i>nanB</i> , <i>toxA</i> , <i>hgbB</i> , <i>hgbA</i> , <i>ptfA</i>	(260)	Schwein
NCTC 10326	E	capE	<i>kmt1</i> , <i>exbB/tonB</i> , <i>oma87</i> , <i>nanH</i> , <i>nanB</i> , <i>hgbB</i> , <i>hgbA</i> , <i>ptfA</i>	Uni Gießen; IHIT	unbek.
P-4679	F	capF	<i>kmt1</i> , <i>exbB/tonB</i> , <i>oma87</i> , <i>nanH</i> , <i>nanB</i> , <i>hgbB</i> , <i>hgbA</i> , <i>ptfA</i> , <u>16S rRNA</u>	Prof. Rimler (†), National Animal Disease Center, Ames, USA	Pute

Die Kontroll- und Referenzstämme dienen für fett gedruckte Gene als Positivkontrolle in der PCR, für unterstrichene Gene als Template zur Generierung von Oligonukleotidsonden.

3.2. Bakteriologische Untersuchung von Organproben und Identifizierung von *P. multocida*

Ein Organabklatsch der in Form von Nasenschleimhaut, Conchenmaterial, Tonsillen, Lymphknoten sowie Tracheal- und Lungengewebe eingesandten Gewebeproben wurde nach Anlegen einer sterilen Organschnittfläche auf Hammelblut- und TSYE (tryptic soy yeast extract)-Agar mit Zusatz von 5 % Schafblut durchgeführt. Die Nährböden wurden im Anschluss für 18 Stunden (h) bei 37°C und 5 % CO₂-Spannung inkubiert.

Verdächtige Kolonien wurden makroskopisch, mikroskopisch sowie durch Testung der Cytochromoxidase- und Katalasereaktion untersucht, subkultiviert und per PCR auf die für *P. multocida* speziesspezifische Sequenz *kmt1* (291) getestet. Entsprechend wurde die Speziesdiagnose der eingesandten bakteriellen Kulturen durch die Cytochromoxidase- und Katalasereaktion sowie des mittels PCR geführten Nachweises der *kmt1* bestätigt.

3.3. Asservierung der Bakterienstämme und Anzucht für experimentelle Untersuchungen

Zur Asservierung der *P. multocida*-Isolate wurden Reinkulturen, die nach den unter Kap. 3.2. genannten Bedingungen angezchtet wurden, verwendet. Eine Einzelkolonie wurde in 5 ml TSYE-Bouillon suspendiert und erneut bei 37 °C und 5 % CO₂ für 18 h inkubiert. 1,3 ml der Bakteriensuspension wurden mit 0,5 ml Glycerin (Rotipuran® Glycerol, Roth GmbH&Co., Karlsruhe) in einem 2 ml Cryoröhrchen (Cryovial®, Roth GmbH&Co., Karlsruhe) vermischt und bei -80°C gelagert.

3.4. Molekulargenetische Methoden zur Charakterisierung der *P. multocida*-Isolate

3.4.1. Gewinnung genomischer DNS

3.4.1.1. Hitzelyse

Für die einfache und schnelle Gewinnung genomischer DNS aus Bakterienzellen zur Verwendung in der PCR oder in Dot-Blot-Hybridisierungen wurden die zu untersuchenden *P. multocida*-Isolate unter den oben genannten Bedingungen angezchtet. In 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen („safe lock“, Eppendorf, Hamburg) wurden 200 µl A. bidest vorgelegt und je eine Impföse Koloniematerial darin suspendiert. Die Suspension wurde 10 min bei -20 °C gefroren, anschließend im Wasserbad (Julabo Labortechnik, Seelbach) für 10 min bei

95 °C erhitzt und in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) 10 min bei 13.000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der DNS-haltige Überstand wurde in ein neues 0,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt und bis zur weiteren Verwendung bei +4 °C aufbewahrt.

3.4.1.2. Aufreinigung genomischer DNS

Eine der Voraussetzungen für das Gelingen der Ribotypisierung ist die Verwendung hochwertiger DNS, die möglichst frei von den übrigen Zellbestandteilen ist. Für die Extraktion von DNS wurde das MasterPure™ Genomic DNA Purification Kit (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) unter Berücksichtigung der Angaben des Herstellers verwendet und bis zur weiteren Nutzung bei -20 °C gelagert.

3.4.1.3. Extraktion von PCR-Produkten aus Agarosegel

Die Herstellung der DNS-Sonden für die Dot-Blot-Hybridisierung sowie die Ribotypisierung setzt eine Markierung der DNS-Fragmente voraus. Unter Verwendung des PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) und Berücksichtigung der Angaben des Herstellers wurden die jeweiligen DNS-Sequenzen amplifiziert, wobei das eingesetzte dUTP an Digoxigenin (DIG-dUTP) gekoppelt ist. Der Erfolg der Markierung wurde in der anschließenden Agarosegel-Elektrophorese anhand des veränderten Laufverhaltens im Vergleich zur parallel per Einzel-PCR erzeugten unmarkierten Sequenz überprüft. Zur Extraktion aus dem Agarosegel wurde die Bande unter UV-Lichtkontrolle aus dem Gel ausgeschnitten und die DNS mit Hilfe des Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Herstellerangaben aus dem Gel gelöst. Es folgte die Bestimmung der Konzentration der Sonden-DNS (siehe Kap. 3.4.2) sowie die Lagerung der Sonde bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung.

3.4.1.4. Aufreinigung der PCR-Produkte

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten zur anschließenden Sequenzanalyse wurden 4 µl des PCR-Ansatzes mit 2 µl Ladepuffer gemischt und zur Kontrolle der Amplifikatgröße auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Zur Aufreinigung des verbliebenen Amplifikates wurde das Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend der Angaben des Herstellers genutzt. Die Lagerung bis zum Versand der Proben erfolgte bei +4 °C.

3.4.2. Konzentrationsbestimmung isolierter DNS

Die Konzentration der mit den oben beschriebenen Methoden isolierten DNS sowie der Sonden-DNS wurde im Anschluss mittels Spectrophotometer Nanodrop 1000 (Thermo scientific GmbH, Schwerte) bestimmt.

3.5. Polymerase-Kettenreaktion

3.5.1. Oligonukleotidprimer

Die genutzten Oligonukleotidprimer wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert und als Lyophilisat geliefert. Vor Ort erfolgte die Herstellung der 100 pmol/µl Stammlösung nach Anweisung des Herstellers und die Lagerung bei -20 °C. Für die Multiplex-PCR-Untersuchungen wurde auf bereits vorhandene Primersequenzen zurückgegriffen (85, 289, 291). Bei der näheren Untersuchung der Gene *pfaB* und *igbP* wurden Oligonukleotidprimer anhand im Internet zugänglichen Sequenzdaten der entsprechenden Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>), unter Verwendung des Programmes LaserGene 6 (DNASTar, Konstanz) und unter Berücksichtigung des Verhältnisses der Nukleotide AT:GC von 50:50, einer Länge von ca. 20 bp und einer Schmelztemperatur von ca. 58 °C erstellt. Übersichten der für die PCR und DNS-DNS-Hybridisierung genutzten Primer finden sich in Tab. 10.

Tab. 10 Oligonukleotidprimersequenzen, PCR-Konditionen und Referenzen für den Nachweis virulenzassoziiierter Gene bei *P. multocida*-Stämmen sowie für die Herstellung von Oligonukleotidsonden

Primer	Oligonukleotidprimer-Sequenz (5' - 3')	Gen oder Genfragment	Genprodukt	Länge des Amplifikats (bp)	PCR-Bedingungen (°C/s)			Referenz
					Denaturierung	Annealing	Elongation	
Kmt1T7; KMT1SP6	ATCCGCTATTTACCCAGTGG/ GCTGTAACGGAACCTGCCAC	<i>P. multocida</i> spezifische Sequenz	-	456	94/30	57/30	72/60	(291)
P6 f/r	AAGGATCCCTAGTATGCTAACACACAGGACGCG/ ICTGGATCCATGAAAAAACTAACTAAAGTA	psI	P6-like-Protein; äußeres Membranprotein	430	94/30	50/30	72/60	mod. nach (148)
KTSP61 KTT72	ATCCGCTAACACATCCTC/ AGGCTCGTTTGGATTATGAAG	Spezifische Sequenz für B:2, B:5, B:2,5	-	590	94/30	54/30	72/60	(291)
CapA f/r	TGCCAAAATCGCAGTCAG/ TTGCCATCATTGTCAGTG	hyaD/C		1044	94/30	55/30	72/30	(289)
CapB f/r	CATTTATCCAAGCTCCACC/ GCCCGAGAGTTTCAATCC	bcbB		759	94/30	55/30	72/30	(289)
CapD f/r	GCTTGTGCTTGATTTTGTGTC/ CATCTACCCACTCAACCATATCAG	dcbF	Nachweis kapselspezifischer Sequenzen	657	94/30	55/30	72/30	(289)
CapE f/r	TCCGCAGAAAAATTATTGACTC/ GCTTGTGCTTGATTTTGTGTC	ecbJ		513	94/30	55/30	72/30	(289)
CapF f/r	AATCGGAGAACGCAGAAATCAG/ TTCCGCCGTCAATTACTCTG	fcbD		852	94/30	55/30	72/30	(289)
HssB f/r	ACAGGACAGTAAACATCCGC/ GTTGCTCATCATGTCICCGAT	hssB	Heparosansynthase B	1685	94/30	55/30	72/90	Diese Arbeit
ToxA ^a f/r	CTTAGATGAGCGACAAGGT/ GGAATGCCACACCCCTGATA	toxA	Dermonekrotoxin	848	94/30	55/30	72/80	mod. nach (167)
ToxA2 ^b f/r	ATGAAAACAACAAACATTTTTTAACT/ TTATAGTGCTCTTGTAAAGCGGAGGC	toxA	Dermonekrotoxin	3858	95/40	51/60	Zyklus 1-10 72/300 Zyklus 11-30 +5s	(83)
Oma87 f/r	ATGAAAAAATCTTTTAAATTGCGAGC/ TGACTTGGCAGTTCATAAC	oma87	Äußeres Membranprotein	949	94/30	55/30	72/80	(85)
PtfA f/r	TGTGGAATTCAGCATTTTAGTGTGTC/ TCATGAATCTTATGCGCAAAAATCCTGCTGG	ptfA	Fimbriales Adhäsion	500	94/30	55/30	72/60	(75)

Primer	Oligonukleotidprimer-Sequenz (5' - 3')	Gen oder Genfragment	Genprodukt	Länge des Amplifikats (bp)	PCR-Bedingungen (°C/s)			Referenz
					Denaturierung	Annealing	Elongation	
Pm TbPA f/r	<u>TTGGTTGGAAACCGGTAAAGC/TAACGTGTACGGAAAAGCCC</u>	<i>tbPA</i>	Transferrinbindendes Protein	729	94/30	57/30	72/60	(85)
HgbB ^a f/r	<u>ACCGCGTTGGAATTATGATTG/CATTGAGTACGGCTTGACAT</u>	<i>hgbB</i>	Hämoglobinbindendes Protein B	789	94/30	54/30	72/45	(85)
HgbB ^b f/r	<u>ACCGCGTTGGAATTATGATTG/CATTGAGTACGGCTTGACAT</u>	<i>hgbB</i>	Hämoglobinbindendes Protein B	789	94/30	54/30	Zyklus 1-10: 72/45 Zyklus 11-30 +5s	(83)
HgbA f/r	<u>TGGCGGATAGTCATCAAG/CCAAAGAACCCTACCCA</u>	<i>hgbA</i>	Hämoglobinbindendes Protein A	420	94/30	53/30	72/30	(85)
MhPm ExbB f/ Pm TonB r	<u>GGTGGTGATATTGATCGGGC/GCATCATGCGTGCACGGTI</u>	<i>exbBD tonB</i>	ExbB/TonB-Transporter	1144	94/30	55/30	72/90	(85)
Pm NanB f/r	<u>GTCCTATAAAGTGACGCCGA/ACAGCAAAGGAAGACTGTCC</u>	<i>nanB</i>	Neuraminidase B	585	94/30	56/30	72/45	(85)
Pm NanH f/r	<u>GAATATTTGGCGGCAACA/TTCICGCCCTGTCATCACT</u>	<i>nanH</i>	Neuraminidase H	361	94/30	56/30	72/30	(85)
PfhaB ^a f/r	<u>AGCTGATCAA GTGGTGAAC/IGGTACATTGGTGAATGCTG</u>	<i>pfhaB</i>	Pasteurella filamentöses Hämagglutinin	275	94/30	55/30	72/30	(85)
PfhaB ^b f/r	<u>AGCTGATCAA GTGGTGAAC/IGGTACATTGGTGAATGCTG</u>	<i>pfhaB</i>	Pasteurella filamentöses Hämagglutinin	275	94/30	55/30	Zyklus 1-10: 72/30 Zyklus 11-30 +5s	(85)
16S rRNA PM ^a f/r	<u>ATGCAAGTCGAACCGGTAGCAGG/GTGACGGCGCGGTGTGTACAA</u>	16S rRNA	16S rRNA	1355	95/10	59/30	Zyklus 1-10: 72/90 Zyklus 11-30 +5s	Diese Arbeit

f: forward r: reverse; ^a Oligonukleotidprimer für die PCR-Untersuchung; ^b Oligonukleotidprimer für die Herstellung von Oligonukleotidsonden

3.5.2. Reaktionsansätze und Thermocycler-Programme für die Multiplex-PCR-Untersuchungen

Die Zusammensetzung der durchgeführten Multiplex-PCRs geht zurück auf die Arbeit zur Etablierung einer Multiplex-PCR zur Diagnostik von *P. multocida* und *M. haemolytica* (83) und wird im Folgenden, zur alleinigen Charakterisierung von *P. multocida* modifiziert, wiedergegeben:

Multiplex-PCR 1 (Gesamtvolumen 25 µl)

PCR-Puffer (10x)	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	2,0 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
je Primerpaar ^a (100 pmol/µl)	0,1 µl
Taq DNA-Polymerase	0,1 µl
A. bidest.	17,7 µl
Proben-DNS	2,5 µl

^a Multiplex-PCR 1 beinhaltet die Primer für den Nachweis folgender Gene bzw. Gensequenzen: *capA* (1044 bp); *capD* (657 bp); *toxA* (848 bp); *tbpA* (729 bp) sowie *kmt1* (457 bp).

Multiplex-PCR 2 (Gesamtvolumen 25 µl)

PCR-Puffer (10x)	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	2,0 µl
dNTPs (10 mM)	0,6 µl
je Primerpaar ^b (100 pmol/µl)	0,1 µl
Taq DNA-Polymerase	0,15 µl
A. bidest.	17,0 µl
Proben-DNS	2,5 µl

^b Multiplex-PCR 2 beinhaltet die Primer für den Nachweis folgender Gensequenzen: *exbB/tonB* (1144 bp), *oma87* (949 bp), *capF* (852 bp), *hgbB* (789 bp), *nanB* (585 bp), *ptfA* (500 bp), *hgbA* (420 bp), *nanH* (361 bp), *pfhaB* (275 bp).

Die in Tab. 11 angegebenen Programme starten jeweils mit einer Denaturierungsphase (94 °C/4 min) und enden mit einer Endelongation von 72 °C/10 min. Nach Zugabe von 4 µl bromphenolblauhaltigem Ladepuffer zur Erhöhung der spezifischen Dichte der Probe werden 10 µl des Ansatzes auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen und bei 100 V für 90 min in der horizontalen Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt.

Tab. 11 Thermocycler-Programme für die Multiplex-PCR Protokolle (Multiplex 1, 2)

	Denaturierung (°C/s)	Annealing (°C/s)	Elongation (°C/s)
Multiplex-PCR 1	94/30	58/45	68/210
Multiplex-PCR 2	94/30	60/45	70/240

3.5.3. Reaktionsansätze und Thermocycler-Programme für Einzel-PCRen

Der Nachweis des für die Heparosansynthase 2 kodierenden Gens *hssB* erfolgte in einer Einzel-PCR unter Verwendung der in Tab. 10 genannten Oligonukleotidprimer *hssB* f/r. Neben der Screeninguntersuchung auf dieses Gen wurden unklare Ergebnisse bezüglich der in den Multiplex-PCRen 1 und 2 nachgewiesenen Gene unter Verwendung des entsprechenden Primerpaares und folgender Zusammensetzung im Gesamtvolumen von 25 µl in einem Einzel-PCR-Protokoll überprüft:

PCR-Puffer (10x)	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,25 µl
dNTPs (10 mM)	0,1 µl
je Primer (10 pmol/µl)	1,0 µl
Taq DNA-Polymerase	0,075 µl
A. bidest.	17,5 µl
Proben-DNS	2,5 µl

Das Thermocycler-Programm für die Einzel-PCRen wurde in Abhängigkeit der Eigenschaften und Anforderungen der Oligonukleotidprimer sowie der zu erwartenden Amplifikatgröße des Zielgens bzw. –fragments individuell gewählt. Tab. 10 gibt eine Übersicht über die verwendeten Reaktionsbedingungen.

3.5.4. Reaktionsansätze und Thermocycler-Programme für die Untersuchungen der für das *Pasteurella* filamentöse Hämagglutinin und das Immunglobulin-bindende Protein kodierenden Gensequenzen *pfhaB* und *igbP*

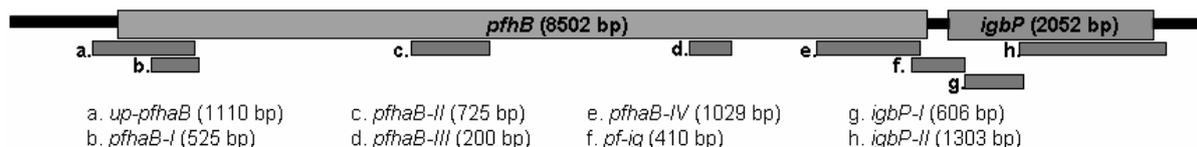
Durch die große strukturelle Ähnlichkeit des *Pasteurella* filamentösen Hämagglutinins (PfhaB; *pfhaB*) zum hoch immunogenen filamentösen Hämagglutinin (FhaB; *fhaB*) von *B. pertussis*, welches einen wichtigen Bestandteil des Impfstoffes zur Bekämpfung des humanen Keuchhustens darstellt, ist auch *pfhaB* als interessantes potentielles Impfantigen anzusehen. Es sind zur Zeit zwei Varianten des Gens bekannt, *pfhaB1* und *pfhaB2*, die bis auf eine zentrale Deletion im *pfhaB1* in ihrer Gensequenz identisch sind (93). Beide Varianten werden durch die in der Multiplex-2 genutzten Oligonukleotid-Primer durch Amplifikation ei-

nes 275 bp großen Genfragmentes nachgewiesen, was durch ein Alignment mit der Software DNASTar Lasergene 6 (Konstanz) nachgewiesen wurde. Die Unterscheidung der beiden Gensequenzen *pfhaB1* und *pfhaB2* wird in der Literatur nicht einheitlich gehandhabt. Daher wird im Folgenden nur auf die Bezeichnung *pfhaB* zurückgegriffen.

Aufgrund der bisher sehr marginalen Beschreibung des Proteins und seines kodierenden Gens in der verfügbaren Literatur wurden im Anschluss an die Screeninguntersuchung aller 382 *P. multocida*-Isolate die *pfhaB*-positiven Stämme weitergehend hinsichtlich der genetischen Struktur dieses Gens und flankierender Regionen betrachtet.

Zur genaueren Charakterisierung des Gens wurde eine 8.502 bp umfassende Sequenz des *pfhaB* sowie des sich stromabwärts anschließenden, für ein Immunglobulinbindendes Protein kodierenden Gens, *igbP* (2.052 bp), einschließlich der in der genutzten Referenzsequenz 25 bp umfassenden Zwischensequenz sowie flankierender Regionen stromauf- und abwärts mittels weiterer PCR-Protokolle untersucht. Anhand der in der Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/17861368>) öffentlich zugänglichen vollständigen kodierenden Sequenz von *pfhaB* und des putativen Immunglobulinbindenden Proteins *igbP* (Acc.-Nr.: AY035342; *P. multocida* Serotyp A:3) wurden acht Primerpaare generiert, die Fragmente unterschiedlicher Größe aus verschiedenen Bereichen der Gene amplifizieren, so dass 5.383 bp der insgesamt 11.878 bp umfassenden Sequenz überprüft werden konnten, um eine erste Abschätzung der Konserviertheit bzw. Variabilität dieser Gene zu ermöglichen. Vier Fragmente umspannen Bereiche im *pfhaB* selbst. Darüber hinaus wurden mithilfe weiterer Primerpaare die stromauf- und abwärts gelegenen flankierenden Sequenzen überprüft sowie Bereiche im benachbarten *igbP*. In Abbildung 1 findet sich die schematische Darstellung der genannten Gene unter Angabe der Lokalisationen der genutzten Primerpaare (s.a. Tab. 12) und der amplifizierten Fragmente.

Abb. 1 Schematische Darstellung des *P. multocida* A:3 *pfhaB* sowie *igbP* (Acc.-no. AY035342) unter Berücksichtigung der Lage und Länge (bp) der durch die verwendeten Primerpaare (Tab. 12) amplifizierten Fragmente (a – h)



Unter Berücksichtigung der Größe der zu erwartenden Amplifikate wurden die als *pfhaB-I*, *pfhaB-II*, *pfhaB-III* und *pfhaB-IV* bezeichneten Fragmente gemeinsam in einer Multiplex-PCR untersucht. Die verbleibenden Genabschnitte wurden mittels Einzel-PCR-Nachweis charakterisiert. Die Protokolle der Multiplex-PCR-Reaktion als auch der Einzel-PCR-Reaktionen werden im Folgenden aufgelistet. Die Sequenzen der verwendeten Primer sowie die verwendeten Thermocycler-Protokolle finden sich in Tab. 12.

pfhaB-Multiplex (Gesamtvolumen: 25 µl):

PCR-Puffer (10x)	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	2,0 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
je Primerpaar (100 pmol/µl)	0,1 µl
Taq DNA-Polymerase	0,15 µl
A. bidest.	17,7 µl
Proben-DNS	4,0 µl

Die Thermocycler-Reaktionsbedingungen finden sich in Tab. 11.

Einzel-PCR-Protokolle (Gesamtvolumen: 25 µl):

PCR-Puffer (10x)	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,25 µl
dNTPs (10 mM)	0,1 µl
je Primer (10 pmol/µl)	1,0 µl
Taq DNA-Polymerase	0,075 µl
A. bidest.	17,55 µl
Proben-DNS	2,5 µl

Die Thermocyclerbedingungen für die Einzel-PCRen zum Nachweis der flankierenden Fragmente und Fragmenten des *igbP* finden sich in Tab. 12.

Tab. 12 Primersequenzen, PCR-Bedingungen und Referenzen für den Nachweis verschiedener Fragmente im *pfha* sowie *igbP* bei *P. multocida*

Primer	Oligonukleotidprimer-Sequenz (5' - 3')	Gen- fragment	Ref.- Sequenz	Position in der Referenz- Sequenz	Amplifikat- länge (bp)	PCR-Bedingungen (°C/s)			Referenz
						Denatu- rierung	Annea- ling	Elonga- tion	
Up- <i>pfha</i> f/r	AGTGGTGTACGCAACATCG/ CCTGTACTAGATCCCGTGAT	<i>pfha</i>	AY035342	775-794 1866-1885	1110	94/30	59/30	72/90	Diese Arbeit
P <i>pfha</i> -I f/r	ATAATGGGACTGAAGCGCAG/ CCTGTACTAGATCCCGTGAT	<i>pfha</i>	AY035342	1360-1379 1866-1885	525				
P <i>pfha</i> -II f/r	AGGACGGGGTAGATTTATCC/ GGCGAATTTCTTCTACCCGT	<i>pfha</i>	AY035342	3838-3857 4544-4563	725	94/30	59/30	68/120	
P <i>pfha</i> -III f/r	AAGATTGGTGGCAGTGTAC/ CATCATACTGCAACCTGCGT	<i>pfha</i>	AY035342	6705-6724 6886-6905	200				
P <i>pfha</i> -IV f/r	TATGCAACAGTAGGCATGCC/ CATCTGCTTTAGCGTTCGCT	<i>pfha</i>	AY035342	8268-8287 9278-9297	1029				
P <i>pfha</i> - <i>igbP</i> f/r	AGCGAACGCTAAAGCAGATG/ GAAGCACGAAACCGCATCAAT	<i>pfha-igbP</i>	AY035342	9278-9297 9669-9688	410	94/30	59/30	70/45	
<i>igbP</i> 1 f/r	TTGAACAATCTCGAGGCGTG/ GGATCGAAGAACACCACCTT	<i>igbP</i>	AY035342	9601-9620 10188-10207	606	94/30	59/30	70/45	
<i>igbP</i> 2 f/r	AAGGTGGTGTCTTCGATCC/ GTGCTGCTCTTGGTGATTCA	<i>igbP</i>	AY035342	10188-10207 11472-11491	1303	94/30	59/30	72/90	

3.6. DNS-DNS-Hybridisierung

3.6.1. Dot-Blot-Hybridisierung

Für die Herstellung der Dot Blots wurden die nach Angaben unter Kap. 3.4.1.1. hergestellten, frischen Hitzelysate 10 min bei 95 °C im Wasserbad erhitzt und anschließend sofort auf Eis verbracht, um eine Renaturierung der DNS zu verhindern. Die denaturierte DNS (2,5 µl) wurde durch Auftropfen auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics, Mannheim) aufgebracht. Nach Lufttrocknen der Membran wurde die DNS durch Erhitzen im Ofen (120 °C, 20 min) fixiert und bis zur weiteren Verwendung bei +4 °C gelagert.

3.6.2. Restriktionsendonuklease-Verdau

Drei Mikrogramm der wie in Kap. 3.4.1.2 beschrieben aufgereinigten DNS wurden in einem Gesamtvolumen von 40 µl unter Zusatz von 0,5 µl (5 Units) der Restriktionsendonuklease *Hpa*II, 4 µl (entsprechend 10 % des Ansatzvolumens) 10x NEB Puffer 1 und A. bidest in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf Typ „safe lock“) für 3 h bei 37 °C im Sandbad inkubiert. Das Enzym schneidet die DNS definiert an der spezifischen Sequenz 5'-C^ACGG-3'. Nach Zugabe von 5 µl Ladepuffer wurden 25 µl des Reaktionsgemisches auf ein mit Ethidiumbromid versetztes, 0,7 %iges TAE-Agarosegel aufgetragen. Pro Gel konnten 12 Proben untersucht werden, in den Slots 1, 8 und 16 wurde jeweils ein 1 kb Größenmarker (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) und zusätzlich als interne Kontrolle in Slot 15 das *P. multocida*-Isolat ATCC12948 mitgeführt. Die Agarosegel-Elektrophorese unter Verwendung von 1 x TAE-Laufpuffer erfolgte bei 15 V für 16,5 h. Die Trennung der entstandenen DNS-Fragmente wurde unter UV-Licht kontrolliert und dokumentiert.

3.6.3. Southern Blot (Kapillarblot)

Zur Vorbereitung der Übertragung der fragmentierten DNS aus den Agarosegelen auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics, Mannheim) wurden die Agarosegele im Anschluss an die Elektrophorese zur Denaturierung der DNS für 10 min in 250 mM Salzsäure bei Raumtemperatur auf dem Wipptisch (Biometra GmbH, Göttingen) gewaschen. Es folgte ein Waschschrift mit A. bidest. zur Entfernung der Salzsäure und die zweimalige Inkubation für jeweils 15 min unter Verwendung einer Denaturierungslösung bei Raumtemperatur auf dem Wipptisch. Nach einem erneuten Waschschrift mit A. bidest. wurde das Gel mit Neutralisationslösung überschichtet und wiederum zweimal bei Raumtemperatur für jeweils 15 min inkubiert. Zwischenzeitlich wurden die benötigten Materialien für den Aufbau des Southern

Blots bereitgestellt. Eine Auflistung der Materialien sowie die Zusammensetzung der eingesetzten Lösungen und Puffer finden sich im Anhang (Kap. 8.3.3., 8.4, 8.5.).

Die Blotschale wurde ca. 3 cm hoch mit 20 x SSC, einer hochkonzentrierten Salzlösung, befüllt. Der mit entsprechend der Breite des Agarosegels zugeschnittenem Whatman-Papier (3 MM) umwickelte Blot-Tisch wurde in die befüllte Schale gestellt. Weiteres Whatman-Papier, auf die Abmaße des Agarosegels zugeschnitten, wurde zum Äquilibrieren in 5 x SSC-Lösung getaucht und auf den umwickelten Blot-Tisch gelegt. Durch Hin- und Herrollen eines Glasröhrchens auf dem Papier wurden Luftblasen zwischen den einzelnen Papierlagen sorgfältig entfernt. Das durch die oben erwähnten Waschschrirte vorbereitete Agarosegel wurde mit den Slotöffnungen nach unten zeigend auf dem Papier abgelegt und die Ränder außerhalb des DNS enthaltenden Bereiches ringsum mit Parafilm (VWR International, Dresden) belegt, um ein den Kapillarkräften folgendes Aufsteigen der Salzlösung durch die Papierlagen und das Agarosegel zu gewährleisten. Die positiv geladene Nylonmembran wurde zunächst je 1-2 min in bereitgestellter 2 x SSC- und 5 x SSC-Lösung äquilibriert und exakt auf dem Gel abgelegt. Ein weiteres Blatt Whatman-Papier 3 MM und darüber ein möglichst hoher (ca. 10 cm) Zellstoffstapel komplettierten den Aufbau, der abschließend mit einer Glas- oder Kunststoffplatte abgedeckt und einem 1 kg Gewicht beschwert wurde. Den Kapillarkräften folgend stieg die konzentrierte Salzlösung durch die einzelnen Schichten und überführte die DNS aus dem Gel in die darüber liegende positiv geladene Nylonmembran. Während des Vorgangs wurde nach Bedarf 20 x SSC nachgegeben und durchfeuchteter Zellstoff gegen trockenen ausgetauscht. Der Aufbau wurde nach 36 h abgebaut und die Nylonmembran für 2 min in 2 x SSC bei Raumtemperatur inkubiert, um überschüssiges Salz auszuwaschen. Zur Fixation der DNS wurde die Membran anschließend im Ofen bei 120 °C für 30 min gebacken. Bis zur Weiterverwendung erfolgte die Lagerung der Membran bei +4 °C.

3.6.4. 16 S rRNA-Ribotypisierung

Das Prinzip der 16 S rRNA-Ribotypisierung beruht auf der Bindung (Hybridisierung) einzelsträngiger, Digoxigenin-markierter Nukleinsäuresonden an komplementäre Abschnitte der an eine positiv geladene Nylonmembran gebundenen DNS mit anschließender Sichtbarmachung gebundener Sonde mittels Antikörperbindung und Chemilumineszenz. Die wie unter 3.6.3. beschrieben behandelte Membran wurde in einem Hybridisierungsröhrchen (Hybaid, Heidelberg) nach Zugabe der Prähybridisierungslösung für eine Stunde bei 68 °C rotierend im Hybridisierungsöfen (Hybaid, Heidelberg) inkubiert. Die Hybridisierungslösung wurde nach Ablauf dieser Zeit zur Hitzedenaturierung der enthaltenden DNS-Sonde 10 min bei 95 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend sofort für 3 min auf Eis heruntergekühlt, um das Wiederverbinden der DNS-Stränge zu verhindern. Nach Austausch der Prähybridisierungslösung gegen die Hybridisierungslösung erfolgte die Inkubation der Membran bei 68 °C

rotierend über Nacht. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung zurückgewonnen und durch Waschpuffer 1 ersetzt. Die folgenden, jeweils doppelt durchgeführten Waschschriffe mit Waschpuffer 1 (à 5 min; Raumtemperatur (RT), rotierend im Hybridisierungsöfen) und Waschpuffer 2 (à 15 min, 68 °C, rotierend im Hybridisierungsöfen) dienen der Entfernung überschüssiger Sonde, weitere Inkubationsschritte dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen des Antikörperkonjugates. Unter Verwendung von Puffer 2 wurde eine 1:10.000 Verdünnung des mit alkalischer Phosphatase konjugierten Anti-Digoxigenin hergestellt und 30 min bei RT rotierend im Hybridisierungsöfen inkubiert. Nach Verwerfen der Lösung wurde überschüssiges Antikörperkonjugat durch erneute Waschschriffe entfernt. Nach Äquilibrieren der Membran in Detektionspuffer wurde eine Mischung aus dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD und Detektionspuffer im Verhältnis 1:1.000 mäanderförmig auf die Membran aufgetropft. Die Membran wurde unter Vermeidung von Lufteinschlüssen zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt und sofort zur Belichtung eines Röntgenfilmes (Roche Diagnostics, Mannheim) mit diesem in eine Röntgenkassette (Heiland GmbH, Leipzig) verbracht. Die Belichtungszeit in der Röntgenkassette variierte in Abhängigkeit von der Stärke der verwendeten Sonde zwischen 5 min und 2 h, in Ausnahmefällen, so im Falle schwacher Hybridisierungssignale, war eine Inkubation über Nacht bei 4 °C vonnöten. In Kapitel 8.5 des Anhangs ist eine tabellarische Übersicht des beschriebenen Protokolls beigefügt.

3.6.5. Entwicklung des belichteten Röntgenfilmes

Die Entwicklung des belichteten Röntgenfilmes erfolgte in einer Dunkelkammer unter Verwendung von Entwickler- und Fixierlösung (PMA Bode, Hamburg) Nach dreiminütigem Schwenken des Filmes in der Entwicklungslösung wurde dieser zur Vermeidung eines Eintragens des Entwicklers in die Fixierlösung gewässert. Es folgte die Fixierung des Filmes durch Schwenken in der entsprechenden Lösung und erneutes Wässern zur Entfernung der Reste der Chemikalien.

3.6.6. Aufreinigen der Membran

Nach Abschluss der Ribotypisierung wurde die gebundene Sonde von der Membran entfernt, um gegebenenfalls gegen eine zweite Sonde hybridisieren zu können. Nach Entfernen der Klarsichtfolie und Verbringen der Membran in ein Hybridisierungsröhrchen erfolgte ein einminütiger Waschschriff mit 2 x SSC. Nach Verwerfen der Lösung und Zugabe von „Stripping buffer“ folgte die Inkubation bei 37 °C rotierend im Ofen für zweimal 15 min. Reste des „Stripping buffers“ wurden durch einen erneuten Waschvorgang mit 2 x SSC für 2-3 min entfernt. Die Membran wurde zwischen zwei Lagen Whatman-Papier bei +4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.6.7. Auswertung der 16 S rRNA-Ribotypisierung

Die Auswertung der 16 s rRNA-Ribotypisierung hinsichtlich der genetischen Ähnlichkeit der porcinen *P. multocida*-Isolate erfolgte unter Verwendung der BioNumerics Software Version 4.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien). Hierzu wurden die digitalisierten Bilder der belichteten Röntgenfilme mit Hilfe des Programms auf Basis eines Referenzmarkers (1 kb Marker, Invitrogen, Darmstadt) normalisiert und die Ähnlichkeiten der festgestellten Bandenmuster über den Dice-Koeffizienten berechnet, welcher auf An- resp. Abwesenheit einer Bande und der Abstände der Banden zueinander, nicht aber auf deren Intensität beruht. Die grafische Darstellung erfolgte durch Erstellung eines Dendrogrammes nach der unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA) bei einer Optimierung von 0,8 und einer Positionstoleranz von 1,25.

3.7. Multilokus Sequenztypisierung (MLST)

Nach Abschluss der genannten Untersuchungen wurden 52 der 382 porcinen *P. multocida* nach dem 2010 von Subaaharan et al. veröffentlichten MLST-Schema (279) charakterisiert, wobei auf die angegebenen Primer sowie Reaktionsbedingungen zurückgegriffen wurde (Tab. 13). Für die Amplifikation der jeweiligen Housekeeping-Gene wurden 60 µl-Ansätze folgender Zusammensetzung genutzt:

PCR-Puffer (10x)	6,0 µl
MgCl ₂ (50 mM)	3,4 µl
dNTPs (10 mM)	0,4 µl
je Primer (10 pmol/µl)	1,0 µl
Taq DNA-Polymerase	0,1 µl
A. bidest.	44,1 µl
Proben-DNS	4,0 µl

Die Auswahl der Stämme wurde anhand der verfügbaren und erhobenen Daten so divers wie möglich gewählt, um einen ersten Überblick über die Verteilung der porcinen *P. multocida* zu gewährleisten und die Grundlage für weitere Untersuchungen zu legen (Tab.14). So wurden Isolate aller detektierten Kapseltypen (A, D, F) sowie die beiden kapselnegativen *P. multocida* mit dieser Methode typisiert. Isolate klinisch kranker sowie klinisch gesunder Tiere sowie *P. multocida* des oberen und unteren Respirationstraktes wurden eingeschlossen. Auch wurde auf die Verteilung der virulenzassoziierten Gene *toxA*, *pfhaB* und *hgbB* geachtet.

Die Qualität des Amplifikates wurde durch eine Agarosegelelektrophorese von 4 µl des PCR-Ansatzes nach Zusatz von 2 µl Ladepuffer überprüft. Proben, bei denen Einzelbanden hoher

Intensität nachweisbar waren, wurden zur Sequenzanalyse zu LGC Genomics (Berlin) übersandt. Die Bearbeitung und Auswertung der erhaltenen Sequenzdaten erfolgte mit Ridom Seqsphere (<http://www3.ridom.de/seqsphere/>) unter Beachtung der online verfügbaren MLST-Daten (http://pubmlst.org/p_multocida_rirdc/).

3.7.1. Darstellung der MLST-Daten in Minimum-Spanning-Tree (MSTree)

Ein MSTree ist eine Möglichkeit zur graphischen Darstellung der durch die MLST ermittelten Allelprofile (304). Mit Hilfe geeigneter Software (BioNumerics Version 4.6, Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien) wurden die in dieser Studie ermittelten, die Sequenztypen (STs) bildenden Allelprofile in Form eines Minimum-Spanning-Tree (MSTree) abgebildet, wobei die Größe der STs mit der Anzahl enthaltener Isolate zunimmt. Die Beziehungen (Distanzen) zwischen einzelnen STs und ST-Komplexen, die auf die Anzahl unterschiedlicher Alleltypen zurückgehen, werden durch Linien unterschiedlicher Dicke und Länge dargestellt. Sequenztypkomplexe, bestehend aus STs, welche sich in nur einem Allel unterscheiden, werden grau hinterlegt angezeigt.

3.8. Statistische Auswertung

Die in der Arbeit vorgenommenen statistischen Auswertungen zu statistisch signifikanten Beziehungen wurden mit der SPSS Software (Version 17; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) unter Verwendung des Vierfeldertests und des Chi-Quadrat-Tests durchgeführt.

Tab. 13 Übersicht der für die MLST genutzten Primer sowie der Reaktionsbedingungen nach Subaaharan et al. (2010)

Primer	Oligonukleotidprimer-Sequenz (5' - 3')	Gen	Länge des Amplifikates (bp)	PCR-Bedingungen (°C/s)			Referenz
				Denaturierung	Annealing	Elongation	
adk f/r	TTTTTCGTCCTAAGC/GGGGAAAGGGACACAAGC	Adenylatkinase	570	94/30	48/30	72/60	(279)
est f/r	TCTGGCAAAAGATGTGTTCG/CCAAATCTTGGTTGG	Esterase	641	94/30	48/30	72/60	
pmi f/r	TGCCTTGAGACAGGGTAAGC/GCCCTTAACAAGTCCCATTCC	Mannose-6-Phosphat-Isomerase	739	94/30	48/30	72/60	
zwf-2 f/r	TGTTAGGTGTGGCAAGAACG/TTGCAACAATGGTTTTTGGGA	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	614	94/30	48/30	72/60	
mdh f/r	ATTTCCGGATCAGGGTTAGC/GGAAAACCCGGTAATGGAAGG	Malat-Dehydrogenase	620	94/30	48/30	72/60	
gdh f/r	ACCACGCTATTTTTGGTTGC/ATGGCACAACCTCTTTTCACC	Glutamat-Dehydrogenase	702	94/30	58/30	72/60	
pgi f/r	TGTTAGGTGTGGCAAGAACG/TTGCAACAATGGTTTTTGGGA	Phospho-Glukose-Isomerase	784	94/30	48/30	72/60	

Tab. 14 Auflistung der mit Hilfe der MLST untersuchten porcinen *P. multocida*-Isolate

IMT-Nr.	Gesundheitsstatus	Anatomische Lokalisation	Kapseltyp	<i>toxA</i>	<i>pfhaB</i>	<i>hgbB</i>	Ribotypmuster
IMT1770	Klinisch krank	Ohne Angabe	D	+	-	+	IA-1
IMT4768	Klinisch krank	Ohne Angabe	A	+	-	+	IA-1
IMT10923	Klinisch gesund	uRT	D	-	-	+	IA-1
IMT10937	Klinisch gesund	oRT	D	-	-	+	IA-1
IMT10938	Klinisch gesund	oRT	D	-	-	+	IA-1
IMT10972	Klinisch gesund	oRT	D	-	-	+	IA-1
IMT10991	Klinisch krank	uRT	D	+	-	+	IA-1
IMT10997	Klinisch gesund	oRT	D	-	-	+	IA-1
IMT11029	Klinisch krank	oRT	A	+	-	+	IA-1
IMT11061	Klinisch krank	oRT	D	-	-	+	IA-1
IMT11101	Klinisch krank	oRT	D	-	-	+	IA-1
IMT11112	Klinisch krank	uRT	A	+	-	+	IA-1
IMT11160	Klinisch gesund	uRT	D	-	-	+	IA-1
IMT11301	Klinisch krank	uRT	D	+	-	+	IA-1
IMT11670	Klinisch gesund	oRT	D	-	-	+	IA-1
IMT11676	Klinisch krank	uRT	A	-	+	-	IA-1
IMT11685	Klinisch gesund	oRT	A	-	+	-	IA-1
IMT11686	Klinisch gesund	oRT	A	-	+	-	IA-1
IMT11951	Ohne Angabe	oRT	D	+		+	IA-1
IMT10948	Klinisch gesund	oRT	D	-	-	+	IA-2
IMT11028	Klinisch krank	oRT	A	+	-	+	IA-3
IMT11043	Klinisch gesund	oRT	D	-	-	+	IA-3
IMT11147	Klinisch krank	oRT	D	-	-	+	IA-4
IMT11269	Klinisch krank	uRT	neg	-	-	+	IA-5
IMT11400	Klinisch gesund	oRT	neg	-	-	+	IA-5
IMT11047	Klinisch krank	uRT	A	-	-	+	IA-6
IMT11068	Klinisch krank	oRT	A	-	+	-	IA-7
IMT11268	Klinisch krank	uRT	D	-	-	+	IA-7
IMT11288	Klinisch krank	uRT	A	-	-	+	IA-7
IMT11306	Klinisch krank	uRT	A	-	+	-	IA-7
IMT11353	Klinisch krank	uRT	A	-	-	+	IA-7
IMT11512	Klinisch gesund	oRT	A	-	-	+	IA-7
IMT11528	Klinisch krank	uRT	D	+	-	+	IA-7
IMT11529	Klinisch krank	uRT	A	-	+	+	IA-7
IMT11679	Klinisch krank	uRT	A	-	-	+	IA-8
IMT10952	Klinisch gesund	oRT	A	-	-	+	IA-9

IMT-Nr.	Gesundheitsstatus	Anatomische Lokalisation	Kapseltyp	<i>toxA</i>	<i>pfhaB</i>	<i>hgbB</i>	Ribotypmuster
IMT11031	ohne Angabe	oRT	D	-	-	+	IB-1
IMT10817	Ohne Angabe	uRT	A	-	+	-	IIA-1
IMT10818	Ohne Angabe	uRT	A	-	+	-	IIA-1
IMT10946	Klinisch gesund	oRT	A	-	+	+	IIA-1
IMT11001	Klinisch gesund	oRT	A	-	+	+	IIA-1
IMT11004	Klinisch gesund	oRT	D	-	-	+	IIA-1
IMT11299	Klinisch krank	uRT	A	-	+	-	IIA-1
IMT11302	Klinisch krank	uRT	A	-	+	-	IIA-1
IMT11307	Klinisch krank	uRT	D	-	-	+	IIA-1
IMT11308	Klinisch krank	uRT	D	-	-	+	IIA-1
IMT11526	Klinisch krank	uRT	A	-	+	+	IIA-1
IMT11910	Klinisch gesund	oRT	A	-	+	-	IIA-1
IMT10950	Klinisch gesund	oRT	A	-	+	-	IIA-2
IMT11113	Klinisch krank	uRT	A	-	+	+	IIA-3
IMT11120	Klinisch krank	uRT	A	-	+	+	IIA-3
IMT11182	Klinisch krank	uRT	F	-	+	+	IIA-3

+: PCR positiv; -: PCR negativ

4. ERGEBNISSE

4.1. Ergebnisse der Multiplex-PCR-Untersuchungen

4.1.1. Genotypische Identifizierung von *P. multocida*

Durch den Nachweis der speziesspezifischen Gensequenz *kmt1* (457 bp) wurden die kultur- und zellmorphologisch verdächtigen Kolonien nach Durchführung von Cytochromoxidase- und Katalasetest als *P. multocida* bestätigt. Ein Amplifikat der entsprechenden Größe konnte bei allen 382 Feldisolaten sowie den als Kontrollen mitgeführten Referenzstämmen NCTC10322 und ATCC12948 generiert werden.

4.1.2. Nachweis virulenzassoziierter Gene

4.1.2.1. Nachweis von Kapseltypen, Vorkommen in Isolaten des oberen und unteren RT sowie in Abhängigkeit zu anamnestischen Informationen

Der Nachweis der Kapseltypen erfolgte mittels Multiplex-PCRs (s. Abb.2, Kap. 3.5.2) und resultierte bei 380 der 382 untersuchten Isolate in der Amplifikation einer Bande, deren Größe mit dem Amplifikat eines der mitgeführten Referenzstämmes des Kapseltyps A (1.044 bp), D (657 bp) oder F (851 bp) korrespondierte. Es konnte bei 206 (53,9 %) Isolaten der Kapseltyp A, bei 173 (45,3 %) Kapseltyp D und bei einem Isolat (0,3 %) Kapseltyp F nachgewiesen werden (Tab. 15).

Zwei Isolate konnten weder den drei genannten Kapseltypen noch in den anschließend durchgeführten Einzel-PCR-Protokollen den Kapseltypen B oder E zugeordnet werden. Diese Isolate wurden genotypisch durch den Nachweis des *kmt1* als *P. multocida* bestätigt und als kapselnegativ (*cap*-negativ) angesprochen, wobei diese Isolate tatsächlich kapselnegativ, schwer typisierbare *capA*-Isolate oder neue Kapseltypen darstellen können.

Der Nachweis des außerhalb des bekannten Kapselbiosynthese-Lokus gelegenen, für die Heparosansynthese 2 kodierenden Gens *hssB* gelang bei 364 (95,3 %) der untersuchten Isolate.

Die aus dem oRT isolierten *P. multocida*-Stämme (n = 205) konnten zu 59,5 % dem Kapseltyp D zugeordnet werden. Vergleichsweise seltener wurden Stämme des Kapseltyps A aus dem oRT isoliert, während diese mit 68,8 % bei den aus dem uRT isolierten Stämmen überwogen; dort stellten Stämme des Kapseltyps D lediglich 29,9 % der Isolate (Tab. 15).

Vorberichtliche Informationen zum Krankheitsstatus der Wirtstiere konnten für 358 Stämme ermittelt werden. Die untersuchte Population verteilte sich auf $n = 188$ *P. multocida* aus klinisch erkrankten sowie $n = 170$ *P. multocida* aus klinisch gesunden Tieren. Soweit Informationen zum Krankheitsstatus der Wirtstiere vorlagen, überwog bei erkrankten Tieren die Anzahl der Kapseltyp A-positiven Stämme (60,6 %) die der *capD*-positiven Stämme (38,3 %). Ein statistisch signifikanter Unterschied zur Verteilung der Kapseltypen bei aus klinisch gesunden Tieren isolierten *P. multocida* (44,4 % *capA*; 55,0 % *capD*) konnte nicht festgestellt werden.

Die Verteilung der mit Pneumonie (63,9 % *capA*) resp. RA (76,0 % *capD*) assoziierten Kapseltypen spiegelte die Verteilung der Kapseltypen im uRT (68,8% *capA*) resp. oRT (59,5% *capD*) wider. Das dem Kapseltyp F zugehörige Isolat wurde aus dem Lungengewebe eines an Bronchopneumonie erkrankten Schweins angezüchtet.

Abb. 2 Elektropherogramm zur exemplarischen Darstellung der Multiplex-PCR 1 und 2

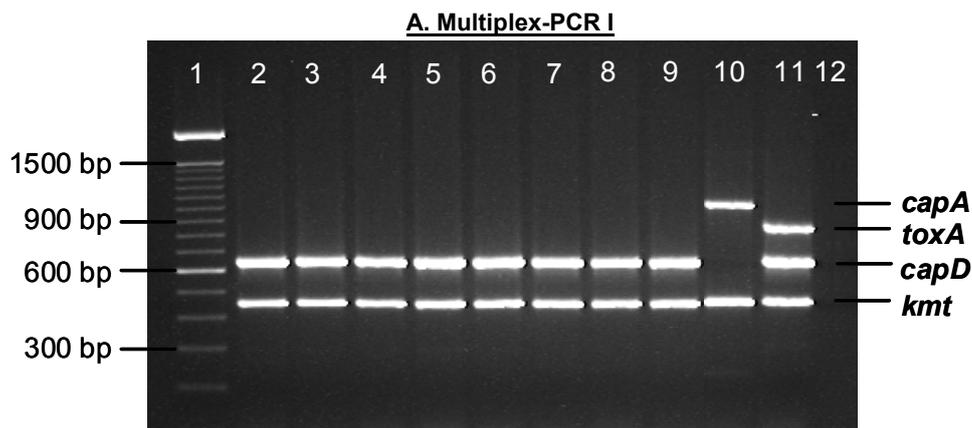


Abb.2A: 100 bp DNS-Marker (Invitrogen, Darmstadt), 2-9: *P. multocida*-Feldisolate IMT10998; IMT11024; IMT11070; IMT11158; IMT11299; IMT11360; IMT11410; IMT11691; 10: NCTC10322; 11: ATCC12948, 12: Negativkontrolle

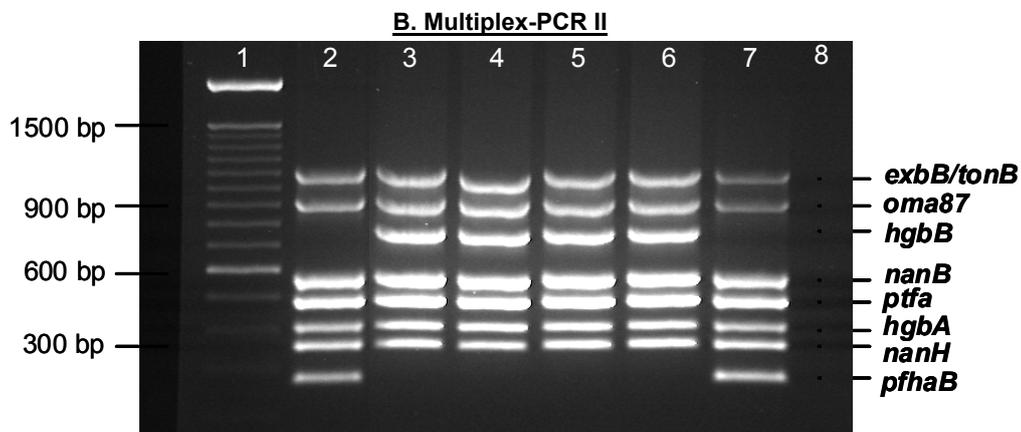


Abb.2B: 1: 100 bp DNS-Marker (Invitrogen, Darmstadt), 2-5: *P. multocida*-Feldisolate IMT11348; IMT11040; IMT11266; IMT11510; 6: ATCC12948; 7: NCTC10322; 8: Negativkontrolle

Tab. 15 Nachweis virulenzassoziierter Gene bei 382 *P. multocida*-Isolaten und Verteilung in Relation zu anamnestischen Informationen
Anzahl (n) bzw. Prozent (%) an positiven Stämmen für das entsprechende Gen resp. Genkombination

	<i>capA</i>		<i>capD</i>		<i>capF</i>		<i>cap-neg.</i>		<i>toxA</i>		<i>pfhaB</i>		<i>hgbB</i>		<i>pfhaB & hgbB</i>		<i>hssB</i>	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Stämme gesamt (n = 382)	206	53,9	173	45,3	1	0,3	2	0,5	13	3,4	78	20,4	324	84,8	21	5,5	364	95,3
Anatomische Lokalisation																		
oRT (n = 205)	82	40,0	122 ^a	59,5 ^a	0	0	1	0,5	5	2,4	31	15,1	186 ^a	90,7 ^a	12	5,8	191	93,2
uRT (n = 157)	108 ^a	68,8 ^a	47	29,9	1	0,6	1	0,6	5	3,2	44	28,0	121	77,1	9	5,7	153	97,5
unbekannt (n = 20)	16	80,0	4	20,0	0	0	0	0	3	15,0	3	15,0	17	85,0	0	0	20	100
Krankheitsstatus																		
Klinisch gesund (n = 170)	75	44,1	94 ^a	55,3 ^a	0	0	1	0,6	0	0	26	15,4	154	91,1	10	5,9	159	93,5
Klinisch krank (n = 188)	114	60,6	72	38,3	1	0,5	1	0,5	10	5,3	42	22,2	154	81,5	8	4,2	185	98,4
Pneumonie (n = 155)	99	63,9	54	34,8	1	0,6	1	0,6	6	3,9	37	23,9	125	80,6	7	4,5	155	100
PAR (n = 25)	6	24,0	19	76,0	0	0	0	0	4	16,0	2	8,0	23	92,0	0	0	22	88,0
Andere/unbekannt (n = 33)	24	72,7	9	27,3	0	0	0	0	3	9,1	13	39,4	22	66,7	4	12,1	29	87,9

oRT = oberer Respirationstrakt; uRT = unterer Respirationstrakt; PAR = Progressive Atrophische Rhinitis

Statistisch signifikante Assoziationen (p<0.001) sind durch ein ^a gekennzeichnet.

4.1.2.2. Nachweis virulenzassoziierter Gene, Verteilung im oberen und unteren RT sowie in Abhängigkeit zu anamnestischen Informationen

Ebenfalls durch die verwendeten Multiplex-PCR-Protokolle abgedeckt wurde der Nachweis von zehn VAG, die für fimbriale sowie nicht-fimbriale Adhäsine, Eisenakquirierungssysteme, oberflächenassoziierte Proteine oder Toxine kodieren (s.a. Kap. 2.1.5 und Kap. 3.5.2). Die Überprüfung der in der PCR erhaltenen Ergebnisse erfolgte anschließend mittels Dot-Blot-Hybridisierung unter Verwendung spezifischer Oligonukleotid-Sonden.

Die Amplifikation entsprechender Genfragmente gelang für *exbB/tonB* (1144 bp), *oma87* (949 bp), *nanB* (585 bp), *nanH* (361 bp), *hgbA* (420 bp) und *ptfA* (500 bp) bei allen 382 Isolaten. Das für das Transferrin-bindende Protein kodierende Gen *tbpA* konnte bei keinem der untersuchten Isolate nachgewiesen werden. Unterschiede in der Verteilung einzelner Gene bei den untersuchten porcinen *P. multocida*-Isolaten konnten bei den VAG *toxA*, *pfhaB* sowie *hgbB* nachgewiesen werden (Tab.15, 16).

Das für das Dermonekrotoxin kodierende Gen *toxA* konnte in 13 (3,4 %) der untersuchten Stämme nachgewiesen werden. Für zehn dieser toxinpositiven Isolate war anamnestisch die Isolierung aus klinisch erkrankten Tieren mit Pneumonie-assoziierten Symptomen (n = 5), Symptomen der PAR (n = 4) bzw. der allgemeinen Angabe „klinisch krank“ (n = 1) bekannt. Somit konnten bei 16 % der mit PAR-Symptomatik beschriebenen Tiere *toxA*-positive *P. multocida* nachgewiesen werden, der Anteil bei den an Pneumonie erkrankten Tieren lag bei 3,2 %. Jeweils fünf *toxA*-positive *P. multocida* konnten dem oberen und unteren RT zugeordnet werden, was einer relativen Anzahl von 2,4 % resp. 3,2 % entspricht. Das Gen konnte sowohl bei Stämmen des Kapseltyps A (n = 5; 2,5 %) als auch des Kapseltyps D (n = 8; 4,6 %) gezeigt werden. Eine signifikante negative Assoziation dieses Gens besteht zum Vorbericht klinisch gesund ($p < 0,001$).

In 20,4 % (n = 78) der *P. multocida* war das für das *Pasteurella* filamentöse Hämagglutinin kodierende Gen *pfhaB* vorhanden. Die Verteilung dieses Gens in Relation zur Organlokalisation und klinischem Vorbericht stellte sich auffällig, wenn auch ohne statistische Signifikanz dar. Von den Isolaten aus dem uRT waren 28 %, von denen des oRT 15,1 % Träger des *pfhaB*, während 22,2 % der Isolate klinisch kranker und 15,4 % der Isolate klinisch gesunder Tiere das Gen aufwiesen. Die aus Pneumonie-assoziierten Veränderungen isolierten *P. multocida* waren zu 23,9 % *pfhaB*-positiv, hingegen konnte nur bei 8 % der mit PAR assoziierten Stämme das Gen gezeigt werden. Die *pfhaB*-positiven Isolate stellten sich statistisch signifikant mit Kapseltyp A assoziiert dar; 98,7 % (n = 77) wurden diesem Kapseltyp zugeordnet ($p < 0,001$), während nur das Kapseltyp F-Isolat als weiterer Träger dieses Gens identifiziert wurde.

Das für das Hämagglutinin-bindende Protein kodierende Gen *hgbB* konnte in 81,2 % (n = 310) der untersuchten Stämme per PCR nachgewiesen werden. Die zur Validierung der PCR-Ergebnisse durchgeführten Dot-Blot-Analysen aller 382 *P. multocida* mit spezifisch hergestellten DNS-Sonden konnten keine zusätzlichen positiven Stämme für *tbpA*, *toxA* und *pfhaB* identifizieren, jedoch 14 Stämme als *hgbB*-positiv erkennen, die in der PCR falsch negativ reagiert hatten, so dass sich die Gesamtzahl *hgbB*-positiver Stämme auf 324 (84,8 %) erhöhte. Dieses in der untersuchten Population weit verbreitete Gen stellte sich mit 90,7 % signifikant ($p < 0,001$) an den oRT assoziiert dar; Stämme des uRT wiesen das Gen zu 77,1 % auf. Die Verteilung des Gens in Isolaten klinisch gesunder und klinisch kranker Tiere stellte sich mit 91,1 % resp. 81,5 % dar. Im Hinblick auf die Kapseltypen ließ sich eine signifikante Assoziation des *hgbB* mit *capD* erkennen ($p < 0,001$). Während alle zum Kapseltyp D gehörigen *P. multocida*-Stämme der Untersuchung *hgbB*-positiv reagierten, konnte das Gen lediglich bei 71,6 % der Kapseltyp A-Stämme gezeigt werden.

Die Kombination der beiden Gene *toxA* und *hgbB* trat in 100 % der untersuchten toxinpositiven Stämme auf, während die Kombination von *toxA* und *pfhaB* bei keinem Isolat zu beobachten war. Die Kombination der Gene *pfhaB* und *hgbB* konnte in 21 der 78 *pfhaB*-positiven Stämme (26,9 %) gezeigt werden. Darunter befanden sich neun Stämme des uRT, von denen wiederum acht Stämme von klinisch erkrankten Tieren stammten ($p < 0,001$).

Einen Überblick über die 12 festgestellten Virulenzgenmuster unter Berücksichtigung der Kapseltypen (*capA*, *capD*, *capF*, *cap-neg*, *hssB*) sowie der VAG *toxA*, *hgbB* und *pfhaB* bietet Tab. 16. Die bei allen Isolaten (*exbB/tonB*; *oma87*; *hgbA*; *nanH*, *nanB*, *ptfA*) bzw. keinem Isolat (*tbpA*) nachweisbaren Gene wurden zum Zwecke der Übersichtlichkeit nicht aufgeführt.

Tab. 16 Übersicht über die bei 382 untersuchten porcinen *P. multocida* auftretenden Virulenzgenmuster

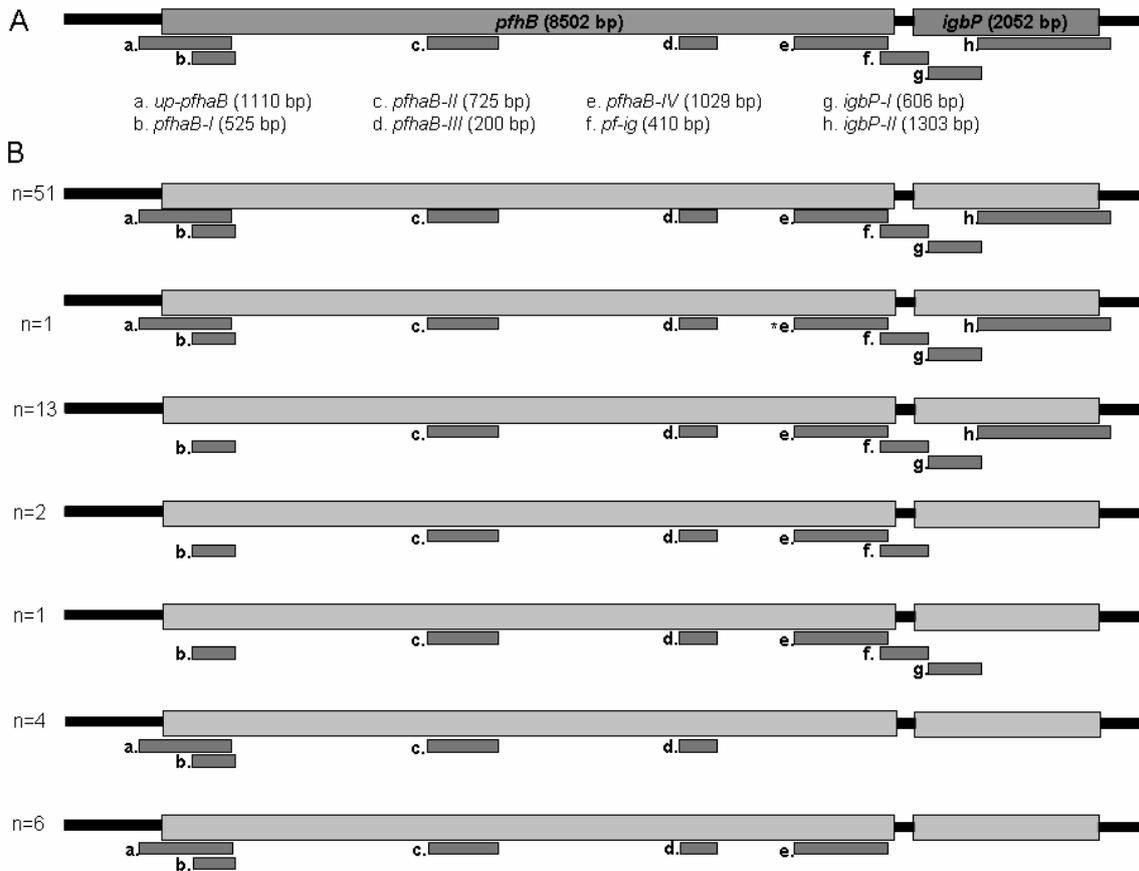
Isolate		Virulenz-assoziierte Gene							
n	%	<i>capA</i>	<i>capD</i>	<i>capF</i>	cap-neg	<i>hssB</i>	<i>toxA</i>	<i>pfhaB</i>	<i>hgbB</i>
1	0,2	+	-	-	-	-	-	-	-
1	0,2	+	-	-	-	-	-	-	+
122	31,9	+	-	-	-	+	-	-	+
1	0,2	+	-	-	-	-	-	+	-
56	14,7	+	-	-	-	+	-	+	-
20	4,9	+	-	-	-	+	-	+	+
5	1,3	+	-	-	-	+	+	-	+
15	3,9	-	+	-	-	-	-	-	+
150	39,3	-	+	-	-	+	-	-	+
8	2,1	-	+	-	-	+	+	-	+
1	0,2	-	-	+	-	+	-	+	+
2	0,5	-	-	-	+	+	-	-	+

4.1.3. *Pasteurella filamentöses Hämagglutinin (pfhaB)*

PfhaB, welches für ein nicht-fimbrienassoziiertes Adhäsion kodiert und als putativ serumresistenzvermittelnd beschrieben ist, konnte bei 78 Stämmen (20,4 %) durch spezifische Amplifikation eines 275 bp großen Genfragmentes per PCR nachgewiesen werden. *PfhaB* wurde sowohl bei Isolaten aus dem oberen (n = 31) als auch bei Isolaten aus dem unteren (n = 44) Respirationstrakt gezeigt und war sowohl bei Stämmen aus klinisch gesunden (n = 26) als auch klinisch kranken (n = 42) Tieren zu finden. Obwohl statistisch nicht signifikant, konnte es mit 56,4 % häufiger bei Infektionen des uRT und mit 53,8 % häufiger bei Isolaten klinisch erkrankter Tiere nachgewiesen werden. Demgegenüber steht der Nachweis des Genfragmentes bei 39,7 % der Isolate des oRT bzw. 33,3 % der Stämme klinisch gesunder Schweine. Aufgrund der von der starken Ähnlichkeit zum immunogenen *B. bronchiseptica*-Protein FhaB abgeleiteten potentiellen Nutzung des PfhaB als Impfantigen erfolgte eine erste weiterführende Charakterisierung des Gens durch die Amplifikation verschiedener Fragmente der *pfhaB*-Gensequenz sowie des sich anschließenden, für das putativ Immunglobulin-bindende Protein kodierende Gen *igbP* unter Verwendung der öffentlich zugänglichen DNS-Sequenz AY035342 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY035342>). Die Amplifikation von insgesamt acht Fragmenten unterschiedlicher Größe, vier innerhalb des Gens *pfhaB*, zwei innerhalb des Gens *igbP*, sowie zwei Fragmenten, welche *pfhaB* up- resp. downstream flankieren, gingen in die Untersuchung ein (s.a. Kap. 3.5.4, Abb. 3, Abb. 4). Sieben unterschiedliche Muster konnten bei den untersuchten Stämmen auf der Basis der amplifizierten Einzelfragmente festgestellt werden (Abb.3B), wobei die als *pfhaB-I*, *pfhaB-II* sowie *pfhaB-III* bezeichneten Fragmente bei allen Mustern nachweisbar waren. Unterschiede waren in der Verteilung der Fragmente *up-pfhaB*, *pfhaB-IV*, *pf-ig*, *igbP-I* und *igbP-II* zu beobachten. Diese gehen möglicherweise auf Sequenzvariabilitäten zurück, welche auch beim Vergleich der online verfügbaren *pfhaB*-Sequenzdaten mit den Accession-Nummern AF237929, AY035342 und AE004439 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) nachweisbar sind. Bemerkenswert ist auch die Amplifikation eines verkürzten *pfhaB-IV*-Fragmentes, welches statt der erwarteten 1.029 bp nur ca. 600 bp umfasste.

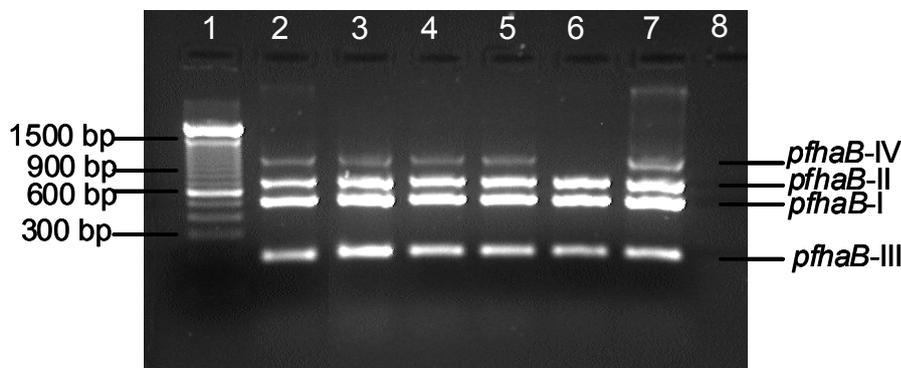
Neben den in der Multiplex 2-PCR *pfhaB*-positiv reagierenden Isolaten (n = 78) wurden auch die *pfhaB*-negativen Stämme mit diesen weiterführenden Protokollen untersucht. Bei keinem dieser 304 Stämme konnte eines der *pfhaB*-Genfragmente, der *pfhaB*-flankierenden Fragmenten resp. der Fragmente des *igbP* amplifiziert werden.

Abb. 3 Schematische Darstellung des *P. multocida* A:3 *pfhaB* sowie *igbP* (Acc.-Nr. AY035342) (A) unter Berücksichtigung von Lage und Länge der amplifizierten Fragmente (a – h) und (B) Darstellung der generierten *pfhaB-igbP*-Fragmentmuster bei 78 *P. multocida*-Isolaten



* Fragment verkürzt

Abb. 4 Elektropherogramm zur exemplarischen Darstellung der *pfhaB*-Multiplex-PCR



1: 100 bp DNS-Marker (Invitrogen, Darmstadt), 2-6: *P. multocida*-Feldisolate IMT10946; IMT11046; IMT11361; IMT11906; IMT11118; 7: NCTC10322; 8: Negativkontrolle

4.2. 16S rRNA-Hybridisierung (Ribotypisierung)

Unter Verwendung einer spezifischen, ca. 1.300 bp des für die 16S rRNA kodierenden Gens umfassenden Oligonukleotid-Sonde konnten bei der Untersuchung der 382 Feldisolate mittels Hybridisierungsstudien Bandenmuster generiert werden, die aus sechs bis acht Banden der Größe zwischen 0,7 und 7,1 kb bestehen. Die beispielhafte Darstellung dieser 13 unterschiedlichen Ribotypen findet sich in Abb. 5. Diese Muster wurden mit Hilfe der Software BioNumerics Version 4.5 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien) hinsichtlich ihrer genetischen Ähnlichkeit ausgewertet und konnten nach Festlegung der cut-off Werte in Hauptcluster (cut-off: 63,1 % Ähnlichkeit), Cluster (cut-off: 65,7 % Ähnlichkeit) sowie Muster (cut-off: 95 % Ähnlichkeit) eingeteilt werden. Die im Rahmen dieser Untersuchung analysierten Feldstämme sowie die drei Referenzstämme NCTC10322, ATCC12948 und P-4679 teilten sich in zwei Hauptcluster (I, II), drei Cluster (IA, IB und IIA) sowie 13 Muster (IA-1 bis IA-9, IB-1, IIA-1 bis IIA-3) auf.

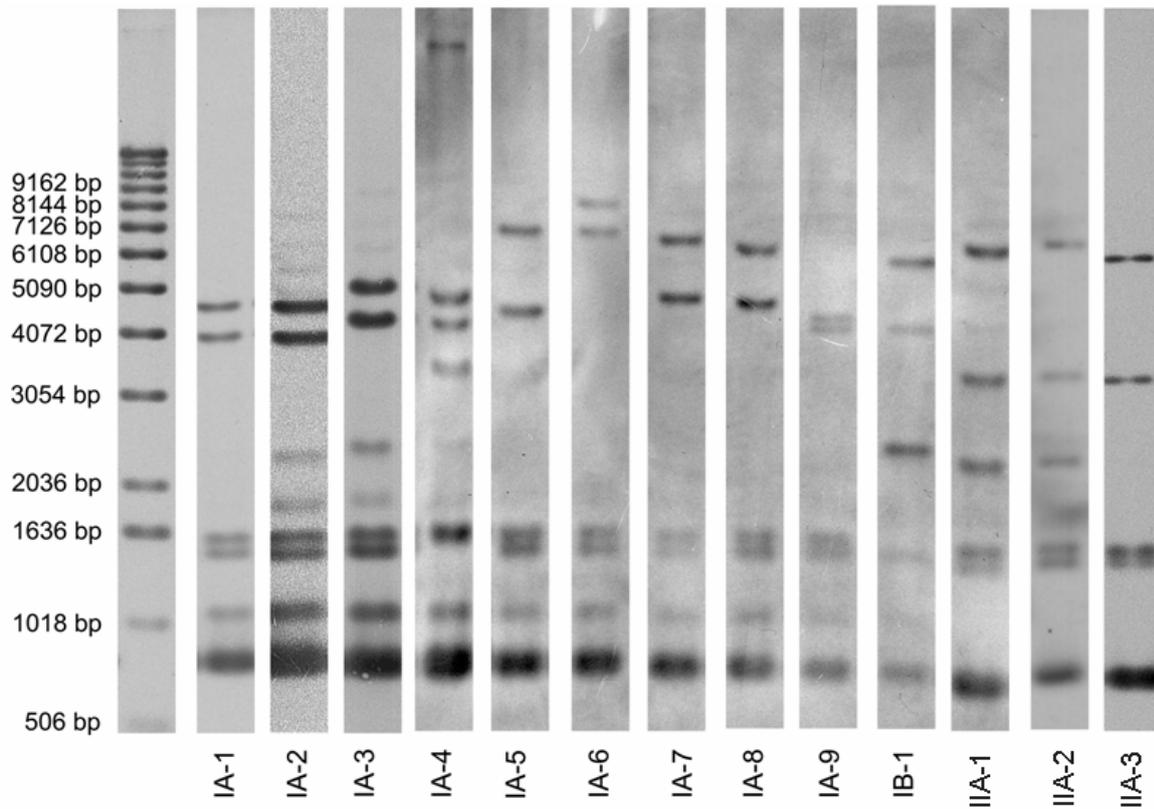
Während Cluster IA 298 Isolate, aufgeteilt auf neun Muster, und damit 78 % der untersuchten Stämme umfasste, wurde Cluster IB lediglich aus einem Kapseltyp D-Isolat des oberen porcinen Respirationstraktes ohne verfügbare anamnestische Angaben gebildet. Hauptcluster II enthielt 83 *P. multocida*-Stämme (21,7 %), die sich in drei Mustern (IIA-1 bis IIA-3) gruppierten (Abb. 6).

Mit 95,8 % konzentrierte sich die überwiegende Mehrheit der untersuchten Isolate in nur drei der insgesamt 13 festgestellten Ribotypmuster. Muster IA-1 enthielt mit 174 Isolaten 45,5 %, Muster IA-7 mit 115 Isolaten 30,1 % und Muster IIA-1 mit 77 Isolaten 20,2 % der betrachteten *P. multocida*. Mit fünf Isolaten aus klinisch gesunden, acht aus klinisch kranken Tieren und drei *P. multocida* ohne vorberichtliche Informationen verteilten sich die verbleibenden 16 Isolate (4,2 %) auf 10 Ribotypmuster.

In 12 der 16 Betriebe, aus denen fünf oder mehr Isolate zur Untersuchung zur Verfügung standen, zeigte sich jeweils ein Ribotypmuster mit mehr als 66 % der untersuchten Isolate als vorherrschend. In zwei weiteren Haltungseinrichtungen stellte je ein Ribotyp mehr als 50 % der untersuchten Stämme.

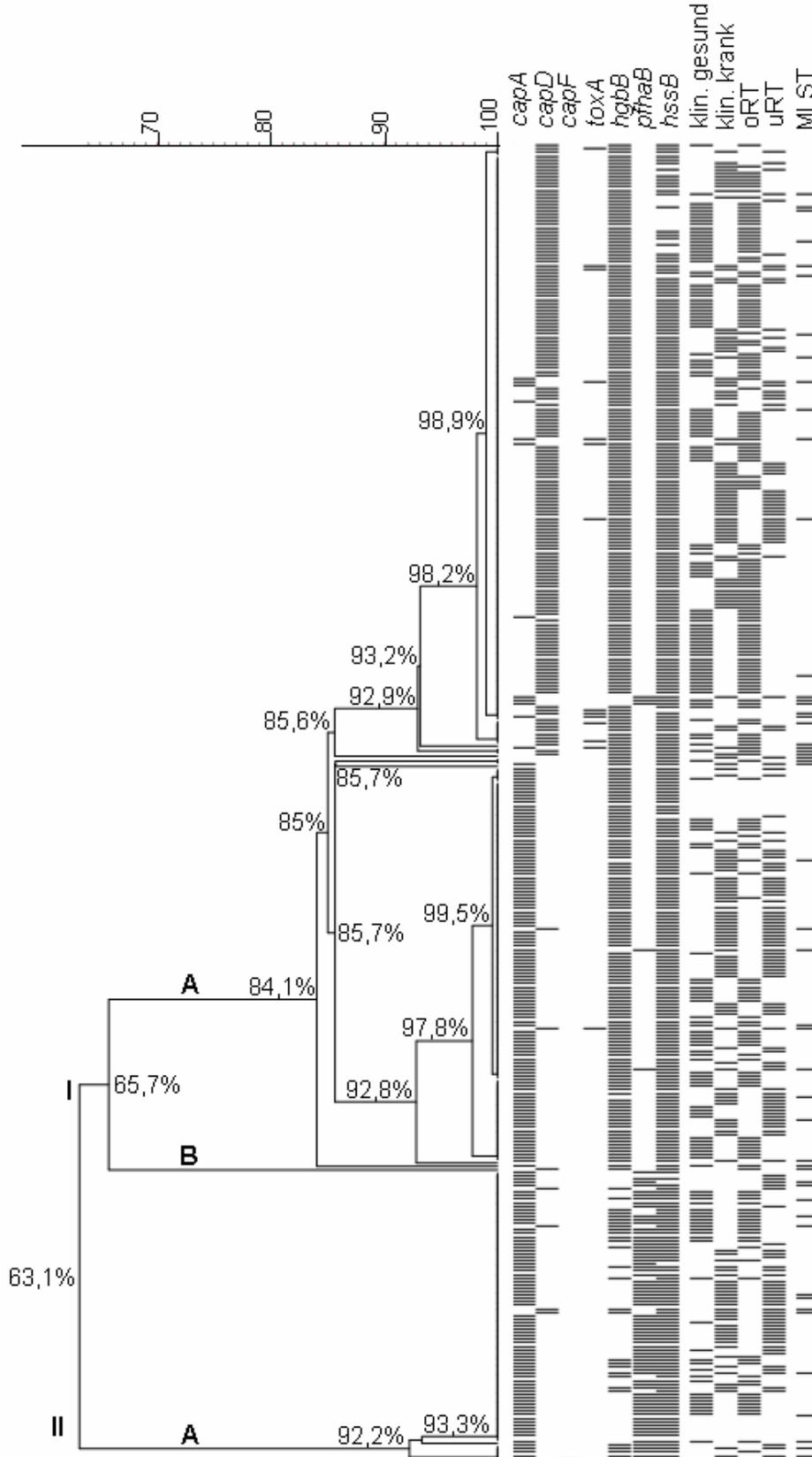
Bei der Betrachtung der Isolate nach ihrer geographischen Herkunft konnten, mit Ausnahme der Isolate aus Sachsen, Isolate aller Bundesländer in unterschiedlichen Ribotypmustern gefunden werden. Die Isolate aus Sachsen (n = 12) stammten sämtlich aus demselben Schweinebetrieb. Signifikante Assoziationen ergaben sich bei den genannten Isolaten aus Sachsen zum Ribotyp IA-1 ($p < 0,001$) sowie zwischen den Isolaten aus Baden-Württemberg und den Ribotypen IA-1 sowie IA-7 ($p < 0,001$), den Isolaten aus Mecklenburg-Vorpommern und IIA-1 ($p = 0,003$) und *P. multocida* aus Nordrhein-Westfalen und IA-1 sowie IA-7 ($p < 0,001$).

Abb. 5 Luminogramm als exemplarische Darstellung der 13 durch *Hpa*II-Verdau und 16S rRNA-Ribotypisierung der 382 *P. multocida*-Isolate identifizierten Ribotypmuster



1: GibcoBRL 1 kb DNA Größenmarker; 2-14: *P. multocida*-Feldisolate: IMT11406; IMT10948; IMT11028; IMT11147; IMT11400; IMT11047; IMT11156; IMT11679; IMT10952; IMT11031; IMT11526; IMT10950 ; IMT11182

Abb. 6 Dendrogramm, basierend auf den bei der Untersuchung von 382 porcinen *P. multocida*-Isolaten beobachteten Hauptcluster I und II, Cluster IA, IB und IIA sowie der 13 Ribotypen. Zusätzlich wurden die Verteilung der VAG und vorberichtliche Informationen dargestellt sowie die in der MLST analysierten Isolate gekennzeichnet.



- PCR positiv

4.2.1. Beziehungen zwischen Ribotypen, VAG, Kapseltypen und verfügbaren anamnestischen Informationen (geographische Herkunft, Krankheitsstatus, anatomische Herkunft)

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden die erhobenen Daten im Hinblick auf eventuelle Assoziationen zwischen den Ribotypen, der Verteilung der betrachteten virulenzassoziierten Gene sowie der verfügbaren Information über die geographische Herkunft, den Krankheitsstatus des Wirtstieres und der anatomischen Herkunft hin untersucht und in Tabelle 17 dargestellt. Von den Ribotypmustern, die mehrere Isolate beinhalten, enthielten alle bis auf eines Isolate klinisch kranker und klinisch gesunder Tiere in vergleichbaren Anteilen. Die Ausnahme, Muster IIA-3, wurde neben drei Isolaten klinisch kranker Tiere durch zwei weitere Stämme ohne vorberichtliche Informationen gebildet. Mit 95,8 % wurde die überwiegende Mehrheit der mit Krankheit assoziierten *P. multocida* den Mustern IA-1 (39,4 %), IA-7 (35,6 %) und IIA-1 (20,7 %) zugeordnet. In diesen Mustern fanden sich auch insgesamt 97 % der Stämme klinisch gesunder Schweine (IA-1: 55,3 %, $p < 0,001$; IA-7: 25,3 %; IIA-1: 16,5 %). Die mit PAR assoziierten Stämme gruppieren sich zu 81,3 % in Muster IA-1 ($p = 0,003$), während Pneumonie-assoziierte Stämme überwiegend in Muster IA-7 (42,2 %; $p < 0,001$) und in absteigender Häufigkeit in den Mustern IA-1 (32,5 %; $p < 0,001$) und IIA-1 (21,4 %) gefunden wurden.

Die Betrachtung der Verteilung der virulenzassoziierten Gene in den Ribotypen erfolgte für die Kapselgene sowie *toxA*, *pfhaB* und *hgbB*, jenen Genen also, in deren Vorkommen sich die untersuchten Isolate unterschieden.

Eine deutliche Assoziation ($p < 0,0001$) konnte zwischen den Ribotypmustern und den Kapseltypen dargestellt werden. Während *capA* positiv an die beiden Ribotypen IA-7 (98,3%) und IIA-1 (94,8%) assoziiert ist, weist *capD* eine positive Assoziation an IA-1 (93,7%) auf. Die zwei kapselnegativen Isolate bildeten gemeinsam die einzigen Vertreter von IA-5, während der dem Kapseltyp F zugehörige Stamm gemeinsam mit vier Kapseltyp A-Isolaten im Ribotypmuster IIA-3 zu finden war.

Analog wurden 93,6 % ($n = 73$) der *pfhaB*-positiven Stämme in Hauptcluster II, vorrangig ($n = 67$) im aus insgesamt 77 *P. multocida* gebildeten Muster IIA-1 gefunden ($p < 0,001$). Die übrigen *pfhaB*-positiven Stämme verteilten sich auf die Muster IA-1 ($n = 3$), IA-7 ($n = 2$), IIA-2 ($n = 1$) sowie IIA-3 ($n = 5$).

Die Verteilung des für das Hämagglutinin-bindende Protein B kodierenden Gens *hgbB* über 12 der 13 Ribotypmuster stellte sich gegenläufig zur Verteilung der *pfhaB*-positiven Stämme dar. So repräsentierten die *hgbB*-positiven Stämme nur 34,9 % ($n = 29$) der in Hauptcluster II zusammengefassten 83 Isolate, während 98,4 % ($n = 299$) der in Hauptcluster I enthaltenen *P. multocida* als *hgbB*-positiv charakterisiert wurden ($p < 0,001$).

Die mit 13 sehr geringe Anzahl *toxA*-positiver *P. multocida* ließ keine signifikanten Assoziationen erkennen. Muster IA-1 umfasste 84,7 % (n = 11) der *toxA*-positiven Stämme. Die beiden übrigen *toxA*-positiven Isolate fanden sich in Muster IA-3 (n = 1) sowie IA-7 (n = 1). Aus zwei Betrieben konnten mit zwei resp. drei toxinpositiven *P. multocida* mehrere Isolate untersucht werden. Während das Virulenzgenmuster der Stämme aus einem Betrieb untereinander identisch waren, konnten zwei der drei toxinpositiven Isolate aus demselben Betrieb dem Ribotypmuster IA-1 zugeordnet werden, das dritte Isolat wies jedoch ein abweichendes Bandenmuster auf und ordnete sich dem Ribotyp IA-3 zu.

Aus Geweben des oberen Respirationstraktes isolierte Stämme fanden sich in 11 der 13 Ribotypen wieder, während die des unteren RT in sieben Mustern präsent waren. Die sich ergebenden Diversitätsindizes von 0,578 (Ribotyp vs. oRT) bzw. 0,689 (Ribotyp vs. uRT) weisen auf ähnliche Diversitäten hin. Bei der Bewertung des Diversitätsindex ist zu beachten, dass ein Wert von 1 die höchste Diversität, ein Wert von 0 keine Diversität bedeutet.

4.3. Multilokus Sequenztypisierung (MLST)

Zweiundfünfzig Isolate, nach vorberichtlichen Informationen, VAG- sowie Ribotypmuster möglichst divers aus den untersuchten *P. multocida* ausgewählt, wurden zusätzlich nach dem von Subaaharan et al. etablierten und 2010 veröffentlichten MLST-Schema typisiert und anhand der unter http://pubmlst.org/pmultocida_rirdc/ verfügbaren Datenbank ausgewertet. So wurden Isolate von klinisch gesunden und klinisch kranken Schweinen, Isolate des oberen und unteren RTs sowie Vertreter der Kapseltypen A, D, F und die beiden kapselnegativen *P. multocida* untersucht. Auch auf die unterschiedliche Verteilung der Gene *toxA*, *pfhaB* und *hgbB* wurde geachtet, um einen ersten Eindruck der Verteilung von Isolaten mit unterschiedlichen Virulenzgenmustern zu erhalten (Tab. 18). Abb. 7 gibt die Verteilung der kapselkodierenden Gene sowie der virulenzassoziierten Gene *toxA*, *pfhaB* und *hgbB* wieder und stellt die Verteilung der Isolate nach vorberichtlichen Informationen und anatomischer Herkunft vor dem Hintergrund der MLST grafisch dar.

Die untersuchten 52 Isolate verteilten sich auf elf unterschiedliche Sequenztypen (ST), von denen n = 36 (69,2 %) in zwei STs enthalten waren. Sequenztyp 13, mit n = 11 *P. multocida*, setzte sich aus Kapseltyp A- sowie *pfhaB*-positiven Isolaten des oRT und uRT von klinisch gesunden und klinisch kranken Tieren zusammen. Bei drei Isolaten konnte zusätzlich das Gen *hgbB* nachgewiesen werden. ST13 bildet zusammen mit einem dem ST70 zugeordneten porcinen Isolat sowie dem ST44 den Sequenztypkomplex (STC) 13. Neben dem ST13 wurden ebenfalls mehrere Isolate (n = 25) im ST50 gefunden. Auch in diesem ST konnten sowohl Isolate aus klinisch kranken als auch gesunden Tieren sowie aus dem oRT und uRT

gefunden werden. Alle Isolate waren *pfhaB*-negativ und *hgbB*-positiv; 21 der 25 dem Kapseltyp D zuzuordnen.

Die mittels MLST untersuchten *toxA*-positiven Isolate ($n = 9$) gehörten alle dem ST50 an. Statistisch signifikante positive Assoziationen ($p < 0,001$) konnten für den ST13 und Stämme des Kapseltyps A sowie *pfhaB*-positive Isolate dargestellt werden. ST50 hingegen ist signifikant assoziiert ($p \leq 0,001$) mit Kapseltyp D-positiven, *hgbB*-positiven oder *toxA*-positiven Isolaten (Tab. 18). Zwei weitere STs (ST9 und ST70) wurden durch jeweils drei *P. multocida* vertreten. ST9 enthielt zwei Kapseltyp A-positiv und das als Kapseltyp F identifizierte Isolat. Die Kombination der beiden Gene *pfhaB* und *hgbB* bei Abwesenheit des *toxA* war allen drei Stämmen eigen, die außerdem dem Ribotypmuster IIA-3 zugeordnet werden konnten. Die drei Isolate des ST70 zeigten sich diverser in ihren Eigenschaften und ihrer Zugehörigkeit zu unterschiedlichen Ribotypen (IA-1, IA-7, IIA-2). Während zwar alle drei Isolate dem Kapseltyp A angehörten und das *pfhaB* trugen, trug nur ein Isolat zusätzlich *hgbB*.

Die beiden als kapselnegativ detektierten Isolate fanden sich, mit identischem Virulenzgenmuster und Zugehörigkeit zum Ribotyp IA-5, gemeinsam in ST73.

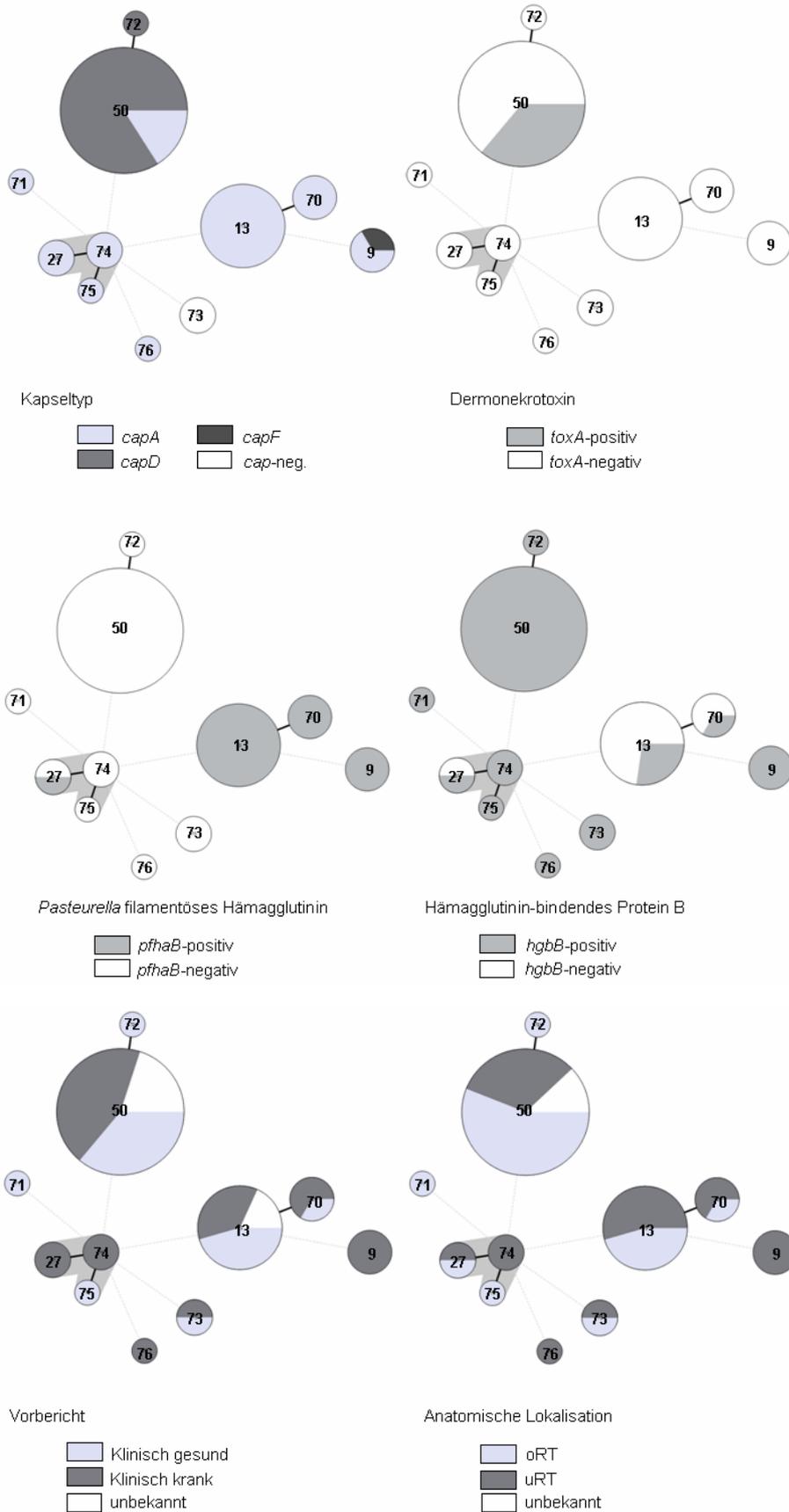
Die vorgestellten Daten, namentlich die signifikanten Übereinstimmungen von Ribotypisierung und MLST sowie die Assoziation einzelner VAG wie *toxA* oder *capD* an bestimmte STs rechtfertigen die Verwendung des Begriffs Phylotyp in der Bedeutung von auf DNS-Basis unterscheidbaren Organismen für die ermittelten Sequenztypen.

Tab. 17 Herkunft, Anamnese, Verteilung virulenzassoziierter Gene sowie Ergebnisse der Ribotypisierung der 382 porcinen *P. multocida*-Stämme

Stammanzahl	Ribotypmuster			Anzahl Stämme pro Muster	Anzahl an für das Gen positiven Stämmen										Anamnese				Ort der Isolation	
	Haupt-cluster	Cluster	Muster		capA	capD	capF	cap-neg	toxA	pftab	hgyb	hssb	Klinisch gesund	Klinisch krank	Pneumonie	PAR	Unbekannt	oRT	uRT	Unbekannt
	I	A	1	174	11 ^a	163 ^a	0	0	11 ^b	3 ^a	171 ^a	159	93 ^a	75	50	22	6	123 ^a	45 ^a	6
	I	A	2	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
	I	A	3	2	1	1	0	0	1	0	2	2	1	1	0	1	0	2	0	0
	I	A	4	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
298	I	A	5	2	0	0	0	2	0	0	2	2	1	1	1	0	0	1	1	0
	I	A	6	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
	I	A	7	115	113 ^a	2 ^a	0	0	1	2 ^a	114 ^a	114	43	67	65	0	5	41 ^a	63 ^a	11
	I	A	8	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0
	I	A	9	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
1	I	B	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0
	II	A	1	77	73 ^a	4 ^a	0	0	0	67 ^a	24 ^a	75	28	39	33	2	10	32	42	3
83	II	A	2	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0
	II	A	3	5	4	0	1	0	0	5	5	5	0	3	3	0	2	1	4	0
Σ: 382					204	175	1	2	13	78	324	364	169	189	155	25	24	205	157	20

oRT = oberer Respirationstrakt, mit Stämmen isoliert aus Nasentupfern, Conchengebe und Tonsillen; uRT = unterer Respirationstrakt, mit Stämmen isoliert aus Lungengewebe und Gewebe der tracheobronchialen Region; Signifikante Assoziation an Ribotyp-Muster: ^a p<0,001; ^b p<0,005

Abb. 7 Darstellung verschiedener Eigenschaften und VAG vor dem Hintergrund der mittels MLST ermittelten Sequenztypen (ST) (n = 52 untersuchte *P. multocida*)



— Distanz:1; — Distanz 2; - - - Distanz 3; - - - - Distanz 4; - - - - andere Distanz

Tab. 18 Ergebnisse der mittels MLST untersuchten *P. multocida*-Isolate in Zusammenhang mit den Ergebnissen der übrigen Methoden

IMT-Nr.	Gesundheits- status	Anatomische Lokalisation	Kapsel- typ	tox _A	pfha _B	hgb _B	hss _B	Ribotyp- Muster	Multilokus- Sequenztyp (ST)	Multilokus- ST-Komplex
IMT1770	Klinisch krank	Ohne Angabe	D	+	-	+	+	IA-1	50	-
IMT4768	Klinisch krank	Ohne Angabe	A	+	-	+	+	IA-1	50	-
IMT10923	Klinisch gesund	uRT	D	-	-	+	+	IA-1	50	-
IMT10937	Klinisch gesund	oRT	D	-	-	+	+	IA-1	50	-
IMT10938	Klinisch gesund	oRT	D	-	-	+	-	IA-1	50	-
IMT10972	Klinisch gesund	oRT	D	-	-	+	-	IA-1	50	-
IMT10991	Klinisch krank	uRT	D	+	-	+	+	IA-1	50	-
IMT10997	Klinisch gesund	oRT	D	-	-	+	-	IA-1	50	-
IMT11029	Klinisch krank	oRT	A	+	-	+	+	IA-1	50	-
IMT11061	Klinisch krank	oRT	D	-	-	+	+	IA-1	50	-
IMT11101	Klinisch krank	oRT	D	-	-	+	+	IA-1	50	-
IMT11112	Klinisch krank	uRT	A	+	-	+	+	IA-1	50	-
IMT11160	Klinisch gesund	uRT	D	-	-	+	+	IA-1	50	-
IMT11301	Klinisch krank	uRT	D	+	-	+	+	IA-1	50	-
IMT11670	Klinisch gesund	oRT	D	-	-	+	+	IA-1	50	-
IMT11676	Klinisch krank	uRT	A	-	+	+	+	IA-1	70	-
IMT11685	Klinisch gesund	oRT	A	-	+	+	+	IA-1	13	STC13
IMT11686	Klinisch gesund	oRT	A	-	+	+	+	IA-1	13	STC13
IMT11951	Ohne Angabe	oRT	D	+	-	+	+	IA-1	50	-
IMT10948	Klinisch gesund	oRT	D	-	-	+	+	IA-2	50	-
IMT11028	Klinisch krank	oRT	A	+	-	+	+	IA-3	50	-
IMT11043	Klinisch gesund	oRT	D	-	-	+	+	IA-3	50	-
IMT11147	Klinisch krank	oRT	D	-	-	+	+	IA-4	50	-
IMT11269	Klinisch krank	uRT	neg	-	-	+	+	IA-5	73	-
IMT11400	Klinisch gesund	oRT	neg	-	-	+	+	IA-5	73	-
IMT11047	Klinisch krank	uRT	A	-	-	+	+	IA-6	76	-

IMT-Nr.	Gesundheits- status	Anatomische Lokalisation	Kapsel- typ	tox _A	pfha _B	hgb _B	hss _B	Ribotyp- Muster	Multilokus- Sequenztyp (ST)	Multilokus- ST-Komplex
IMT11068	Klinisch krank	oRT	A	-	+	-	+	IA-7	27	STC74
IMT11268	Klinisch krank	uRT	D	-	-	+	+	IA-7	50	-
IMT11288	Klinisch krank	uRT	A	-	-	+	+	IA-7	74	STC74
IMT11306	Klinisch krank	uRT	A	-	+	-	+	IA-7	13	STC13
IMT11353	Klinisch krank	uRT	A	-	-	+	+	IA-7	74	STC74
IMT11512	Klinisch gesund	oRT	A	-	-	+	+	IA-7	75	STC74
IMT11528	Klinisch krank	uRT	D	+	-	+	+	IA-7	50	-
IMT11529	Klinisch krank	uRT	A	-	+	+	+	IA-7	70	STC13
IMT11679	Klinisch krank	uRT	A	-	-	+	+	IA-8	27	STC74
IMT10952	Klinisch gesund	oRT	A	-	-	+	+	IA-9	71	-
IMT11031	ohne Angabe	oRT	D	-	-	+	+	IB-1	50	-
IMT10817	Ohne Angabe	uRT	A	-	+	-	-	IIA-1	13	STC13
IMT10818	Ohne Angabe	uRT	A	-	+	-	+	IIA-1	13	STC13
IMT10946	Klinisch gesund	oRT	A	-	+	+	+	IIA-1	13	STC13
IMT11001	Klinisch gesund	oRT	A	-	+	+	+	IIA-1	13	STC13
IMT11004	Klinisch gesund	oRT	D	-	-	+	+	IIA-1	72	-
IMT11299	Klinisch krank	uRT	A	-	+	-	+	IIA-1	13	STC13
IMT11302	Klinisch krank	uRT	A	-	+	-	+	IIA-1	13	STC13
IMT11307	Klinisch krank	uRT	D	-	-	+	+	IIA-1	50	-
IMT11308	Klinisch krank	uRT	D	-	-	+	+	IIA-1	50	-
IMT11526	Klinisch krank	uRT	A	-	+	+	+	IIA-1	13	STC13
IMT11910	Klinisch gesund	oRT	A	-	+	-	+	IIA-1	13	STC13
IMT10950	Klinisch gesund	oRT	A	-	+	-	+	IIA-2	70	STC13
IMT11113	Klinisch krank	uRT	A	-	+	+	+	IIA-3	9	-
IMT11120	Klinisch krank	uRT	A	-	+	+	+	IIA-3	9	-
IMT11182	Klinisch krank	uRT	F	-	+	+	+	IIA-3	9	-

+: positiv, -: negativ

5. DISKUSSION

Um Einblicke und Erkenntnisse hinsichtlich der genotypischen Eigenschaften, der Variabilität und phylogenetischen Verwandtschaft der porcinen *P. multocida* in deutschen Schweinebeständen zu gewinnen und die Grundlagen für eine auf molekularbiologischen Methoden basierende Auswahl an geeigneten Impfstämmen zu legen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit 382 porcine *P. multocida* aus Geweben des oberen und unteren Respirationstraktes mittels PCR und 16S rRNA-Hybridisierung charakterisiert. Zusätzlich wurden nach Auswertung der gewonnenen Informationen 52 der Isolate mittels des 2010 veröffentlichten Multilokus Sequenztypisierungs (MLST)-Schemas (279) untersucht, um einen ersten Eindruck des phylogenetischen Hintergrundes der porcinen *P. multocida*-Isolate zu erhalten und eine Vergleichsmöglichkeit von bandenbasierten und sequenzbasierten Methoden zur Charakterisierung von porcinen *P. multocida*-Isolaten aus deutschen Beständen zu geben.

5.1. Die auftretenden VAG-Muster zeigen eine geringe Variabilität innerhalb der derzeit in deutschen Schweinebeständen vorkommenden *P. multocida*

Einleitend wurden *Pasteurella*-verdächtige Kolonien durch den Nachweis der speziesspezifischen Sequenz *kmt1* als *P. multocida* identifiziert (291). Im Anschluss wurde, ebenfalls in Anlehnung an ein von Townsend und Kollegen entwickeltes PCR-Protokoll, die Verteilung der Kapseltypen überprüft (289). So wurden in Übereinstimmung mit verschiedenen internationalen Publikationen überwiegend Stämme der Kapseltypen A und D isoliert, welchen die Beteiligung an unterschiedlichen Erkrankungen insbesondere des Respirationstraktes zugesprochen wird (62, 73, 85, 143). Ebenfalls in Einklang mit vorangegangenen Studien konnte bei den vorherberichtlich an Pneumonie erkrankten Tieren ein höherer Prozentsatz an *capA*-positiven Isolaten (63,9 %) gegenüber den *capD*-positiven Isolaten (34,8 %) dargestellt werden (62, 307).

Hingegen sind *capD*-positive Stämme in der Literatur als häufige, an der PAR ursächlich beteiligte Pathogene beschrieben. Anhand der vorherberichtlichen Informationen können 25 *P. multocida* mit dieser Erkrankung in Verbindung gebracht werden. Bei diesen dominieren die Stämme des Kapseltyps D mit 76 % signifikant ($p=0,001$) über denen des Kapseltyps A (24 %).

Mit 59,5 % überwiegen im oberen Respirationstrakt Stämme des Kapseltyps D. Somit können die Ergebnisse anderer Untersuchungen bestätigt werden (62, 159). Eine signifikante Assoziation dieses Kapseltyps an den oRT konnte mit 70,5 % aller *capD*-positiven Stämme dargestellt werden ($p<0,001$).

Ursprünglich als geflügelspezifisch angesehen und als „minor fowl cholera“-Erreger bezeichnet, wurden in den letzten Jahren vermehrt *P. multocida* des Kapseltyps F bei verschiedenen Wirtstieren, wie Kaninchen, Rindern, Schweinen und Katzen, auch als Reinkultur in Verbindung mit klinischen Erkrankungen, isoliert. (62, 85, 140). Wenn auch unregelmäßig, so konnten bislang Isolate dieses Kapseltyps bei Schweinen in Verbindung mit porciner Pneumonie identifiziert werden (44, 62, 65). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte ein *capF*-positives Isolat in Verbindung mit dieser Erkrankung isoliert werden. Bislang sind keine Informationen zu einer Assoziation von Kapseltyp F-positiven Isolaten mit bestimmten Virulenzmerkmalen oder pathogenetischen Eigenschaften aus der Literatur bekannt, da dieser Fragestellung noch nicht nachgegangen wurde. Die steigende Anzahl an Nachweisen *capF*-positiver Isolate bei Säugetieren wirft die Frage auf, ob diese in einer verbesserten Diagnostik oder einer Erweiterung des Wirtstierspektrums von *P. multocida* dieses Kapseltyps begründet ist. Genotypische Analysen von *capF*-positiven *P. multocida* verschiedener Wirte oder epidemiologische Studien resp. phylogenetische Untersuchungen mit Berücksichtigung möglicher Infektketten können zur Beantwortung dieser Frage beitragen. In der Literatur wird direkter oder indirekter Kontakt zu Geflügel als eine mögliche Infektionsquelle für Rinder genannt, beispielsweise bei einer Nutzung von Stallgebäuden für die Rinderhaltung, nachdem zunächst Geflügel darin untergebracht worden war (36, 61). Dies sowie der einzigartige OMP-Typ und die Tatsache, dass *capF*-Isolate hauptsächlich aus Geflügel angezüchtet werden, dienen den Autoren als erste Hinweise auf einen aviären Ursprung des bovinen Isolates (61). Der zweifelsfreie Nachweis einer Infektkette resp. die Identifizierung und Charakterisierung desselben Stammes bei epidemiologisch benachbarten Vogel- und Säugetierspezies konnte bisher jedoch noch nicht geführt werden.

Ähnlich unregelmäßig wie Kapseltyp F-Isolate werden auch kapselnegative Isolate beschrieben, die bei verschiedenen Erkrankungen und Wirten eine Rolle spielen können, jedoch auch bei klinisch gesunden Tieren isoliert werden (62, 264). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen früherer Untersuchungen konnte in der vorliegenden Studie jeweils ein Isolat aus dem oRT eines klinisch gesunden Tieres und eines aus Lungengewebe eines an Pneumonie erkrankten Schweines isoliert werden. Die eigentliche Bedeutung dieser Stämme im Krankheitsgeschehen kann aufgrund der geringen Anzahl nicht abgeschätzt werden.

Ob die zum derzeitigen Forschungsstand als kapselnegativ angesprochenen Stämme tatsächlich kapselnegative Isolate darstellen oder bisher unbekannte Kapselpolysaccharide bilden, ist unklar, Kapselfärbungen könnten jedoch für eine erste Abklärung durchgeführt werden. Festzustellen bleibt, dass beide Isolate Träger des *hssB*-Gens sind und somit über den bei *P. multocida* weit verbreiteten Mechanismus zur Synthese der Heparosansynthase 2 verfügen.

Das die Heparosansynthese 2 kodierende Gen *hssB* liegt außerhalb des bekannten Kapselbiosynthese-Lokus und wird durch die beiden metabolischen Gene *alr*, kodierend für eine Alanin-Racemase, und *pgi*, kodierend für eine Glucose-6-Phosphat-Isomerase, flankiert. Für keines dieser beiden Gene ist eine direkte Beteiligung in der Kapselpolymer-Biosynthese bekannt (70). *HssB* konnte in einer Studie bei drei von drei untersuchten *capA*-positiven, sechs von neun *capD*-positiven und sechs von elf *capF*-positiven *P. multocida*-Isolaten gezeigt werden (70). In der Literatur sind bisher keine Daten hinsichtlich eines umfassenderen Screenings auf dieses Gen zu finden. Von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten 382 Stämmen wiesen 95,3 % das *hssB*-Gen auf, welches den Bakterien das Potential verleihen kann, die Zusammensetzung des Kapselmaterials zu verändern, Oberflächenstrukturen zu maskieren und so eine Möglichkeit zur Umgehung der Wirtsabwehr vermittelt (70). Die vorliegenden Ergebnisse lassen auf eine weite Verbreitung des Gens innerhalb der Spezies schließen, welches dem Pathogen theoretisch das Potential zur molekularen Camouflage gewährt, auch wenn die experimentelle Bestätigung dieser letztgenannten These, beispielsweise in Form von Expressionsanalysen, noch aussteht. Auch scheint *hssB* aufgrund seiner weiten Verbreitung die phylogenetisch ältere Struktur zur Kapselsynthese zu sein als die bisher bekannten, in Kapselbiosynthese-Loki organisierten Gene, die möglicherweise später in der Evolution erworben wurden, wobei bislang keine Hinweise auf mobile Elemente in Verbindung mit den Kapselbiosynthese-Genen gefunden wurden.

Erwartungsgemäß konnten aus dem Untersuchungsmaterial keine Isolate der Kapseltypen B oder E isoliert werden, welche als ätiologische Agens der Hämorrhagischen Septikämie (HS) der Wiederkäuer bekannt sind (66, 242, 290). Neben der Isolierung dieser Erreger aus Haus- und Wildwiederkäuern konnten *capB*-Isolate bislang auch von Geflügel isoliert werden und zeigten sich im Tierversuch als hochvirulent für Puten (235, 237, 238). Auch hier ist an eine Erweiterung des Wirtsspektrums zu denken, wie schon für Stämme des Kapseltyps F dargestellt wurde.

Die Verdrängung eines Kapseltyps aus einem spezifischen Krankheitsbild wird von einigen Autoren am Beispiel der HS in Afrika beschrieben. Klassischerweise sind in Ländern Asiens *capB*-Isolate, in Ländern Afrikas *capE*-Isolate als Ursache dieser verlustreichen Erkrankung der Wiederkäuer beschrieben. In den letzten Jahren werden in Afrika vermehrt Kapseltyp B-Isolate aus dem Krankheitsgeschehen isoliert, was durch eine Verdrängung der ursprünglichen bakteriellen Population durch den Import entsprechend mikrobiologisch besiedelter Wiederkäuer aus dem asiatischen Raum zu erklären sein kann (80).

Die Gesamtzahl an mit Pneumonie assoziierten Isolaten (n = 155) übersteigt die Anzahl PAR-assoziiierter *P. multocida* (n = 25) in der vorliegenden Studie deutlich, was die geringere Prävalenz der PAR in deutschen Schweinebeständen reflektiert. Durch die Identifizierung

des pathogenetisch wichtigen Virulenzfaktors DNT und dessen immunogener Wirkung konnten Impfprogramme etabliert werden, die zu einem deutlichen Rückgang der Erkrankung führten und führen. Zusätzlich leisten mikrobiologische Bestandsuntersuchungen und die Merzung von Trägartieren in der Zucht einen nicht zu unterschätzenden Beitrag für die laufende Bekämpfung der bis Februar 2011 meldepflichtigen Erkrankung.

Vor diesem Hintergrund konnten 13 (3,4 %) *toxA*-positive *P. multocida* unter den untersuchten Stämmen identifiziert werden. Das Gen konnte vermehrt, jedoch nicht ausschließlich in Stämmen des Kapseltyps D gefunden werden (61,5 %). Die Kodierung des DNT durch einen lysogenen Bakteriophagen (229) bildet durch den möglichen Verlust des Gens eine potentielle Erklärung für den recht geringen Anteil an identifizierten *toxA*-positiven Stämmen. Auch könnte der Mechanismus der phagenvermittelten Transduktion eine Möglichkeit des horizontalen Gentransfers bilden (62) und jederzeit zu einem vermehrten Wiederauftreten des *toxA*-Genlokus in der bakteriellen Population und somit auch der klinischen Erkrankung führen. Gegen eine solche horizontale Verbreitung des Gens sprechen die Ergebnisse der MLST, da sich die mit dieser Methode untersuchten neun *toxA*-positiven Isolate in nur einem ST gruppieren, was als erster Hinweis auf eine klonale Ausbreitung gewertet werden kann. Für eine sichere Bewertung der Situation ist die Untersuchung weiterer Isolate wünschenswert. Die momentane Situation der geringen Verbreitung *toxA*-positiver *P. multocida* in porcinen Wirten sollte nicht dahingehend interpretiert werden, dass bestehende Überwachungs- und Prophylaxemaßnahmen ersatzlos abgebrochen werden.

Eine Reihe von Genen, kodierend für Produkte verschiedener Funktionsbereiche, konnten in 100 % der untersuchten Stämme gezeigt werden, darunter die für an der Eisenakquirierung beteiligte Faktoren kodierenden Gene *exxB/tonB* und *hgbA*; Neuraminidase-kodierende Gene *nanB* und *nanH*, Typ4-Fimbrien kodierende Gene (*ptfA*) und sowie das für ein OMP kodierende *oma87*. In Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien kann somit eine weite Verbreitung dieser Gene in den *P. multocida*-Isolaten verschiedener Wirtstierspezies bestätigt werden (85, 192). Möglicherweise vermitteln die Gene den Bakterien einen Vorteil und ermöglichen so ein erfolgreiches Besiedeln und/oder Überleben des Mikroorganismus im Wirt oder stellen die für das Überleben im natürlichen Habitat notwendige „Grundausstattung“ dar. Dies ist jedoch nur als theoretische Möglichkeit zu betrachten, da die Forschungsarbeiten an *P. multocida* den Bereich der Expressionsstudien bislang stark vernachlässigen. Keines der untersuchten porcinen Isolate war hingegen Träger des für das transferrinbindende Protein kodierenden Gens *tbpA*. Studien an *P. multocida* verschiedener Wirtstierspezies wiesen dieses Gen hauptsächlich in aus Wiederkäuern isolierten Stämmen nach, insbesondere in Kombination mit dem Kapseltyp B und, zu einem geringeren Anteil, mit den Kapseltypen A und D (85, 215). Die Fähigkeit zur Bindung von Transferrin verschiedener

Wirtstierspezies wurde unter Verwendung von bovinen, *tbpA*-positiven Stämmen im Experiment getestet (214, 215). Während ruminantes Transferrin durch das bakterielle Protein gebunden wurde, konnten die untersuchten Stämme kein Transferrin humaner, aviärer, porciner oder equiner Herkunft binden, was auf die Vermittlung eines Vorteils für das Überleben der Isolate im Wiederkäuerorganismus hindeutet (214, 215).

Zusätzlich zur Isolierung *tbpA*-positiver Isolate aus Wiederkäuern konnte in einer indischen Studie das Gen unter Verwendung einer PCR in Isolaten von Geflügel, Schweinen, Kaninchen sowie Löwen und Tigern gezeigt werden (262). Ob der Nachweis von *tbpA* in Stämmen von Nicht-Wiederkäuern von pathogenetischer Bedeutung ist, beispielsweise durch Vermittlung einer speziesspezifischen Bindung von Transferrin, könnte in einem dem oben genannten ähnlichen Assay unter Verwendung *tbpA*-positiver Stämme von Nicht-Wiederkäuern und Transferrin unterschiedlicher Herkunft näher untersucht werden. Unklar ist bislang auch, ob das Protein TbpA im Nicht-Wiederkäuer exprimiert wird. Bedenkt man, dass die indischen *tbpA*-positiven Isolate nicht-ruminanter Wirtstiere aus einem Land stammen, in dem die HS weite Verbreitung hat, ist zu klären, ob eine speziessübergreifende Verteilung HS verursachender *P. multocida*-Isolate vorliegt und verschiedene Haus-, Nutz- und Wildtiere ein Reservoir für diese Stämme darstellen.

Neben der Kapseltypverteilung und der Verteilung des *toxA* wurden Unterschiede in den VAG-Mustern bei den für das *Pasteurella* filamentöse Hämagglutinin (*pfhaB*) und das Hämoglobin-bindende Protein B (*hgbB*) kodierenden Genen gefunden. *HgbB* konnte in 90,6 % der aus klinisch gesunden ($p=0,003$), jedoch nur in 80,9 % der Isolate klinisch kranker Tiere detektiert werden. Auf der Grundlage von DNS-Sequenzanalysen und phänotypischen Assays wurde *HgbB* als Protein der äußeren Membran mit genetischen und funktionellen Charakteristika von TonB-abhängigen Proteinen beschrieben (55). Die experimentelle Inaktivierung des Gens führte nicht zu einer Veränderung der Fähigkeit, Hämoglobin zu binden und zeigte keinen Einfluss auf die Virulenz des Bakteriums im Mausmodell, was darauf hindeutet, dass andere Proteine diese Funktion übernehmen können (22, 55). Das Fehlen des *hgbB* scheint somit durch das Vorhandensein anderer Eisenakquirierungssysteme, wie *exbB/tonB*, *hgbA*, welche in 100 % der hier untersuchten Stämme vorhanden waren, oder anderen Proteinen kompensiert zu werden.

Die Kombination der beiden Gene *toxA* und *pfhaB* wurde im Zuge dieser Untersuchung bei keinem Stamm nachgewiesen, eine signifikante positive Assoziation ($p<0,001$) hingegen konnte zwischen *pfhaB* und *capA* festgestellt werden. Bei der Betrachtung des Pm70-Genoms (Acc.No: AE004439) finden sich die beiden Gene *pfhaB* und *capA* in einem Abstand von ca. 839 kb, was gegen eine physikalische Verknüpfung der Gene als Ursache für

diese Assoziation spricht. Eine Verknüpfung der Gene auf einem anderen Level, beispielsweise auf transkriptionalem Niveau, ist nicht auszuschließen, kann aber mit Hilfe der durchgeführten Methoden weder bestätigt noch widerlegt werden. Neben der signifikanten Assoziation von *pfhaB* an den Kapseltyp A konnte ebenfalls eine positive Assoziation zwischen *pfhaB* und der Isolierung der Stämme aus Geweben des uRT nachgewiesen werden ($p=0,003$). Die Aufnahme des *pfhaB* durch horizontalen Gentransfer in einen *capA*-positiven Stamm könnte diesem im Laufe der Evolution einen Überlebensvorteil im Wirtsorganismus, gerade unter den Gegebenheiten im uRT, vermittelt und zu einer weiten Verbreitung dieses Isolats in der porcinen *P. multocida*-Population geführt haben.

Neben der positiven Assoziation zwischen *pfhaB* und *capA* konnte eine negative Assoziation ($p<0,001$) zwischen *pfhaB* und *hgbB* gezeigt werden, die sich auch in der getrennten Verteilung der *pfhaB*- und der *hgbB*-positiven Stämme im auf der Basis der Ribotypisierungsdaten erstellten Dendrogramm widerspiegelt. Während sich mit 91,1 % der Hauptteil der *hgbB*-positiven Isolate in Hauptcluster I befindet ($p<0,001$), gruppieren sich 93,6 % der *pfhaB*-positiven Stämme in Hauptcluster II ($p<0,001$).

Nur wenig ist bisher über die Funktion und pathogenetische Bedeutung des PfhaB im Krankheitsgeschehen bekannt. Das Protein zeigt jedoch eine signifikante Ähnlichkeit zu dem bei *B. pertussis* bekannten Fha (*B. pertussis* filamentöses Hämagglutinin), welches, wie im Tierversuch gezeigt werden konnte, eine wichtige Rolle bei der Kolonisierung des Wirtes einnimmt (152) und zudem ein sehr wichtiger und effektiver Bestandteil der azellulären Vakzine zur Prophylaxe des humanen Keuchhustens ist (154). Eine *P. multocida pfhaB2 (fhaB2)* knockout Mutante zeigte nach intranasaler Infektion von Puten eine starke Attenuierung und konnte nicht aus den Organen der intranasal infizierten Tiere reisoliert werden; nach intravenöser Infektion war nur eine geringe Attenuierung zu erkennen. Das Ausschalten des Gens hatte keinen Einfluss auf die ebenfalls getestete Serumresistenz des Stammes (285). Eine weitere Studie zeigte eine Attenuierung von *pfhaB*-Mutanten im Maus-Septikämiemodell (93). Diese Daten verweisen auf eine signifikante Funktion des Proteins während der Infektion. Die Strukturähnlichkeiten zum FhaB machen auch das PfhaB zu einem vielversprechenden Kandidaten im Hinblick auf die Entwicklung einer wirksamen Vakzine. Erste Versuche in dieser Richtung unter Verwendung dreier rekombinanter Peptide im Putenversuch konnten eine signifikante Schutzwirkung intramuskulärer Injektionen gegen die intranasale Belastung mit dem homologen Wildtypstamm P-1059 erzielen (283). Während alle 17 Kontrolltiere innerhalb von 49 Stunden nach der Belastung verstarben und *P. multocida* in Reinkultur aus den Organen reisoliert werden konnte, überlebten 14 der 17 immunisierten Tiere die Infektion ohne Ausbildung klinischer Symptome. Die Autoren verglichen darüber hinaus *pfhaB*-Gensequenzen eines bovinen A:2- und eines aviären F:3-Stammes und leiteten aus der

Ähnlichkeit von über 99 % eine hohe Konserviertheit des Gens ab (283). Dies konnte in den in der vorliegenden Untersuchung durchgeführten Multiplex-PCR-Untersuchungen nicht bestätigt werden. Unter den 78 *pfhaB*-positiven Isolaten wurden durch PCR sieben verschiedene, reproduzierbare Fragmentmuster erkannt, die durch Sequenzvariabilitäten erklärt werden können.

Wenn auch nicht signifikant, so konnte in der vorliegenden Studie doch ein höherer Anteil an *pfhaB*-positiven Stämmen in erkrankten im Vergleich zu gesunden Tieren festgestellt werden (23,4 % vs. 15,3 %), was eine potentielle Bedeutung für die Pathogenese der porcinen Pneumonie unterstreicht.

5.2. Die Mehrheit der untersuchten porcinen *P. multocida* gruppieren sich in nur drei 16S rRNA-Ribotypmustern

Die 16S rRNA-Ribotypisierung wird von verschiedenen Autoren als probate und nützliche Methode zur Untersuchung der genetischen Verwandtschaftsverhältnisse von porcinen *P. multocida*-Isolaten angesehen (16, 73, 94). Daten vergleichender Analysen von Ribotypisierung und der Verteilung virulenzassoziiertes Gene bei mit porciner Pneumonie oder PAR assoziierten *P. multocida* und kommensalen porcinen Stämmen sind bisher nicht veröffentlicht. Die Charakterisierung von *P. multocida*-Isolaten symptomloser Wirtstiere im Vergleich zu krankheitsassoziierten Stämmen ermöglicht ein grundlegendes Verständnis und erste Einblicke in die Eigenschaften dieser zwei *P. multocida*-Gruppen.

Um die Diversität der in deutschen Schweinebeständen vorhandenen *P. multocida* darstellen zu können, wurde die zu untersuchende Stammkollektion so unterschiedlich wie möglich gestaltet. So wurden Isolate aus mindestens elf Bundesländern und 150 Schweinehaltungsbetrieben in die Untersuchung mit einbezogen.

Auf Grundlage der Analyse der Ribotypisierung konnten die 382 Isolate in zwei Hauptcluster (I, II) eingeteilt werden. Hauptcluster I konnte nochmals in zwei Cluster (IA, IB) unterteilt werden und bei einem cut-off Wert von 95 % genetischer Ähnlichkeit teilten sich die Isolate in 13 Muster auf (IA-1 – IA-9; IB-1, IIA-1 – IIA-3). Die Diversität der *P. multocida* stellt sich insgesamt gering dar, betrachtet man die Tatsache, dass nur drei Ribotypmuster (IA-1, IA-7, IIA-1) 95,8 % aller Isolate repräsentieren. Verschiedene Studien konnten ebenfalls eine begrenzte genetische Vielfalt porciner *P. multocida*-Stämme aufzeigen (16, 26, 62, 94).

Die Akkumulation des überwiegenden Anteils der Feldisolate aus klinischen Erkrankungen (95,8 %) in den oben genannten drei Ribotypmustern ließe auf eine hohe Klonalität unter virulenten *P. multocida*-Stämmen schließen. Mit 97,1 % ist jedoch auch der größte Anteil der Isolate aus klinisch gesunden Tieren in diesen drei Ribotypmustern zu finden, was das Vorhandensein primär pathogener Klone innerhalb der porcinen *P. multocida* in Frage stellt und

vielmehr die Frage nach der Bedeutung von Faktoren auf Seiten des Wirtes oder der Umwelt in den Fokus rückt. Häufig können *P. multocida* als sekundäre Pathogene in einem als „*Mycoplasma*-induziertem respiratorischem Erkrankungskomplex“ bezeichneten klinischen Bild aus Schweinen isoliert werden und auch von anderen Wirtstierspezies ist eine Rolle bei der Ausprägung infektiöser Faktorenkrankheiten beschrieben. Vor diesem Hintergrund ist die Eingruppierung von Isolaten klinisch kranker und klinisch gesunder Tiere in identischen Ribotypmustern nicht überraschend.

Die vorliegenden Resultate unterstützen die Hypothese von Davies et al. (2003), dass die geringe Diversität kommensaler Isolate des Nasopharynx klinisch gesunder Tiere die geringe genetische Diversität von mit porciner Pneumonie assoziierten Stämmen bedingt (62). Gleichzeitig widerlegen die hier dargestellten Ergebnisse die zweite Hypothese der genannten Autoren, dass die Diversität kommensaler Stämme im Nasopharynx relativ hoch ist und die aus erkrankten Tieren isolierten *P. multocida* eine geringe Diversität aufweisen, da sie innerhalb der Population eine kleine Gruppe virulenter Klone darstellen und somit eher als primär pathogen in der Pathogenese der porcinen Pneumonie einzustufen sind (62). Für eine zweifelsfreie Beantwortung dieser Frage sollten jedoch weitere Untersuchungen unter Beachtung verschiedener Umweltfaktoren und Haltungsbedingungen, wie Freilandhaltung, ökologischer Tierhaltung oder konventioneller Massentierhaltung, die die Verteilung und genetische Variabilität der porcinen *P. multocida* beeinflussen können, erfolgen. Unter Bedingungen, welche abseits der konventionellen Massentierhaltung mit allen seinen hygienischen Problemen, dem erhöhten Infektionsdruck und veränderter Zusammensetzung der gesamten Mikrobiota liegen, ist es denkbar, dass sich virulentere Stämme in der porcinen Population durchsetzen und vermehrt aus klinischen Geschehen isoliert werden können.

Die in dieser Untersuchung zur Verfügung stehenden 157 Isolate des unteren porcinen RT verteilen sich auf sieben der 13 Ribotypmuster und besitzen im Vergleich zu den 205 Stämmen des oberen RT, verteilt über 11 Ribotypmuster, eine tendentiell geringere genetische Diversität. Eine hypothetische Ursache kann in einem z. B. durch mukoziliäre Clearance oder spezifische Abwehrmechanismen höher ausgeprägtem Selektionsdruck liegen, dem die Bakterien im unteren RT ausgesetzt sind. Dies wiederum würde auf die Existenz von auf bestimmte ökologische Nischen spezialisierten Subgruppen innerhalb der *P. multocida* deuten, eine Hypothese, die durch die vorhandenen Daten nicht belegt werden kann. Eine Klärung dieser Fragestellung durch umfangreiche Studien mit Hilfe diskriminatorisch und phylogenetisch aussagekräftiger Methoden, wie der Multilokus Sequenztypisierung (MLST), ist für eine Abschätzung des Einflusses von Erreger-, Wirts- und Umweltfaktoren auf den Verlauf der Infektion und der Infektionskrankheit dringend erforderlich.

Stämme der Ribotypmuster IA-7 und IIA-1 zeigten sich signifikant mit Stämmen des Kapseltyps A assoziiert ($p < 0,001$), wohingegen Isolate des Ribotypmusters IA-1 überwiegend dem Kapseltyp D angehörten ($p < 0,001$). Andere Kapseltypen waren in diesen Mustern nur in geringer Anzahl zu finden. Im Gegensatz zu anderen Autoren fand sich in den gezeigten Ribotypmuster nur wenig Mischung hinsichtlich der Kapseltypen (62). Die Daten geben keinen Hinweis auf einen horizontalen Transfer der Kapselbiosynthese-Gene. Auch wenn die vorliegenden Ribotypisierungsdaten eher eine unabhängige Evolution von verschiedenen Linien innerhalb von *P. multocida* vermuten lassen (Homoplasie), kann für einzelne Gene auch die Möglichkeit eines horizontalen Gentransfers zwischen unterschiedlichen *P. multocida*-Subpopulationen oder die Beteiligung von Phagen-Konversion an der Bildung von verschiedenen *toxA*-beinhaltenden Ribotypen, wie es in vorangegangenen Studien gezeigt oder zumindest vermutet wurde (62, 73), nicht ausgeschlossen werden. Auch weisen Stämme darauf hin, die aufgrund ihrer Virulenzeigenschaften Charakteristika eines bestimmten Ribotyps aufweisen, ihre Zuordnung zum Ribotyp aber davon abweicht. Die MLST-Daten (s. Kap. 5.3.) zeichnen jedoch, speziell für *toxA*, ein anderes Bild und sprechen gegen einen horizontalen Gentransfer.

5.3. Erste MLST-Untersuchungen bestätigen eine geringe genetische Variabilität

Um einen ersten Eindruck der Verteilung der bekannten VAG im phylogenetischen Hintergrund zu gewinnen, wurden 52, hinsichtlich ihres Kapseltyps, des Vorkommens der VAG *toxA*, *pfhaB* und *hgbB*, des Vorberichtes und des Isolationsgewebes möglichst diverse *P. multocida* für die MLST-Untersuchung ausgewählt. Diese Isolate konnten in 11 Sequenztypen (ST) aufgeteilt werden. Anhand der geringen Anzahl an MLST-typisierten *P. multocida* lassen sich nur erste Rückschlüsse auf die Populationsstruktur ziehen. Die Darstellung der Kapseltypen im phylogenetischen Hintergrund zeigt ein Vorkommen des Kapseltyps A ($n = 28$) in neun Sequenztypen, während die 22 untersuchten Isolate des Kapseltyps D in nur zwei Sequenztypen (ST50 und ST72) vorkommen. Dies spiegelt sich in den unterschiedlichen Diversitätsindizes von 0,091 für Stämme des Kapseltyps D und 0,809 für die des Kapseltyps A deutlich wider.

Auch unter Berücksichtigung der auf der MLST-Homepage (pubmlst.org/pmultocida_rirdc) verfügbaren Daten von weiteren Isolaten verschiedener Wirtstierspezies stellen sich Stämme des Kapseltyps A als weiter über die Sequenztypen verteilt dar. Die insgesamt 55 als Kapseltyp A charakterisierten *P. multocida* vertreten 26 STs, hingegen sind die 26 *capD*-positiven Isolate auf nur 3 STs verteilt, die zu einem Sequenztypkomplex zusammengefasst werden können und für diesen Kapseltyp eine klonale Struktur nahelegen (Abb. 8).

Assoziationen zwischen dem phylogenetischen Hintergrund und dem klinischen Vorbericht oder des Gewebes des Respirationstraktes, aus dem die Isolate angezüchtet werden konnten, wurden nicht festgestellt. Somit fehlen Hinweise auf das Vorhandensein von primär pathogenen klonalen Linien oder Stämmen. Die Daten weisen eher darauf hin, dass Wirts- und Umweltfaktoren eine wichtige Bedeutung für die Ausprägung der klinischen Pasteurellose zukommt, sprechen für die o. g. Hypothese zur Diversität von kommensalen und Pneumonie-assoziierten *P. multocida* (62) und bestätigen somit die durch die Ribotypisierung generierten Informationen. Die beiden kapselnegativen Isolate, welche die einzigen Vertreter des durch die Ribotypisierung erkannten Musters IB-1 darstellen, bildeten auch in der MLST einen eigenen ST (ST73). Signifikante Assoziationen ($p \leq 0,001$) konnten zwischen den Ribotypen IA-1 und ST50, IA-5 und ST73, IIA-1 und ST13 sowie IIA-3 und ST9 dargestellt werden, was eine überwiegende Übereinstimmung der beiden auf Analysen von Teilen des Core-Genoms basierenden Methoden widerspiegelt. Die auftretenden Abweichungen der Ergebnisse beider Methoden können auf die schwer standardisierbare und objektivierbare Durchführung und Auswertung der Ribotypisierung zurückgehen. Unterschiedliche Bandenintensitäten und Belichtungszeiten durch abweichende Stärke der genutzten DNS-Sonde im Verlauf der Studie, das Auftreten von unspezifischen Hintergrundsignalen oder auch Umgebungsfaktoren wie Temperaturschwankungen erschweren trotz regelmäßiger Mitführung eines Kontrollstammes die Auswertung der Daten.

Die vergleichende Betrachtung verschiedener Luminogramme wird durch die genannten Faktoren besonders schwierig. Auch machen unterschiedliche Intensitäten des Bandensignals eine konsequente Grenze zwischen den Definitionen „spezifisches Signal“ und „Artefakt“ nicht immer möglich. Zudem nehmen die in der Auswertung genutzten Grenzwerte Einfluss auf die Ergebnisse. Bisher haben sich auch keine allgemeingültigen Richtlinien z. B. für die Einteilung von *P. multocida* in Ribotypcluster oder -muster durchgesetzt, so dass dies von den unterschiedlichen Arbeitsgruppen nicht einheitlich gehandhabt wird (79, 242).

Während eine objektive Auswertung der Sequenzdaten der MLST möglich ist, ist zu bedenken, dass sich das in dieser Arbeit genutzte MLST-Protokoll noch in einer Erprobungsphase befindet. Es darf spekuliert werden, dass sich unter Verwendung einer anderen oder zusätzlichen Gensequenz in der Analyse eine noch höhere Kongruenz zwischen MLST und Ribotypisierung ergeben würde.

Die gegenläufige Verteilung der VAG *pfhaB* und *hgbB* lässt sich deutlich vor dem phylogenetischen Hintergrund der MLST erkennen (Abb. 7) und bestätigt die Ergebnisse der Ribotypisierung. Während sich die *pfhaB*-positiven Isolate vorrangig auf ST13 ($n = 11$; $p < 0,001$) und ST70 ($n = 3$) konzentrieren, sind dies gerade die STs, in denen auffällig wenige *hgbB*-positive *P. multocida* zu finden sind, wobei die übrigen STs jeweils 100 % *hgbB*-positive Isolate enthalten. Die dargestellte Verteilung weist zunächst auf zwei getrennte Subpopulatio-

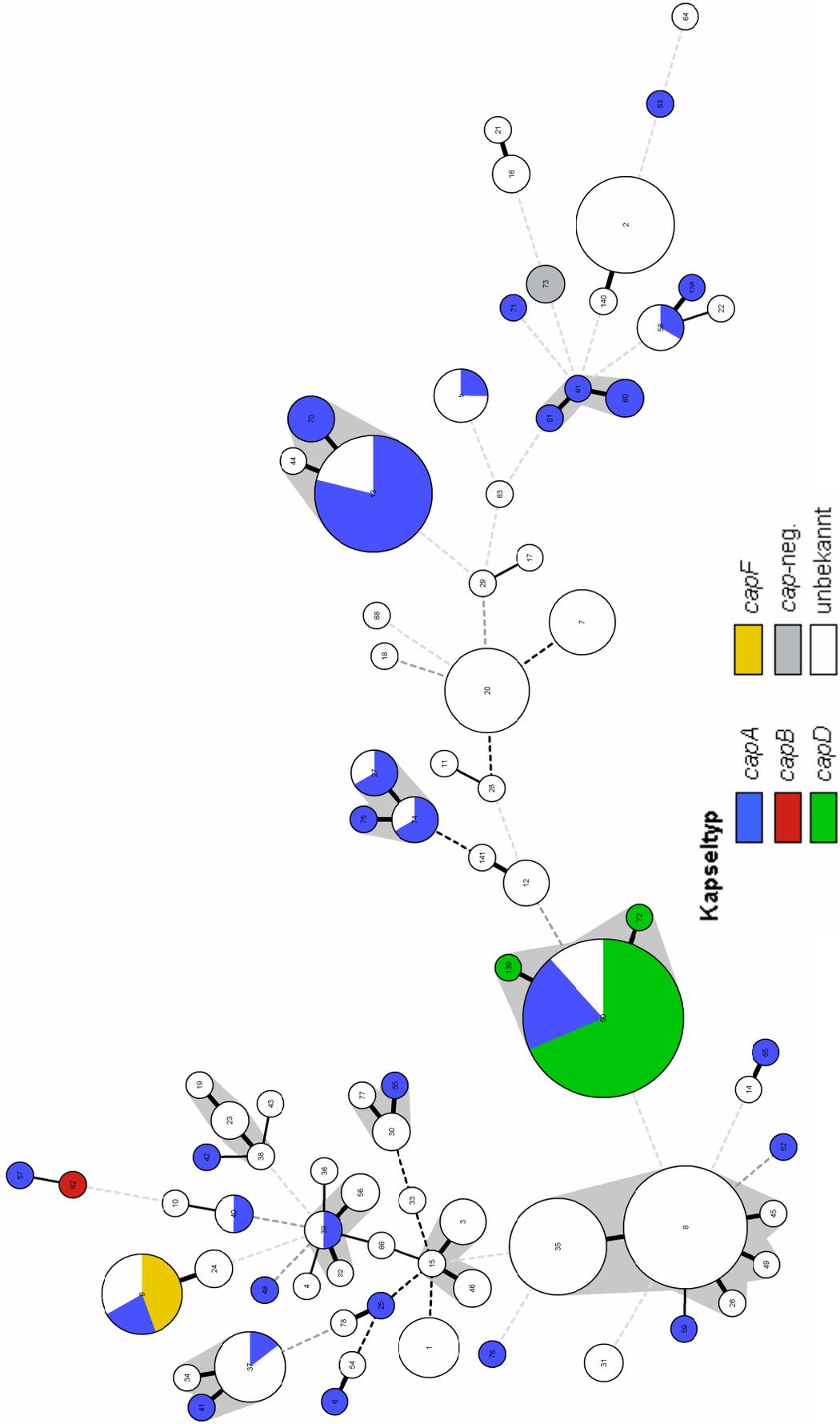
nen hinsichtlich der genannten virulenzassoziierten Gene hin, wiederum ist jedoch die geringe Anzahl untersuchter Isolate bei der Gewichtung der Daten und der Interpretation zu beachten. Trotzdem lassen nach jetzigem Kenntnisstand die hohe Kongruenz der hier dargestellten Ergebnisse von MLST und Ribotypisierung sowie die auftretenden Assoziationen einzelner Gene an bestimmte Ribotypmuster und STs die Verwendung des Begriffs Phylotypen für die in der MLST ermittelten STs als gerechtfertigt erscheinen. Eine Assoziation von Phylotypen an den klinischen Vorbericht lässt sich aus den bisherigen Ergebnissen nicht ableiten.

Für einen direkten Vergleich von Isolaten klinisch erkrankter Tiere sowie kommensaler Stämme aus klinisch gesunden Tieren ist die Untersuchung beider Gruppen notwendig. Bislang sind leider kaum MLST-Daten von Isolaten klinisch gesunder Wirtstiere veröffentlicht. Mit Ausnahme der in dieser Studie untersuchten 19 *P. multocida* gesunder Schweine sind keine weiteren Stämme klinisch unauffälliger Tiere untersucht bzw. die Ergebnisse der Analyse sind nicht öffentlich zugänglich. Die Beachtung dieses Merkmals aber ist die grundsätzliche Voraussetzung für das Verstehen des Krankheitsgeschehens insgesamt und sollte daher in folgenden Untersuchungen von *P. multocida* mit einbezogen werden.

Welchen Umfang eine online verfügbare MLST-Datenbank innerhalb weniger Jahre erreichen kann, ist am Beispiel der *E. coli* MLST-Datenbank (<http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Ecoli>) erkenntlich. Bislang wurden die Daten von 3.208 *E. coli* in 1.953 STs in diese Datenbank aufgenommen (Stand: November 2010), darunter sowohl Isolate von klinisch erkrankten als auch klinisch gesunden Wirten. Nur auf diese Weise können im Verlauf der Untersuchungen mit wachsender Datenmenge Assoziationen zwischen bestimmten Eigenschaften (z. B. Dermonekrotoxin-positive *P. multocida*) und zugehörigen STs erkannt werden.

Eine Liste der derzeit verfügbaren MLST-Schemata (derzeit mehr als 70; Stand: November 2010) und -Datenbanken kann unter <http://pubmlst.org/databases.shtml> eingesehen werden und wird ständig erweitert. An der Spitze der verfügbaren Daten, sowohl was die Anzahl untersuchter Isolate als auch die STs angeht, steht die *Neisseria* sp.-Datenbank von Prof. Martin Maiden und Kollegen. Anhand dieser Spezies wurde 1998 die Methodik der MLST entwickelt und seitdem sind über 17.000 Isolate typisiert und in 8.503 STs eingruppiert worden. Bis die *P. multocida*-Datenbank einen vergleichbaren Umfang hat, werden noch einige Jahre vergehen, jedoch kann davon ausgegangen werden, dass in absehbarer Zeit erste aussagekräftige Analysen getätigt werden können.

Abb. 8 MSTree von n = 233 Isolaten (Quelle: www.pubmlst.net (n = 181) sowie diese Arbeit (n = 52)): Darstellung der Verteilung der Kapseltypen



5.4. Immunogene Wirkung

Ein Teil dieser Arbeit war auf die Generierung grundlegender Informationen zur Ermöglichung einer gezielten Auswahl von in Impfstoffen gegen die PAR bzw. porcine pneumonische Pasteurellose gerichtet.

Zwar führen attenuierte Impfstoffe ähnlich der natürlichen Infektion mit *P. multocida* zu einer serotypübergreifenden Immunität bei den verschiedenen Wirtstierspezies, jedoch besteht aufgrund der meist nicht bekannten Grundlage der Attenuierung stets das Risiko der Rückkehr zum virulenten Phänotyp und somit die Gefahr einer durch die Impfstämme ausgelösten Erkrankung (2, 126). Demgegenüber steht die höhere Sicherheit inaktivierter Vakzinen, die jedoch zum einen i. d. R. keine serotypübergreifende Immunität vermitteln und zum anderen aufgrund der Notwendigkeit der parenteralen Verabreichung ein Mehrfaches an Arbeitsaufwand gerade in großen Tierbeständen, wie der konventionellen Geflügelhaltung in Deutschland, bedeuten.

Zur Zeit gibt es neben den zur Bekämpfung und Prophylaxe der PAR zugelassenen Impfstoffen aus inaktiviertem *B. bronchiseptica*- und *P. multocida*-Toxoid bzw. Toxinfragmenten auch einen ebenfalls inaktivierten, zur Prophylaxe von PAR und Enzootischer Pneumonie zugelassenen Impfstoff, der neben *B. bronchiseptica* und einer *P. multocida* Toxinkomponente zusätzlich einen *P. multocida*-Stamm des Kapseltyps A enthält (122). Die Kombination von *P. multocida* und *B. bronchiseptica* zur Bekämpfung der PAR ist wichtig, da erst eine Schleimhautschädigung, häufig durch die vorangegangene Infektion mit *B. bronchiseptica*, eine erfolgreiche Kolonisierung mit *P. multocida* ermöglicht (78). Bislang sind unterschiedliche Faktoren von *P. multocida* als potentielle immunogene Proteine getestet worden. Neben einer serotypspezifischen Immunität ist die Ausprägung einer serotypübergreifenden Schutzwirkung ein zentrales Ziel dieser Forschungsanstrengungen. Leider kann dieses Ziel bis heute experimentell lediglich mit attenuierten Vakzinen erreicht werden. Während andere bakterielle Erreger durch die Deletion einzelner, wichtiger Virulenzfaktoren als avirulente Attenuate verimpft werden können (56), erfolgt die Attenuierung von *P. multocida* noch immer häufig durch Passagieren. Die Gefahr des Ausbruches einer Erkrankung durch den mit einem solchen Impfstoff in den Bestand eingebrachten Erreger ist immer gegeben.

Die hier dargelegten Ergebnisse zeigen, dass sich ein Großteil der in deutschen Schweinebeständen vorkommenden *P. multocida* in wenigen Ribotypmustern und STs gruppiert, die Anzahl an vorkommenden Phylotypen nach dem derzeitigen Kenntnisstand also als gering einzuschätzen ist.

Die Ähnlichkeit von PfhaB zu als protektiv bekannten Proteinen anderer Bakterienspezies lässt dieses Protein als interessantes Target erscheinen. Bei der Auswahl von Impfstämmen

sollte daher auf das Vorhandensein des kodierenden Gens geachtet werden, bis weiterführende Ergebnisse zur tatsächlichen Protektivität vorliegen.

Um einen höchstmöglichen Impfschutz zu gewährleisten, sollte bei der Herstellung von Vakzinen neben der Bestimmung der Virulenzgenmuster auf die Verwendung entsprechender Isolate, namentlich von *P. multocida* aus den Ribotypmustern IA-1, IA-7 und IIA-1, geachtet werden. Auch die MLST zeigt bislang die Tendenz, einen Großteil der *P. multocida* in einige wenige STs, wie den ST13, ST50 sowie ST9, zu gruppieren. Mit der Einschränkung der wenigen verfügbaren MLST-Daten scheint die Verwendung entsprechender Stämme angezeigt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden 382 porcine *P. multocida* aus dem Respirations-trakt erkrankter sowie klinisch gesunder Schweine mit Hilfe molekularbiologischer Techniken untersucht, um Informationen zur Phylogenie der Spezies und zur Diversität und Verteilung virulenzassoziierter Gene in porcinen *P. multocida* aus Deutschland zu erhalten.

Die Ergebnisse der Ribotypisierung (13 Ribotypmuster) und der MLST (11 Sequenztypen) zeigten eine geringe Diversität und somit auch eine begrenzte Anzahl an Phylotypen in der aktuellen *P. multocida*-Population in deutschen Schweinebeständen. Bestimmte Muster virulenzassoziierter Gene waren mit bestimmten Phylotypen assoziiert.

Die fehlende Assoziation zwischen Genotypen und vorberichtlichen Informationen zum Gesundheitsstatus weisen auf die Bedeutung von wirts- und umweltassozierten Faktoren für die Ausbildung porciner Pasteurellosen hin. Die Ergebnisse von MLST und Ribotypisierung zeigten signifikante Assoziationen zueinander. Die wenigen Unterschiede können durch die Schwierigkeiten der Validierung der Ribotypisierungsergebnisse oder die Nutzung suboptimaler Gensequenzen begründet liegen. Dieser wichtige Punkt sollte durch zukünftige, umfassende Untersuchung jener Stämme, für die inkongruente Ergebnisse ermittelt wurden, beleuchtet werden.

Die in früheren Studien beschriebenen Assoziationen der Kapseltypen an die Habitate oberer Respirationstrakt (*capD*) und unterer Respirationstrakt (*capA*) konnten auch in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden. Signifikanzen in der Verteilung der Kapseltypen A (assoziiert an Ribotypmuster IA-7 und IIA-1) und D (assoziiert an IA-1) sowie einzelner virulenzassoziierter Gene (*pfhaB*, *hgbB*) konnten mittels Ribotypisierung gezeigt werden. Das Verteilungsmuster der Kapseltypen vor dem phylogenetischen Hintergrund deutet auf eine homoplastische Evolution von Stämmen des Kapseltyps A, während Stämme des Kapseltyps D nur einem ST-Komplex angehören, was einen klonalen Hintergrund nahelegt. Auch unter Berücksichtigung der in der MLST-Datenbank hinterlegten Daten (Stand: November 2010) weiterer *P. multocida* bestätigt sich die Tendenz der Verteilung der Kapseltypen.

Die Gene *exbI/tonB*, *oma87*, *ptfA*, *nanB*, *nanH*, *hgbA* und *tbpA* waren in allen resp. keinem (*tbpA*) untersuchten Isolat(en) nachweisbar. Das Virulenzgenmuster der porcinen *P. multocida* unterschied sich in den Genen *toxA* (3,4 % der Isolate positiv), *pfhaB* (20,4 % positiv) sowie *hgbB* (84,8 % positiv). Nach unserem Wissensstand konnte durch die MLST *toxA*-positiver Stämme erstmals ein Hinweis auf eine klonale Verbreitung dieser Stämme

erbracht werden, unabhängig von der phagenkodierte Natur des *toxA*. Diese Daten sprechen gegen eine horizontale Verbreitung des phagenkodierte Gens.

Sowohl die Ergebnisse der Ribotypisierung als auch der MLST zeigten eine negative Assoziation zwischen *pfhaB*- und *hgbB*-positiven Isolaten.

Die in der vorliegenden Studie erhobenen Daten ermöglichen eine gezieltere Auswahl zukünftiger Impfstämme anhand des Phylotyps. Darüberhinaus favorisieren wir, neben der Berücksichtigung der lange bekannten Kapseltypen und des Dermonekrotoxins, welches in Form von Toxinfragmenten oder Toxoiden verwendet wird, die Aufnahme des PfhaB in die Vakzinen, da dieses Protein Ähnlichkeiten zum Protein Fha von *B. pertussis* aufweist. Hintergrund ist die Tatsache, dass Fha als ein effektives Immunogen beim Menschen bekannt ist, wodurch künftige Studien zur Wirksamkeit PfhaB-haltiger Vakzinen beim Schwein ange-regt werden.

Genotypic characterization of porcine *Pasteurella multocida* from the respiratory tract of healthy and diseased swine.**Summary**

In this study 382 porcine *P. multocida* isolates from the respiratory tract of diseased and clinically healthy swine were characterized using molecular techniques to unravel the phylogeny of the species as well as the diversity and distribution of virulence associated genes in porcine *P. multocida* from Germany.

The results of ribotyping (13 ribotype patterns) and MLST (11 sequence types) revealed a limited diversity, thus a limited number of phlotypes of the current *P. multocida* population in german pig livestock. Certain virulence gene patterns were associated with certain phlotypes. The missing association between distinctive genotypes and clinical outcome indicate the high influence of host-associated and environmental-associated factors for the development of pasteurellosis in pigs. MLST and ribotyping showed significant associations. Minor differences are assumably based on the difficulties to validate band patterns gained by ribotyping or a suboptimal choosing of gene sequences used in the MLST scheme. This important issue should be addressed in future studies by more deeply analysing those strains that gave incongruent results.

Former studies described associations between capsular types to the upper (*capA*) resp. lower (*capD*) respiratory tract, which could be confirmed in this work. In addition, significant associations between capsular type A-positive isolates and ribotypes IA-7 and IIA-1 and capsular type D and ribotype IA-1 as well as specific virulence associated genes were found. The distribution of capsular types in the phylogenetic background points towards a homoplastic evolution of *capA*-positive isolates, while isolates of capsular type D cluster in only one ST-complex, indicating a clonal background. This tendency is supported by the data currently (november 2010) present in the online available MLST-database.

The genes *exbI/tonB*, *oma87*, *ptfA*, *nanB*, *nanH*, *hgbA*, and *tbpA* were present in all resp. none (*tbpA*) isolates tested. Differences were only obvious in the distribution of *toxA* (3,4 %), *pfhaB* (20,4 %), and *hgbB* (84,8 %). Due to our knowledge, the investigation of the *toxA*-positive isolates using MLST for the first time led to the conclusion that these isolates spread clonally, despite the phage-coded nature of the *toxA* gene. These data argue against a horizontal spread of *toxA*. Furthermore, the results of ribotyping as well as the results of MLST both revealed a negative association between *pfhaB*- and *hgbB*-positive strains.

The data gained in this study give the opportunity for a more sound selection of new vaccine strains by considering the phylotype of the *P. multocida* strains. Thus, besides considering the well known capsular type and toxin, used in the form of toxin-fragment or toxoid, we envision an inclusion of PfhaB into the vaccine, as this protein has similarities to the Fha protein of *B. pertussis*. As Fha is known to be an effective immunogen in humans, this fact is fostering future studies to proof the efficacy of vaccines containing PfhaB to prevent porcine pasteurellosis.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. **Adler, B., D. Bulach, J. Chung, S. Doughty, M. Hunt, K. Rajakumar, M. Serrano, A. van Zanden, Y. Zhang und C. Ruffolo.** 1999. Candidate vaccine antigens and genes in *Pasteurella multocida*. *J Biotechnol* **73**:83-90.
2. **Adler, B., R. Chancellor, P. Homchampa, M. Hunt, C. Ruffolo, R. Strugnell und D. Wapling.** 1996. Immunity and vaccine development in *Pasteurella multocida* infections. *J Biotechnol* **44**:139-144.
3. **Akkoyunlu, M., M. Ruan und A. Forsgren.** 1991. Distribution of protein D, an immunoglobulin D-binding protein, in *Haemophilus* strains. *Infect Immun* **59**:1231-1238.
4. **Al-Haddawi, M. H., S. Jasni, R. Son, A. R. Mutalib, A. R. Bahaman, M. Zamri-Saad und A. R. Sheikh-Omar.** 1999. Molecular characterization of *Pasteurella multocida* isolates from rabbits. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **45**:269-275.
5. **Al-Haddawi, M. H., S. Jasni, M. Zamri-Saad, A. R. Mutalib, I. Zulkifli, R. Son und A. R. Sheikh-Omar.** 2000. In vitro study of *Pasteurella multocida* adhesion to trachea, lung and aorta of rabbits. *Vet. J.* **159**:274-281.
6. **Al-Hasani, K., J. Boyce, V. P. McCarl, S. Bottomley, I. Wilkie und B. Adler.** 2007. Identification of novel immunogens in *Pasteurella multocida*. *Microb Cell Fact* **6**:3.
7. **Andreasen, M., J. P. Nielsen, P. Baekbo, P. Willeberg und A. Botner.** 2000. A longitudinal study of serological patterns of respiratory infections in nine infected Danish swine herds. *Prev Vet Med* **45**:221-235.
8. **Ausubel, F. M.** 1999. *Short Protocols in molecular biology*, 4 ed. John Wiley & Sons, Inc., New York.
9. **Bailie, W. E., E. C. Stowe und A. M. Schmitt.** 1978. Aerobic bacterial flora of oral and nasal fluids of canines with reference to bacteria associated with bites. *J Clin Microbiol* **7**:223-231.
10. **Baldwin, M. R., J. H. Lakey und A. J. Lax.** 2004. Identification and characterization of the *Pasteurella multocida* toxin translocation domain. *Mol Microbiol* **54**:239-250.
11. **Balke, E., W. Scharmann und R. Drzeniek.** 1974. [The estimation of the molecular weight of bacterial neuraminidases by gel-filtration (author's transl)]. *Zentralbl Bakteriolog Orig A* **229**:55-67.
12. **Barbier, N., P. Saulnier, E. Chachaty, S. Dumontier und A. Andremont.** 1996. Random amplified polymorphic DNA typing versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* **34**:1096-1099.
13. **Bisgaard, M., S. B. Houghton, R. Mutters und A. Stenzel.** 1991. Reclassification of German, British and Dutch isolates of so-called *Pasteurella multocida* obtained from pneumonic calf lungs. *Vet Microbiol* **26**:115-124.
14. **Blackall, P. J., A. M. Bojesen, H. Christensen und M. Bisgaard.** 2007. Reclassification of [*Pasteurella*] *trehalosi* as *Bibersteinia trehalosi* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**:666-674.
15. **Blackall, P. J., H. Christensen, T. Beckenham, L. L. Blackall und M. Bisgaard.** 2005. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**:353-362.
16. **Blackall, P. J., N. Fegan, J. L. Pahoff, G. J. Storie, G. B. McIntosh, R. D. Cameron, D. O'Boyle, A. J. Frost, M. R. Bara, G. Marr und J. Holder.** 2000. The molecular epidemiology of four outbreaks of porcine pasteurellosis. *Vet Microbiol* **72**:111-120.
17. **Blackall, P. J. und J. K. Miflin.** 2000. Identification and typing of *Pasteurella multocida*: a review. *Avian Pathol* **29**:271-287.
18. **Blackall, P. J., J. L. Pahoff und R. Bowles.** 1997. Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian pigs. *Vet Microbiol* **57**:355-360.

19. **Blocker, D., L. Berod, J. W. Fluhr, J. Orth, M. Idzko, K. Aktories und J. Norgauer.** 2006. *Pasteurella multocida* toxin (PMT) activates RhoGTPases, induces actin polymerization and inhibits migration of human dendritic cells, but does not influence macropinocytosis. *Int Immunol* **18**:459-464.
20. **Bosch, M., E. Garrido, M. Llagostera, A. M. Perez de Rozas, I. Badiola und J. Barbe.** 2002. *Pasteurella multocida* *exbB*, *exbD* and *tonB* genes are physically linked but independently transcribed. *FEMS Microbiol Lett* **210**:201-208.
21. **Bosch, M., M. E. Garrido, M. Llagostera, A. M. Perez De Rozas, I. Badiola und J. Barbe.** 2002. Characterization of the *Pasteurella multocida* *hgbA* gene encoding a hemoglobin-binding protein. *Infect. Immun.* **70**:5955-5964.
22. **Bosch, M., M. E. Garrido, A. M. Perez de Rozas, I. Badiola, J. Barbe und M. Llagostera.** 2004. *Pasteurella multocida* contains multiple immunogenic haemin- and haemoglobin-binding proteins. *Vet Microbiol* **99**:103-112.
23. **Botzler, R. G.** 1991. Epizootiology of avian cholera in wildfowl. *J Wildl Dis* **27**:367-395.
24. **Bowe, F., P. O'Gaora, D. Maskell, M. Cafferkey und G. Dougan.** 1989. Virulence, persistence, and immunogenicity of *Yersinia enterocolitica* O:8 *aroA* mutants. *Infect Immun* **57**:3234-3236.
25. **Bowersock, T. L., T. Hooper und R. Pottenger.** 1992. Use of ELISA to detect toxigenic *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis in swine. *J Vet Diagn Invest* **4**:419-422.
26. **Bowles, R. E., J. L. Pahoff, B. N. Smith und P. J. Blackall.** 2000. Ribotype diversity of porcine *Pasteurella multocida* from Australia. *Aust Vet J* **78**:630-635.
27. **Boyce, J. D. und B. Adler.** 2000. The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Infect Immun* **68**:3463-3468.
28. **Boyce, J. D., J. Y. Chung und B. Adler.** 2000. Genetic organisation of the capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Vet Microbiol* **72**:121-134.
29. **Boyce, J. D., J. Y. Chung und B. Adler.** 2000. *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. *J Biotechnol* **83**:153-160.
30. **Boyce, J. D., P. A. Cullen, V. Nguyen, I. Wilkie und B. Adler.** 2006. Analysis of the *Pasteurella multocida* outer membrane sub-proteome and its response to the in vivo environment of the natural host. *Proteomics* **6**:870-880.
31. **Braun, V., S. Hobbie und R. Ondraczek.** 1992. *Serratia marcescens* forms a new type of cytolysin. *FEMS Microbiol Lett* **79**:299-305.
32. **Buys, W. E., H. E. Smith, A. M. Kamps, E. M. Kamp und M. A. Smits.** 1990. Sequence of the dermonecrotic toxin of *Pasteurella multocida* ssp. *multocida*. *Nucleic acids research* **18**:2815-2816.
33. **Capitini, C. M., I. A. Herrero, R. Patel, M. B. Ishitani und T. G. Boyce.** 2002. Wound infection with *Neisseria weaveri* and a novel subspecies of *Pasteurella multocida* in a child who sustained a tiger bite. *Clin Infect Dis* **34**:E74-76.
34. **Carter, G. R.** 1972. Improved hemagglutination test for identifying type A strains of *Pasteurella multocida*. *Appl Microbiol* **24**:162-163.
35. **Carter, G. R.** 1955. Studies on *Pasteurella multocida*. I. A hemagglutination test for the identification of serological types. *Am J Vet Res* **16**:481-484.
36. **Catry, B., K. Chiers, S. Schwarz, C. Kehrenberg, A. Decostere und A. de Kruif.** 2005. Fatal peritonitis caused by *Pasteurella multocida* capsular type F in calves. *J Clin Microbiol* **43**:1480-1483.
37. **Champlin, F. R., C. E. Patterson, F. W. Austin und P. E. Ryals.** 1999. Derivation of extracellular polysaccharide-deficient variants from a serotype A strain of *Pasteurella multocida*. *Curr Microbiol* **38**:268-272.
38. **Champlin, F. R., T. R. Shryock, C. E. Patterson, F. W. Austin und P. E. Ryals.** 2002. Prevalence of a novel capsule-associated lipoprotein among pasteurellaceae pathogenic in animals. *Curr Microbiol* **44**:297-301.
39. **Chanter, N., T. Magyar und J. M. Rutter.** 1989. Interactions between *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of pigs. *Res Vet Sci* **47**:48-53.

40. **Chanter, N. und J. M. Rutter.** 1989. Pasteurellosis in pigs and the determination of virulence of toxigenic *Pasteurella multocida*, p. 161-195. In C. Adlam und J. M. Rutter (ed.), *Pasteurella and Pasteurellosis*. Academic Press.
41. **Chevalier, G., H. Duclohier, D. Thomas, E. Shechter und H. Wroblewski.** 1993. Purification and characterization of protein H, the major porin of *Pasteurella multocida*. *J Bacteriol* **175**:266-276.
42. **Choi-Kim, K., S. K. Maheswaran, L. J. Felice und T. W. Molitor.** 1991. Relationship between the iron regulated outer membrane proteins and the outer membrane proteins of in vivo grown *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol* **28**:75-92.
43. **Choi, C. und C. Chae.** 2001. Enhanced detection of toxigenic *Pasteurella multocida* directly from nasal swabs using a nested polymerase chain reaction. *Vet J* **162**:255-258.
44. **Choi, C., B. Kim, W. S. Cho, J. Kim, D. Kwon, D. S. Cheon und C. Chae.** 2001. Capsular serotype, *toxA* gene, and antimicrobial susceptibility profiles of *Pasteurella multocida* isolated from pigs with pneumonia in Korea. *Vet Rec* **149**:210-212.
45. **Christensen, H., O. Angen, J. E. Olsen und M. Bisgaard.** 2004. Revised description and classification of atypical isolates of *Pasteurella multocida* from bovine lungs based on genotypic characterization to include variants previously classified as biovar 2 of *Pasteurella canis* and *Pasteurella avium*. *Microbiology* **150**:1757-1767.
46. **Christensen, H., M. Bisgaard, B. Aalbaek und J. E. Olsen.** 2004. Reclassification of Bisgaard taxon 33, with proposal of *Volucribacter psittacidica* gen. nov., sp. nov. and *Volucribacter amazonae* sp. nov. as new members of the *Pasteurellaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**:813-818.
47. **Christensen, H., M. Bisgaard, A. M. Bojesen, R. Mutters und J. E. Olsen.** 2003. Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, '*Actinobacillus salpingitidis*' or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. nov. and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**:275-287.
48. **Christensen, J. P., H. H. Dietz und M. Bisgaard.** 1998. Phenotypic and genotypic characters of isolates of *Pasteurella multocida* obtained from back-yard poultry and from two outbreaks of avian cholera in avifauna in Denmark. *Avian Pathol* **27**:373-381.
49. **Christiansen, K. H., T. E. Carpenter, K. P. Snipes und D. W. Hird.** 1992. Transmission of *Pasteurella multocida* on California turkey premises in 1988-89. *Avian Dis* **36**:262-271.
50. **Chung, J. Y., I. Wilkie, J. D. Boyce und B. Adler.** 2005. Vaccination against fowl cholera with acapsular *Pasteurella multocida* A:1. *Vaccine* **23**:2751-2755.
51. **Chung, J. Y., I. Wilkie, J. D. Boyce, K. M. Townsend, A. J. Frost, M. Ghodduzi und B. Adler.** 2001. Role of capsule in the pathogenesis of fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A. *Infect Immun* **69**:2487-2492.
52. **Chung, J. Y., Y. Zhang und B. Adler.** 1998. The capsule biosynthetic locus of *Pasteurella multocida* A:1. *FEMS Microbiol Lett* **166**:289-296.
53. **Chung, W. B., L. R. Backstrom und M. T. Collins.** 1994. Experimental model of swine pneumonic pasteurellosis using crude *Actinobacillus pleuropneumoniae* cytotoxin and *Pasteurella multocida* given endobronchially. *Can J Vet Res* **58**:25-30.
54. **Corney, B. G., I. S. Diallo, L. L. Wright, G. R. Hewitson, A. J. De Jong, P. C. Burrell, P. F. Duffy, C. P. Stephens, B. J. Rodwell, D. B. Boyle und P. J. Blackall.** 2007. *Pasteurella multocida* detection by 5' Taq nuclease assay: a new tool for use in diagnosing fowl cholera. *J Microbiol Methods* **69**:376-380.
55. **Cox, A. J., M. L. Hunt, J. D. Boyce und B. Adler.** 2003. Functional characterization of HgbB, a new hemoglobin binding protein of *Pasteurella multocida*. *Microb Pathog* **34**:287-296.
56. **Curtiss, R., 3rd und J. O. Hassan.** 1996. Nonrecombinant and recombinant avirulent *Salmonella* vaccines for poultry. *Vet Immunol Immunopathol* **54**:365-372.
57. **Dabo, S. M., J. D. Taylor und A. W. Confer.** 2007. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev* **8**:129-150.

58. **Dagleish, M. P., J. C. Hodgson, S. Ataei, A. Finucane, J. Finlayson, J. Sales, R. Parton und J. G. Coote.** 2007. Safety and protective efficacy of intramuscular vaccination with a live *aroA* derivative of *Pasteurella multocida* B:2 against experimental hemorrhagic septicemia in calves. *Infect Immun* **75**:5837-5844.
59. **Dasti, J. I., A. M. Tareen, R. Lugert, A. E. Zautner und U. Gross.** 2010. *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *Int J Med Microbiol* **300**:205-211.
60. **Datta, D. B., B. Arden und U. Henning.** 1977. Major proteins of the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane as bacteriophage receptors. *J Bacteriol* **131**:821-829.
61. **Davies, R. L.** 2004. Genetic diversity among *Pasteurella multocida* strains of avian, bovine, ovine and porcine origin from England and Wales by comparative sequence analysis of the 16S rRNA gene. *Microbiology* **150**:4199-4210.
62. **Davies, R. L., R. MacCorquodale, S. Baillie und B. Caffrey.** 2003. Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. *J. Med. Microbiol.* **52**:59-67.
63. **Davies, R. L., R. MacCorquodale und B. Caffrey.** 2003. Diversity of avian *Pasteurella multocida* strains based on capsular PCR typing and variation of the OmpA and OmpH outer membrane proteins. *Vet Microbiol* **91**:169-182.
64. **Davies, R. L., R. MacCorquodale und S. Reilly.** 2004. Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. *Vet. Microbiol.* **99**:145-158.
65. **Davies, R. L., P. J. Watson und B. Caffrey.** 2003. Comparative analyses of *Pasteurella multocida* strains associated with the ovine respiratory and vaginal tracts. *Vet Rec* **152**:7-10.
66. **De Alwis, M. C.** 1992. Haemorrhagic septicaemia--a general review. *Br Vet J* **148**:99-112.
67. **De Jong, M. F.** 1999. Progressive and Nonprogressive Atrophic Rhinitis, p. 355-384. *In* B. E. Straw, S. D'Allaire, W. L. Mengeling und D. J. Taylor (ed.), *Diseases of Swine*. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
68. **DeAngelis, P. L., N. S. Gunay, T. Toida, W. J. Mao und R. J. Linhardt.** 2002. Identification of the capsular polysaccharides of Type D and F *Pasteurella multocida* as unmodified heparin and chondroitin, respectively. *Carbohydr Res* **337**:1547-1552.
69. **DeAngelis, P. L., W. Jing, R. R. Drake und A. M. Achyuthan.** 1998. Identification and molecular cloning of a unique hyaluronan synthase from *Pasteurella multocida*. *J Biol Chem* **273**:8454-8458.
70. **Deangelis, P. L. und C. L. White.** 2004. Identification of a distinct, cryptic heparosan synthase from *Pasteurella multocida* types A, D, and F. *J. Bacteriol.* **186**:8529-8532.
71. **Djordjevic, S. P., G. J. Eamens, H. Ha, M. J. Walker und J. C. Chin.** 1998. Demonstration that Australian *Pasteurella multocida* isolates from sporadic outbreaks of porcine pneumonia are non-toxigenic (*toxA*-) and display heterogeneous DNA restriction endonuclease profiles compared with toxigenic isolates from herds with progressive atrophic rhinitis. *J Med Microbiol* **47**:679-688.
72. **Dominick, M. A. und R. B. Rimler.** 1986. Turbinate atrophy in gnotobiotic pigs intranasally inoculated with protein toxin isolated from type D *Pasteurella multocida*. *Am J Vet Res* **47**:1532-1536.
73. **Donnio, P. Y., A. Allardet-Servent, M. Perrin, F. Escande und J. L. Avril.** 1999. Characterisation of dermonecrotic toxin-producing strains of *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* isolated from man and swine. *J Med Microbiol* **48**:125-131.
74. **Doring, G., K. Unertl und A. Heininger.** 2008. Validation criteria for nucleic acid amplification techniques for bacterial infections. *Clin Chem Lab Med* **46**:909-918.
75. **Doughty, S. W., C. G. Ruffolo und B. Adler.** 2000. The type 4 fimbrial subunit gene of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol* **72**:79-90.
76. **Drenjancevic, I. H., D. Ivic, D. Drenjancevic, J. Ivic, B. Pelc und D. Vukovic.** 2008. Fatal fulminant sepsis due to a cat bite in an immunocompromised patient. *Wien Klin Wochenschr* **120**:504-506.

77. **Drzeniek, R., W. Scharmann und E. Balke.** 1972. Neuraminidase and N-acetylneuraminat pyruvate-lyase of *Pasteurella multocida*. J Gen Microbiol **72**:357-368.
78. **Dugal, F., M. Belanger und M. Jacques.** 1992. Enhanced adherence of *Pasteurella multocida* to porcine tracheal rings preinfected with *Bordetella bronchiseptica*. Can J Vet Res **56**:260-264.
79. **Dziva, F., H. Christensen, L. A. van Leengoed, K. Mohan und J. E. Olsen.** 2004. Differentiation of *Pasteurella multocida* isolates from cases of atrophic rhinitis in pigs from Zimbabwe by RAPD and ribotyping. Vet Microbiol **102**:117-122.
80. **Dziva, F., A. P. Muhairwa, M. Bisgaard und H. Christensen.** 2008. Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with *Pasteurella multocida*. Vet Microbiol **128**:1-22.
81. **El Tayeb, A. B., T. Y. Morishita und E. J. Angrick.** 2004. Evaluation of *Pasteurella multocida* isolated from rabbits by capsular typing, somatic serotyping, and restriction endonuclease analysis. J Vet Diagn Invest **16**:121-125.
82. **Euzéby, J. P.** 2010. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature.
83. **Ewers, C.** 2004. Molekulare epidemiologische Analysen von Bakterien der Gattungen *Pasteurella* und *Mannheimia* zur Etablierung valider Diagnostika auf der Basis von Multiplex-Polymeraseketten-Reaktionen. Inaugural-Dissertation. Freie Universität, Berlin.
84. **Ewers, C., A. Lübke-Becker und L. H. Wieler.** 2004. [*Mannheimia haemolytica* and the pathogenesis of pneumonic pasteurellosis]. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. **3-4**:97-115.
85. **Ewers, C., A. Luebke-Becker, A. Bethe, S. Kiessling, M. Filter und L. H. Wieler.** 2006. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. Vet. Microbiol. **114**:304-317.
86. **Ewers, C., A. Luebke-Becker und L. H. Wieler.** 2004. [*Pasteurella*: insights into the virulence determinants of a heterogenous bacterial type]. Berl. Muench. Tierarztl. Wochenschr. **117**:367-386.
87. **Foged, N. T., J. P. Nielsen und S. E. Jorsal.** 1989. Protection against progressive atrophic rhinitis by vaccination with *Pasteurella multocida* toxin purified by monoclonal antibodies. Vet Rec **125**:7-11.
88. **Foged, N. T., J. P. Nielsen und K. B. Pedersen.** 1988. Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol **26**:1419-1420.
89. **Foged, N. T., K. B. Pedersen und F. Elling.** 1987. Characterization and biological effects of the *Pasteurella multocida* toxin. FEMS Microbiol Lett **43**:45-51.
90. **Foley, S. L., A. M. Lynne und R. Nayak.** 2009. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. Infect Genet Evol **9**:430-440.
91. **Forest, K. T. und J. A. Tainer.** 1997. Type-4 pilus-structure: outside to inside and top to bottom--a minireview. Gene **192**:165-169.
92. **Foster, G., H. M. Ross, H. Malnick, A. Willems, R. A. Hutson, R. J. Reid und M. D. Collins.** 2000. *Phocoenobacter uteri* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Pasteurellaceae* Pohl (1979) 1981 isolated from a harbour porpoise (*Phocoena phocoena*). Int J Syst Evol Microbiol **50 Pt 1**:135-139.
93. **Fuller, T. E., M. J. Kennedy und D. E. Lowery.** 2000. Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis. Microb. Pathog. **29**:25-38.
94. **Fussing, V., J. P. Nielsen, M. Bisgaard und A. Meyling.** 1999. Development of a typing system for epidemiological studies of porcine toxin-producing *Pasteurella multocida* ssp. *multocida* in Denmark. Vet Microbiol **65**:61-74.
95. **Galdiero, M., A. Folgore, I. Nuzzo und E. Galdiero.** 2000. Neutrophil adhesion and transmigration through bovine endothelial cells in vitro by protein H and LPS of *Pasteurella multocida*. Immunobiology **202**:226-238.

96. **Ganfield, D. J., P. A. Rebers und K. L. Heddlestone.** 1976. Immunogenic and toxic properties of a purified lipopolysaccharide-protein complex from *Pasteurella multocida*. *Infect Immun* **14**:990-999.
97. **Ganiere, J. P., F. Escande, G. Andre und M. Larrat.** 1993. Characterization of *Pasteurella* from gingival scrapings of dogs and cats. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **16**:77-85.
98. **Gardner, I. A., R. Kasten, G. J. Eamens, K. P. Snipes und R. J. Anderson.** 1994. Molecular fingerprinting of *Pasteurella multocida* associated with progressive atrophic rhinitis in swine herds. *J Vet Diagn Invest* **6**:442-447.
99. **Garrido, M. E., M. Bosch, A. Bigas, I. Badiola, J. Barbe und M. Llagostera.** 2008. Heterologous protective immunization elicited in mice by *Pasteurella multocida fur ompH*. *Int Microbiol* **11**:17-24.
100. **Gatto, N. T., S. M. Dabo, R. E. Hancock und A. W. Confer.** 2002. Characterization of, and immune responses of mice to, the purified OmpA-equivalent outer membrane protein of *Pasteurella multocida* serotype A:3 (Omp28). *Vet Microbiol* **87**:221-235.
101. **Gautier, A. L., D. Dubois, F. Escande, J. L. Avril, P. Trieu-Cuot und O. Gaillot.** 2005. Rapid and accurate identification of human isolates of *Pasteurella* and related species by sequencing the *sodA* gene. *J Clin Microbiol* **43**:2307-2314.
102. **Glisson, J. R. und I. H. Cheng.** 1991. In vivo antigen expression by *Pasteurella multocida*. *Avian Dis* **35**:392-396.
103. **Glisson, J. R., M. D. Contreras, I. H. Cheng und C. Wang.** 1993. Cross-protection studies with *Pasteurella multocida* bacterins prepared from bacteria propagated in iron-depleted medium. *Avian Dis* **37**:1074-1079.
104. **Glorioso, J. C., G. W. Jones, H. G. Rush, L. J. Pentler, C. A. Darif und J. E. Coward.** 1982. Adhesion of type A *Pasteurella multocida* to rabbit pharyngeal cells and its possible role in rabbit respiratory tract infections. *Infect Immun* **35**:1103-1109.
105. **Goel, G., A. K. Puniya, C. N. Aguilar und K. Singh.** 2005. Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Die Naturwissenschaften* **92**:497-503.
106. **Goldstein, E. J.** 1992. Bite wounds and infection. *Clin Infect Dis* **14**:633-638.
107. **Gottschalk, A.** 1960. Correlation between composition, structure, shape and function of a salivary mucoprotein. *Nature* **186**:949-951.
108. **Green, B. A., M. E. Vazquez, G. W. Zlotnick, G. Quigley-Reape, J. D. Swarts, I. Green, J. L. Cowell, C. D. Bluestone und W. J. Doyle.** 1993. Evaluation of mixtures of purified *Haemophilus influenzae* outer membrane proteins in protection against challenge with nontypeable *H. influenzae* in the chinchilla otitis media model. *Infect Immun* **61**:1950-1957.
109. **Gregersen, R. H., C. Neubauer, H. Christensen, A. M. Bojesen, M. Hess und M. Bisgaard.** 2009. Comparative studies on [*Pasteurella*] *testudinis* and [*P.*] *testudinis*-like bacteria and proposal of *Chelonobacter oris* gen. nov., sp. nov. as a new member of the family *Pasteurellaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**:1583-1588.
110. **Gunawardana, G. A., K. M. Townsend und 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.
111. **Haesebrouck, F., F. Pasmans, K. Chiers, D. Maes, R. Ducatelle und A. Decostere.** 2004. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Vet Microbiol* **100**:255-268.
112. **Hall, W. F., D. P. Bane, C. R. Kilroy und D. L. Essex-Sorlie.** 1990. A model for the induction of *Pasteurella multocida* type-A pneumonia in pigs. *Can J Vet Res* **54**:238-243.
113. **Hancock, R. D., L. C. Fallavena und L. A. Ribeiro.** 1991. Pneumonic pasteurellosis due to *P. multocida* in a flock of lambs in Brazil. *Vet Rec* **128**:154-155.
114. **Hansen, L. M. und D. C. Hirsh.** 1989. Serum resistance is correlated with encapsulation of avian strains of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol* **21**:177-184.
115. **Harper, M., J. D. Boyce und B. Adler.** 2006. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiol Lett* **265**:1-10.

116. **Harper, M., A. D. Cox, F. St Michael, I. W. Wilkie, J. D. Boyce und B. Adler.** 2004. A heptosyltransferase mutant of *Pasteurella multocida* produces a truncated lipopolysaccharide structure and is attenuated in virulence. *Infect Immun* **72**:3436-3443.
117. **Hassan, A. K. und A. A. Mustafa.** 1985. Isolation of *Pasteurella multocida* type B from an outbreak of haemorrhagic septicaemia in camels in the Sudan. *Rev Elev Med Vet Pays Trop* **38**:31-33.
118. **Hatfaludi, T., K. Al-Hasani, J. D. Boyce und B. Adler.** 2010. Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol.*
119. **Heddleston, K. L., J. E. Gallagher und P. A. Rebers.** 1970. Fowl cholera: immune response in turkeys. *Avian Dis* **14**:626-635.
120. **Heddleston, K. L., T. Goodson, L. Leibovitz und C. I. Angstrom.** 1972. Serological and biochemical characteristics of *Pasteurella multocida* from free-flying birds and poultry. *Avian Dis.* **16**:729-734.
121. **Heddleston, K. L. und P. A. Rebers.** 1972. Fowl cholera: cross-immunity induced in turkeys with formalin-killed in-vivo-propagated *Pasteurella multocida*. *Avian Dis* **16**:578-586.
122. **Heizmann, E. (ed.).** 2009. Tierärztliche Umschau - Impfstoffe & Sera für Tiere. E. Heizmann.
123. **Hensel, A. und W. Lubitz.** 1997. Vaccination by aerosols: modulation of clearance mechanisms in the lung. *Behring Inst Mitt*:212-219.
124. **Hiramune, T. und M. C. de Alwis.** 1982. Haemorrhagic septicemia carrier status of cattle and buffaloes in Sri Lanka. *Trop Anim Health Prod* **14**:91-92.
125. **Hodgson, J. C., A. Finucane, M. P. Dagleish, S. Ataei, R. Parton und J. G. Coote.** 2005. Efficacy of vaccination of calves against hemorrhagic septicemia with a live *aroA* derivative of *Pasteurella multocida* B:2 by two different routes of administration. *Infect Immun* **73**:1475-1481.
126. **Hofacre, C. L. und J. R. Glisson.** 1986. A serotypic survey of *Pasteurella multocida* isolated from poultry. *Avian Dis* **30**:632-633.
127. **Holst, E., J. Rollof, L. Larsson und J. P. Nielsen.** 1992. Characterization and distribution of *Pasteurella* species recovered from infected humans. *J Clin Microbiol* **30**:2984-2947.
128. **Homchampa, P., R. A. Strugnell und B. Adler.** 1997. Cross protective immunity conferred by a marker-free *aroA* mutant of *Pasteurella multocida*. *Vaccine* **15**:203-208.
129. **Homchampa, P., R. A. Strugnell und B. Adler.** 1992. Molecular analysis of the *aroA* gene of *Pasteurella multocida* and vaccine potential of a constructed *aroA* mutant. *Mol Microbiol* **6**:3585-3593.
130. **Horadagoda, N. U., K. Belak, M. C. De Alwis, T. G. Wijewardana, A. I. Gomis und A. A. Vipulasiri.** 1998. Immunoperoxidase evaluation of buffalo tissues for acute hemorrhagic septicemia. *Annals of the New York Academy of Sciences* **849**:494-496.
131. **Horadagoda, N. U., J. C. Hodgson, G. M. Moon, T. G. Wijewardana und P. D. Eckersall.** 2002. Development of a clinical syndrome resembling haemorrhagic septicaemia in the buffalo following intravenous inoculation of *Pasteurella multocida* serotype B:2 endotoxin and the role of tumour necrosis factor-alpha. *Res. Vet. Sci.* **72**:194-200.
132. **Hu, S. P., L. J. Felice, V. Sivanandan und S. K. Maheswaran.** 1986. Siderophore production by *Pasteurella multocida*. *Infect Immun* **54**:804-810.
133. **Huber, B. S., D. V. Allred, J. C. Carmen, D. D. Frame, D. G. Whiting, J. R. Cryan, T. R. Olson, P. J. Jackson, K. Hill, M. T. Laker und R. A. Robison.** 2002. Random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism analyses of *Pasteurella multocida* isolates from fatal fowl cholera infections. *J Clin Microbiol* **40**:2163-2168.
134. **Hunt, M. L., D. J. Boucher, J. D. Boyce und B. Adler.** 2001. In vivo-expressed genes of *Pasteurella multocida*. *Infect Immun* **69**:3004-3012.

135. **Hwang, E. J., H. T. Holmes, B. P. Zehfus, N. M. Patton und M. Matsumoto.** 1986. Characterization of antigen purified from type 3 strains of *Pasteurella multocida* and its use for an enzyme-linked immunosorbent assay. *Lab Anim Sci* **36**:633-639.
136. **Ifeanyi, F. I. und W. E. Bailie.** 1992. Passive protection of mice with antiserum to neuraminidase from *Pasteurella multocida* serotype A:3. *Vet Res Commun* **16**:97-105.
137. **Isaacson, R. E. und E. Trigo.** 1995. Pili of *Pasteurella multocida* of porcine origin. *FEMS Microbiol Lett* **132**:247-251.
138. **Jacques, M., M. Belanger, M. S. Diarra, M. Dargis und F. Malouin.** 1994. Modulation of *Pasteurella multocida* capsular polysaccharide during growth under iron-restricted conditions and in vivo. *Microbiology* **140 (Pt 2)**:263-270.
139. **Jacques, M., M. Kobisch, M. Belanger und F. Dugal.** 1993. Virulence of capsulated and noncapsulated isolates of *Pasteurella multocida* and their adherence to porcine respiratory tract cells and mucus. *Infect Immun* **61**:4785-4792.
140. **Jaglic, Z., Z. Kucerova, K. Nedbalcova, P. Hlozek und M. Bartos.** 2004. Identification of *Pasteurella multocida* Serogroup F isolates in rabbits. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* **51**:467-469.
141. **Jaglic, Z., Z. Kucerova, K. Nedbalcova, I. Pavlik, P. Alexa und M. Bartos.** 2005. Characterisation and comparison of *Pasteurella multocida* isolated from different species in the Czech Republic: capsular PCR typing, ribotyping and dermonecrotin production. *Vet.Med. - Czech* **50**:345 -354.
142. **Jalava, K., A. Hensel, M. Szostak, S. Resch und W. Lubitz.** 2002. Bacterial ghosts as vaccine candidates for veterinary applications. *J Control Release* **85**:17-25.
143. **Jamaludin, R., P. J. Blackall, M. F. Hansen, S. Humphrey und M. Styles.** 2005. Phenotypic and genotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolated from pigs at slaughter in New Zealand. *N Z Vet J* **53**:203-207.
144. **Janson, H., B. Carl n, A. Cervin, A. Forsgren, A. B. Magnusdottir, S. Lindberg und T. Runer.** 1999. Effects on the ciliated epithelium of protein D-producing and -nonproducing nontypeable *Haemophilus influenzae* in nasopharyngeal tissue cultures. *J Infect Dis* **180**:737-746.
145. **Kabay, M. J., A. R. Mercy, J. M. Lloyd und G. M. Robertson.** 1992. Vaccine efficacy for reducing turbinate atrophy and improving growth rate in piggeries with endemic atrophic rhinitis. *Aust Vet J* **69**:101-103.
146. **Kalorey, D. R., S. Yuvaraj, S. S. Vanjari, P. S. Gunjal, N. B. Dhanawade, S. B. Barbuddhe und A. G. Bhandarkar.** 2008. PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates from an outbreak of pasteurellosis in Indian pigs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **31**:459-465.
147. **Kamp, E. M. und T. G. Kimman.** 1988. Induction of nasal turbinate atrophy in germ-free pigs, using *Pasteurella multocida* as well as bacterium-free crude and purified dermonecrotic toxin of *P multocida*. *Am J Vet Res* **49**:1844-1849.
148. **Kasten, R. W., T. E. Carpenter, K. P. Snipes und D. C. Hirsh.** 1997. Detection of *Pasteurella multocida*-specific DNA in turkey flocks by use of the polymerase chain reaction. *Avian Dis.* **41**:676-682.
149. **Kasten, R. W., L. M. Hansen, J. Hinojoza, D. Bieber, W. W. Ruehl und D. C. Hirsh.** 1995. *Pasteurella multocida* produces a protein with homology to the P6 outer membrane protein of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun* **63**:989-993.
150. **Kasten, R. W., P. S. Wakenell, S. Ahmad, T. D. Yilma und D. C. Hirsh.** 1997. Lack of protection against avian cholera by vaccination with recombinant P6-like protein from *Pasteurella multocida*. *Avian Dis* **41**:972-976.
151. **Kim, C. J. und K. V. Nagaraja.** 1990. DNA fingerprinting for differentiation of field isolates from reference vaccine strains of *Pasteurella multocida* in turkeys. *Am J Vet Res* **51**:207-210.
152. **Kimura, A., K. T. Mountzouros, D. A. Relman, S. Falkow und J. L. Cowell.** 1990. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin: evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model. *Infect Immun* **58**:7-16.

153. **Klaassen, J. M., B. L. Bernard und R. F. DiGiacomo.** 1985. Enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin G antibody to *Pasteurella multocida* in rabbits. *J Clin Microbiol* **21**:617-621.
154. **Knight, J. B., Y. Y. Huang, S. A. Halperin, R. Anderson, A. Morris, A. Macmillan, T. Jones, D. S. Burt, G. Van Nest und S. F. Lee.** 2006. Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant filamentous haemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Clin Exp Immunol* **144**:543-551.
155. **Kohler, H., B. Lemser, G. Muller und A. Saalmuller.** 1997. Early changes in the phenotypic composition of lymphocytes in the bronchoalveolar lavage of pigs after aerogenic immunization with *Pasteurella multocida* aerosols. *Vet Immunol Immunopathol* **58**:277-286.
156. **Kuhnert, P., B. Korczak, E. Falsen, R. Straub, A. Hoops, P. Boerlin, J. Frey und R. Mutters.** 2004. *Nicoletella semolina* gen. nov., sp. nov., a new member of *Pasteurellaceae* isolated from horses with airway disease. *J Clin Microbiol* **42**:5542-5548.
157. **Kuhnert, P., E. Scholten, S. Haefner, D. Mayor und J. Frey.** 2010. *Basfia succiniciproducens* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Pasteurellaceae* isolated from bovine rumen. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**:44-50.
158. **Lainson, F. A., N. Thomson, H. A. Rowe, P. R. Langford, K. D. Aitchison, W. Donachie und J. S. Kroll.** 1996. Occurrence of [copper, zinc]-cofactored superoxide dismutase in *Pasteurella haemolytica* and its serotype distribution. *FEMS Microbiol Lett* **142**:11-17.
159. **Lariviere, S., L. Leblanc, K. R. Mittal und G. P. Martineau.** 1992. Characterization of *Pasteurella multocida* from nasal cavities of piglets from farms with or without atrophic rhinitis. *J. Clin. Microbiol.* **30**:1398-1401.
160. **Lax, A. J., N. Chanter, G. D. Pullinger, T. Higgins, J. M. Staddon und E. Rozenfurt.** 1990. Sequence analysis of the potent mitogenic toxin of *Pasteurella multocida*. *FEBS Lett.* **277**:59-64.
161. **Lee, J., Y. B. Kim und M. Kwon.** 2007. Outer membrane protein H for protective immunity against *Pasteurella multocida*. *J Microbiol* **45**:179-184.
162. **Lee, M. D., J. R. Glisson und R. E. Wooley.** 1992. Factors affecting endotoxin release from the cell surface of avian strains of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol* **31**:369-378.
163. **Lee, M. D., R. E. Wooley und J. R. Glisson.** 1994. Invasion of epithelial cell monolayers by turkey strains of *Pasteurella multocida*. *Avian Dis* **38**:72-77.
164. **Lehmann, K. B. und R. Neumann.** 1899. X. Atlas mit Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der Speziellen Bakteriologischen Diagnostik, 3rd ed., Munich.
165. **Leotta, G. A., I. Chinen, G. B. Vigo, M. Pecoraro und M. Rivas.** 2006. Outbreaks of avian cholera in Hope Bay, Antarctica. *J Wildl Dis* **42**:259-270.
166. **Liao, C. M., C. Huang, S. L. Hsuan, Z. W. Chen, W. C. Lee, C. I. Liu, J. R. Winton und M. S. Chien.** 2006. Immunogenicity and efficacy of three recombinant subunit *Pasteurella multocida* toxin vaccines against progressive atrophic rhinitis in pigs. *Vaccine* **24**:27-35.
167. **Lichtensteiger, C. A., S. M. Steenbergen, R. M. Lee, D. D. Polson und E. R. Vimr.** 1996. Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. *J Clin Microbiol* **34**:3035-3039.
168. **Liu, D., M. L. Lawrence und F. W. Austin.** 2004. Specific PCR identification of *Pasteurella multocida* based on putative transcriptional regulator genes. *J Microbiol Methods* **58**:263-267.
169. **Lo, M., J. D. Boyce, I. W. Wilkie und B. Adler.** 2004. Characterization of two lipoproteins in *Pasteurella multocida*. *Microbes Infect* **6**:58-67.
170. **Loosmore, S. M., Y. P. Yang, D. C. Coleman, J. M. Shortreed, D. M. England und M. H. Klein.** 1997. Outer membrane protein D15 is conserved among *Haemophilus influenzae* species and may represent a universal protective antigen against invasive disease. *Infect. Immun.* **65**:3701-3707.

171. **Lu, Y. S., H. N. Aguila, W. C. Lai und S. P. Pakes.** 1991. Antibodies to outer membrane proteins but not to lipopolysaccharide inhibit pulmonary proliferation of *Pasteurella multocida* in mice. *Infect Immun* **59**:1470-1475.
172. **Lugtenberg, B., R. van Boxtel und M. de Jong.** 1984. Atrophic rhinitis in swine: correlation of *Pasteurella multocida* pathogenicity with membrane protein and lipopolysaccharide patterns. *Infect Immun* **46**:48-54.
173. **Lugtenberg, B., R. van Boxtel, D. Evenberg, M. de Jong, P. Storm und J. Frik.** 1986. Biochemical and immunological characterization of cell surface proteins of *Pasteurella multocida* strains causing atrophic rhinitis in swine. *Infect Immun* **52**:175-182.
174. **Luo, Y., J. R. Glisson, M. W. Jackwood, R. E. Hancock, M. Bains, I. H. Cheng und C. Wang.** 1997. Cloning and characterization of the major outer membrane protein gene (ompH) of *Pasteurella multocida* X-73. *J Bacteriol* **179**:7856-7864.
175. **Luo, Y., Q. Zeng, J. R. Glisson, M. W. Jackwood, I. H. Cheng und C. Wang.** 1999. Sequence analysis of *Pasteurella multocida* major outer membrane protein (OmpH) and application of synthetic peptides in vaccination of chickens against homologous strain challenge. *Vaccine* **17**:821-831.
176. **Madsen, E. B., M. Bisgaard, R. Mutters und K. B. Pedersen.** 1985. Characterization of *Pasteurella* species isolated from lungs of calves with pneumonia. *Can J Comp Med* **49**:63-67.
177. **Magyar, T., T. Donko und F. Kovacs.** 2008. Atrophic rhinitis vaccine composition triggers different serological profiles that do not correlate with protection. *Acta Vet Hung* **56**:27-40.
178. **Magyar, T., V. L. King und F. Kovacs.** 2002. Evaluation of vaccines for atrophic rhinitis—a comparison of three challenge models. *Vaccine* **20**:1797-1802.
179. **Maiden, M. C.** 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* **60**:561-588.
180. **Maiden, M. C., J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman und B. G. Spratt.** 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:3140-3145.
181. **Marandi, M. und K. R. Mittal.** 1996. Characterization of an outer membrane protein of *Pasteurella multocida* belonging to the OmpA family. *Vet Microbiol* **53**:303-314.
182. **Marchart, J., G. Dropmann, S. Lechleitner, T. Schlapp, G. Wanner, M. P. Szostak und W. Lubitz.** 2003. *Pasteurella multocida*- and *Pasteurella haemolytica*-ghosts: new vaccine candidates. *Vaccine* **21**:3988-3997.
183. **Mariana, S. und R. Hirst.** 2000. The immunogenicity and pathogenicity of *Pasteurella multocida* isolated from poultry in Indonesia. *Vet Microbiol* **72**:27-36.
184. **Marois, C., C. Fablet, O. Gaillot, H. Morvan, F. Madec und M. Kobisch.** 2009. Molecular diversity of porcine and human isolates of *Pasteurella multocida*. *J Appl Microbiol*.
185. **Maslog, F. S., M. Motobu, N. Hayashida, K. Yoshihara, T. Morozumi, M. Matsuura und Y. Hirota.** 1999. Effects of four antigenic fractions of *Pasteurella multocida* serotype A on phagocytosis of chicken peripheral blood leukocytes. *J Vet Med Sci* **61**:283-285.
186. **Maslog, F. S., M. Motobu, N. Hayashida, K. Yoshihara, T. Morozumi, M. Matsuura und Y. Hirota.** 1999. Effects of the lipopolysaccharide-protein complex and crude capsular antigens of *Pasteurella multocida* serotype A on antibody responses and delayed type hypersensitivity responses in the chicken. *J Vet Med Sci* **61**:565-567.
187. **Mathy, N. L., J. P. Mathy, R. P. Lee, J. Walker, S. Lofthouse und E. N. Meeusen.** 2002. Pathological and immunological changes after challenge infection with *Pasteurella multocida* in naive and immunized calves. *Vet Immunol Immunopathol* **85**:179-188.

188. **May, B. J., Q. Zhang, L. L. Li, M. L. Paustian, T. S. Whittam und V. Kapur.** 2001. Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. Proc Natl Acad Sci U S A **98**:3460-3465.
189. **Mendes, S., K. P. Carmichael, J. C. Nunnally, J. R. Glisson, I. H. Cheng und B. G. Harmon.** 1994. Lesions resulting from attempted Shwartzman reaction in turkey poults inoculated with *Pasteurella multocida* lipopolysaccharide. Avian Dis **38**:790-796.
190. **Mifflin, J. K. und P. J. Blackall.** 2001. Development of a 23S rRNA-based PCR assay for the identification of *Pasteurella multocida*. Letters in applied microbiology **33**:216-221.
191. **Mitchison, M., L. Wei, J. Kwang, I. Wilkie und B. Adler.** 2000. Overexpression and immunogenicity of the Oma87 outer membrane protein of *Pasteurella multocida*. Vet Microbiol **72**:91-96.
192. **Mizan, S., A. Henk, A. Stallings, M. Maier und M. D. Lee.** 2000. Cloning and characterization of sialidases with 2-6' and 2-3' sialyl lactose specificity from *Pasteurella multocida*. J Bacteriol **182**:6874-6883.
193. **Moorkamp, L., H. Nathues, J. Spergser, R. Tegeler und E. G. Beilage.** 2008. Detection of respiratory pathogens in porcine lung tissue and lavage fluid. Vet J **175**:273-275.
194. **Moreno, A. M., M. R. Baccaro, A. J. Ferreira und A. F. Pestana De Castro.** 2003. Use of single-enzyme amplified fragment length polymorphism for typing *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* isolates from pigs. J Clin Microbiol **41**:1743-1746.
195. **Muhairwa, A. P., J. P. Christensen und M. Bisgaard.** 2001. Relationships among *Pasteurellaceae* isolated from free ranging chickens and their animal contacts as determined by quantitative phenotyping, ribotyping and REA-typing. Vet Microbiol **78**:119-137.
196. **Mullan, P. B. und A. J. Lax.** 1998. *Pasteurella multocida* toxin stimulates bone resorption by osteoclasts via interaction with osteoblasts. Calcif Tissue Int **63**:340-345.
197. **Mullen, L. M., S. P. Nair, J. M. Ward, A. N. Rycroft, R. J. Williams, G. Robertson, N. J. Mordan und B. Henderson.** 2008. Novel adhesin from *Pasteurella multocida* that binds to the integrin-binding fibronectin FnIII9-10 repeats. Infect Immun **76**:1093-1104.
198. **Muller, G., H. Kohler, R. Diller und W. Erler.** 2000. Antibody reactions after aerogenous or subcutaneous immunization of pigs with *Pasteurella multocida* antigens. Vaccine **19**:751-757.
199. **Muller, H. E. und C. Krasemann.** 1974. [The virulence of *Pasteurella multocida* strains and their neuraminidase production (author's transl)]. Zentralbl Bakteriolog Orig A **229**:391-400.
200. **Muniandy, N., J. Edgar, J. B. Woolcock und T. K. S. Mukkur.** 1992. Presented at the Pasteurellosis in production animals. The International Workshop on Pasteurellosis in Production Animals., Bali, Indonesia: Australian Centre for International and Agricultural Research.
201. **Munson, R. S., Jr. und K. Sasaki.** 1993. Protein D, a putative immunoglobulin D-binding protein produced by *Haemophilus influenzae*, is glycerophosphodiester phosphodiesterase. J Bacteriol **175**:4569-4571.
202. **Murphy, A. C. und E. Rozengurt.** 1992. *Pasteurella multocida* toxin selectively facilitates phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis by bombesin, vasopressin, and endothelin. Requirement for a functional G protein. J Biol Chem **267**:25296-25303.
203. **Murray, P. R., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover und R. H. Tenover.** 1999. Manual of Clinical Microbiology, 7th ed. ASM Press, Washington.
204. **Mutters, R., P. Ihm, S. Pohl, W. Frederiksen und W. Mannheim.** 1985. Reclassification of the Genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the Basis of Deoxyribonucleic Acid Homology, with Proposals for the New Species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. Int J Syst Bacteriol **35**:309-322.

205. **Mutters, R., W. Mannheim und M. Bisgaard.** 1989. Taxonomy of the group., p. 3-34. In C. Adlam und J. M. Rutter (ed.), *Pasteurella* and Pasteurellosis. Academic Press, London.
206. **Nagai, S., S. Someno und T. Yagihashi.** 1994. Differentiation of toxigenic from non-toxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by PCR. J Clin Microbiol **32**:1004-1010.
207. **Nakai, T., A. Sawata und K. Kume.** 1985. Intracellular locations of dermonecrotic toxins in *Pasteurella multocida* and in *Bordetella bronchiseptica*. Am J Vet Res **46**:870-874.
208. **Nakai, T., A. Sawata, M. Tsuji und K. Kume.** 1984. Characterization of dermonecrotic toxin produced by serotype D strains of *Pasteurella multocida*. Am J Vet Res **45**:2410-2413.
209. **Namioka, S. und M. Murata.** 1961. Serological studies on *Pasteurella multocida*. II. Characteristics of somatic (O) antigen of the organism. Cornell Vet **51**:507-521.
210. **Nielsen, J. P., N. T. Foged, V. Sorensen, K. Barfod, A. Bording und S. K. Petersen.** 1991. Vaccination against progressive atrophic rhinitis with a recombinant *Pasteurella multocida* toxin derivative. Can J Vet Res **55**:128-138.
211. **Nikunen, S., H. Hartel, T. Orro, E. Neuvonen, R. Tanskanen, S. L. Kivela, S. Sankari, P. Aho, S. Pyorala, H. Saloniemi und T. Soveri.** 2007. Association of bovine respiratory disease with clinical status and acute phase proteins in calves. Comp Immunol Microbiol Infect Dis **30**:143-151.
212. **Norskov-Lauritsen, N. und M. Kilian.** 2006. Reclassification of *Actinobacillus actinomycesemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycesemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. Int J Syst Evol Microbiol **56**:2135-2146.
213. **Nsofor, M. N., P. E. Ryals und F. R. Champlin.** 2006. Subcellular distribution of Plp-40, a lipoprotein in a serotype A strain of *Pasteurella multocida*. Biochim Biophys Acta **1760**:1160-1166.
214. **Ogunnariwo, J. A., J. Alcantara und A. B. Schryvers.** 1991. Evidence for non-siderophore-mediated acquisition of transferrin-bound iron by *Pasteurella multocida*. Microb Pathog **11**:47-56.
215. **Ogunnariwo, J. A. und A. B. Schryvers.** 2001. Characterization of a novel transferrin receptor in bovine strains of *Pasteurella multocida*. J Bacteriol **183**:890-896.
216. **Oliveira, S. und C. Pijoan.** 2004. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control. Vet Microbiol **99**:1-12.
217. **Pasteur, L.** 1881. Sur les virus-vaccins du choléra des poules et du charbon. C R Trav Congr Int Dir Agronom session de Versailles:151-162.
218. **Pati, U. S., S. K. Srivastava, S. C. Roy und T. More.** 1996. Immunogenicity of outer membrane protein of *Pasteurella multocida* in buffalo calves. Vet Microbiol **52**:301-311.
219. **Paustian, M. L., B. J. May, D. Cao, D. Boley und V. Kapur.** 2002. Transcriptional response of *Pasteurella multocida* to defined iron sources. J Bacteriol **184**:6714-6720.
220. **Pedersen, K. B. und K. Barfod.** 1981. The aetiological significance of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of swine. Nord Vet Med **33**:513-522.
221. **Pedersen, K. B. und K. Barfod.** 1982. Effect on the incidence of atrophic rhinitis of vaccination of sows with a vaccine containing *Pasteurella multocida* toxin. Nord Vet Med **34**:293-302.
222. **Petersen, K. D., H. Christensen, M. Bisgaard und J. E. Olsen.** 2001. Genetic diversity of *Pasteurella multocida* fowl cholera isolates as demonstrated by ribotyping and 16S rRNA and partial atpD sequence comparisons. Microbiology **147**:2739-2748.
223. **Petersen, S. K. und N. T. Foged.** 1989. Cloning and expression of the *Pasteurella multocida* toxin gene, toxA, in *Escherichia coli*. Infect Immun **57**:3907-3913.

224. **Petersen, S. K., N. T. Foged, A. Bording, J. P. Nielsen, H. K. Riemann und P. L. Frandsen.** 1991. Recombinant derivatives of *Pasteurella multocida* toxin: candidates for a vaccine against progressive atrophic rhinitis. *Infect Immun* **59**:1387-1393.
225. **Pettit, R. K., M. R. Ackermann und R. B. Rimler.** 1993. Receptor-mediated binding of *Pasteurella multocida* dermonecrotic toxin to canine osteosarcoma and monkey kidney (vero) cells. *Lab Invest* **69**:94-100.
226. **Potter, A. A., A. B. Schryvers, J. A. Ogunnariwo, W. A. Hutchins, R. Y. Lo und T. Watts.** 1999. Protective capacity of the *Pasteurella haemolytica* transferrin-binding proteins TbpA and TbpB in cattle. *Microb Pathog* **27**:197-206.
227. **Prado, M. E., S. M. Dabo und A. W. Confer.** 2005. Immunogenicity of iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* A:3 in cattle: molecular characterization of the immunodominant heme acquisition system receptor (HasR) protein. *Vet Microbiol* **105**:269-280.
228. **Pruimboom, I. M., R. B. Rimler, M. R. Ackermann und K. A. Brogden.** 1996. Capsular hyaluronic acid-mediated adhesion of *Pasteurella multocida* to turkey air sac macrophages. *Avian Dis* **40**:887-893.
229. **Pullinger, G. D., T. Bevir und A. J. Lax.** 2004. The *Pasteurella multocida* toxin is encoded within a lysogenic bacteriophage. *Mol. Microbiol.* **51**:255-269.
230. **Pullinger, G. D., R. Sowdhamini und A. J. Lax.** 2001. Localization of functional domains of the mitogenic toxin of *Pasteurella multocida*. *Infect Immun* **69**:7839-7850.
231. **Rajeev, S., S. A. Kania, R. V. Nair, J. T. McPherson, R. N. Moore und D. A. Bemis.** 2001. *Bordetella bronchiseptica* fimbrial protein-enhanced immunogenicity of a *Mannheimia haemolytica* leukotoxin fragment. *Vaccine* **19**:4842-4850.
232. **Ratledge, C. und L. G. Dover.** 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**:881-941.
233. **Register, K. B. und K. D. DeJong.** 2006. Analytical verification of a multiplex PCR for identification of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from swine. *Vet Microbiol* **117**:201-210.
234. **Register, K. B., R. E. Sacco und S. L. Brockmeier.** 2007. Immune response in mice and swine to DNA vaccines derived from the *Pasteurella multocida* toxin gene. *Vaccine* **25**:6118-6128.
235. **Rhoades, K. R. und R. B. Rimler.** 1987. Capsular groups of *Pasteurella multocida* isolated from avian hosts. *Avian Dis* **31**:895-898.
236. **Rhoades, K. R. und R. B. Rimler.** 1989. Fowl Cholera, p. 95-113. In K. R. Rhoades und R. B. Rimler (ed.), *Pasteurella and Pasteurellosis*. Academic Press.
237. **Rhoades, K. R. und R. B. Rimler.** 1988. Virulence of avian capsular serogroup B *Pasteurella multocida* for turkey poults. *Avian Dis* **32**:121-123.
238. **Rhoades, K. R., R. B. Rimler und R. A. Bagley.** 1992. Fowl cholera epornitic: antigenic characterization and virulence of selected *Pasteurella multocida* isolates. *Avian Dis* **36**:84-87.
239. **Rhodes, M. B., C. W. New, Jr., P. K. Baker, A. Hogg und N. R. Underdahl.** 1987. *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic type D *Pasteurella multocida* as agents of severe atrophic rhinitis of swine. *Vet Microbiol* **13**:179-187.
240. **Rimler, R. B.** 1990. Comparisons of *Pasteurella multocida* lipopolysaccharides by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis to determine relationship between group B and E hemorrhagic septicemia strains and serologically related group A strains. *J Clin Microbiol* **28**:654-659.
241. **Rimler, R. B.** 2001. Purification of a cross-protective antigen from *Pasteurella multocida* grown in vitro and in vivo. *Avian Dis* **45**:572-580.
242. **Rimler, R. B.** 2000. Restriction endonuclease analysis using *HhaI* and *HpaII* to discriminate among group B *Pasteurella multocida* associated with haemorrhagic septicaemia. *J Med Microbiol* **49**:81-87.
243. **Rimler, R. B., P. A. Rebers und K. R. Rhoades.** 1979. Fowl cholera: cross-protection induced by *Pasteurella multocida* separated from infected turkey blood. *Avian Dis* **23**:730-741.

244. **Rimler, R. B. und K. R. Rhoades.** 1989. *Pasteurella multocida*, p. 38-73. In R. B. Rimler und K. R. Rhoades (ed.), *Pasteurella* and Pasteurellosis. Academic Press.
245. **Rimler, R. B. und K. R. Rhoades.** 1987. Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida*. J Clin Microbiol **25**:615-618.
246. **Rimler, R. B. und K. R. Rhoades.** 1989. Solubilization of membrane-associated cross-protection factor(s) of *Pasteurella multocida*. Avian Dis **33**:258-263.
247. **Roberts, I. S.** 1996. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. Annu Rev Microbiol **50**:285-315.
248. **Roberts, M., D. Maskell, P. Novotny und G. Dougan.** 1990. Construction and characterization in vivo of *Bordetella pertussis aroA* mutants. Infect Immun **58**:732-739.
249. **Roberts, R. S.** 1947. An immunological study of *Pasteurella septica*. J. Comp. Pathol.:261-278.
250. **Rosenbusch, C. T. und I. A. Merchant.** 1939. A Study of the Hemorrhagic Septicemia *Pasteurellae*. J Bacteriol **37**:69-89.
251. **Rubies, X., J. Casal und C. Pijoan.** 2002. Plasmid and restriction endonuclease patterns in *Pasteurella multocida* isolated from a swine pyramid. Vet Microbiol **84**:69-78.
252. **Ruffolo, C. G. und B. Adler.** 1996. Cloning, sequencing, expression, and protective capacity of the oma87 gene encoding the *Pasteurella multocida* 87-kilodalton outer membrane antigen. Infect Immun **64**:3161-3167.
253. **Ruffolo, C. G., B. H. Jost und B. Adler.** 1998. Iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* and their role in immunity. Vet Microbiol **59**:123-137.
254. **Ruffolo, C. G., J. M. Tennent, W. P. Michalski und B. Adler.** 1997. Identification, purification, and characterization of the type 4 fimbriae of *Pasteurella multocida*. Infect Immun **65**:339-343.
255. **Rutter, J. M.** 1985. Atrophic rhinitis in swine. Adv Vet Sci Comp Med **29**:239-279.
256. **Ryals, P. E., M. N. Nsofor, J. M. Watt und F. R. Champlin.** 1998. Relationship between serotype A encapsulation and a 40-kDa lipoprotein in *Pasteurella multocida*. Curr Microbiol **36**:274-277.
257. **Samuel, M. D., D. J. Shaddock, D. R. Goldberg, V. Baranyuk, L. Sileo und J. I. Price.** 1999. Antibodies against *Pasteurella multocida* in snow geese in the western Arctic. J Wildl Dis **35**:440-449.
258. **Sasaki, K. und R. S. Munson, Jr.** 1993. Protein D of *Haemophilus influenzae* is not a universal immunoglobulin D-binding protein. Infect Immun **61**:3026-3031.
259. **Scharmman, W., R. Drzeniek und H. Blobel.** 1970. Neuraminidase of *Pasteurella multocida*. Infect Immun **1**:319-320.
260. **Schmid, H.** 1987. Differenzierung von *Pasteurella*-Stämmen von Hunden und Katzen und Untersuchungen über Kapsel-Antigene (Carter) an Isolaten von Wiederkäuern und kleinen Haustieren. Inaugural-Dissertation. Freie Universität, Berlin.
261. **Seo, J., H. Pyo, S. Lee, J. Lee und T. Kim.** 2009. Expression of 4 truncated fragments of *Pasteurella multocida* toxin and their immunogenicity. Can J Vet Res **73**:184-189.
262. **Shivachandra, S. B., A. A. Kumar, J. Amaranath, S. Joseph, S. K. Srivastava und P. Chaudhuri.** 2005. Cloning and characterization of *tbpA* gene encoding transferrin-binding protein (TbpA) from *Pasteurella multocida* serogroup B:2 (strain P52). Vet Res Commun **29**:537-542.
263. **Shivachandra, S. B., A. A. Kumar und P. Chaudhuri.** 2008. Molecular characterization of avian strains of *Pasteurella multocida* serogroup-A:1 based on amplification of repetitive regions by PCR. Comp Immunol Microbiol Infect Dis **31**:47-62.
264. **Shivachandra, S. B., A. A. Kumar, R. Gautam, S. Joseph, M. K. Saxena, P. Chaudhuri und S. K. Srivastava.** 2006. Characterization of avian strains of *Pasteurella multocida* by restriction endonuclease and amplified fragment length polymorphism. Res Vet Sci **81**:8-18.
265. **Shivachandra, S. B., A. A. Kumar, R. Gautam, M. K. Saxena, P. Chaudhuri und S. K. Srivastava.** 2005. Detection of multiple strains of *Pasteurella multocida* in fowl

- cholera outbreaks by polymerase chain reaction-based typing. *Avian Pathol* **34**:456-462.
266. **Siju, J., A. A. Kumar, S. B. Shivachandra, P. Chaudhuri, S. K. Srivastava und V. P. Singh.** 2007. Cloning and characterization of type 4 fimbrial gene (*ptfA*) of *Pasteurella multocida* serogroup B:2 (strain P52). *Vet Res Commun* **31**:397-404.
267. **Smith, R. H., L. A. Babiuk und P. H. Stockdale.** 1981. Intranasal immunization of mice against *Pasteurella multocida*. *Infect Immun* **31**:129-135.
268. **Snipes, K. P. und D. C. Hirsh.** 1986. Association of complement sensitivity with virulence of *Pasteurella multocida* isolated from turkeys. *Avian Dis* **30**:500-504.
269. **Snipes, K. P., D. C. Hirsh, R. W. Kasten, L. M. Hansen, D. W. Hird, T. E. Carpenter und R. H. McCapes.** 1989. Use of an rRNA probe and restriction endonuclease analysis to fingerprint *Pasteurella multocida* isolated from turkeys and wildlife. *J Clin Microbiol* **27**:1847-1853.
270. **Sonntag, I., H. Schwarz, Y. Hirota und U. Henning.** 1978. Cell envelope and shape of *Escherichia coli*: multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and other major outer membrane proteins. *J Bacteriol* **136**:280-285.
271. **Srikumar, R., L. G. Mikael, P. D. Pawelek, A. Khamessan, B. F. Gibbs, M. Jacques und J. W. Coulton.** 2004. Molecular cloning of haemoglobin-binding protein HgbA in the outer membrane of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* **150**:1723-1734.
272. **Srivastava, S. K.** 1998. Outer membrane protein of *Pasteurella multocida* serotype B:2 is immunogenic and antiphagocytic. *Indian J Exp Biol* **36**:530-532.
273. **St Michael, F., J. Li und A. D. Cox.** 2005. Structural analysis of the core oligosaccharide from *Pasteurella multocida* strain X73. *Carbohydr Res* **340**:1253-1257.
274. **St Michael, F., E. Vinogradov, J. Li und A. D. Cox.** 2005. Structural analysis of the lipopolysaccharide from *Pasteurella multocida* genome strain Pm70 and identification of the putative lipopolysaccharide glycosyltransferases. *Glycobiology* **15**:323-333.
275. **Staddon, J. M., C. J. Barker, A. C. Murphy, N. Chanter, A. J. Lax, R. H. Michell und E. Rozengurt.** 1991. *Pasteurella multocida* toxin, a potent mitogen, increases inositol 1,4,5-trisphosphate and mobilizes Ca²⁺ in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* **266**:4840-4847.
276. **Steenbergen, S. M., C. A. Lichtensteiger, R. Caughlan, J. Garfinkle, T. E. Fuller und E. R. Vimr.** 2005. Sialic Acid metabolism and systemic pasteurellosis. *Infect Immun* **73**:1284-1294.
277. **Sthitmatee, N., S. Numee, E. Kawamoto, H. Sasaki, K. Yamashita, N. Takahashi, Y. Kataoka und T. Sawada.** 2008. Protection of chickens from fowl cholera by vaccination with recombinant adhesive protein of *Pasteurella multocida*. *Vaccine* **26**:2398-2407.
278. **Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrener, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. Hancock, S. Lory und M. V. Olson.** 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**:959-964.
279. **Subaaharan, S., L. L. Blackall und P. J. Blackall.** 2010. Development of a multi-locus sequence typing scheme for avian isolates of *Pasteurella multocida*. *Vet Microbiol*:354-361.
280. **Tabatabaei, M., Z. Liu, A. Finucane, R. Parton und J. Coote.** 2002. Protective immunity conferred by attenuated *aroA* derivatives of *Pasteurella multocida* B:2 strains in a mouse model of hemorrhagic septicemia. *Infect Immun* **70**:3355-3362.
281. **Tabatabai, L. B. und E. S. Zehr.** 2004. Identification of five outer membrane-associated proteins among cross-protective factor proteins of *Pasteurella multocida*. *Infect Immun* **72**:1195-1198.

282. **Takashima, H., H. Sakai, T. Yanai und T. Masegi.** 2001. Detection of antibodies against *Pasteurella multocida* using immunohistochemical staining in an outbreak of rabbit pasteurellosis. *J Vet Med Sci* **63**:171-174.
283. **Tatum, F. M., L. B. Tabatabai und R. E. Briggs.** 2009. Protection against fowl cholera conferred by vaccination with recombinant *Pasteurella multocida* filamentous hemagglutinin peptides. *Avian Dis* **53**:169-174.
284. **Tatum, F. M., L. B. Tabatabai und R. E. Briggs.** 2009. Sialic acid uptake is necessary for virulence of *Pasteurella multocida* in turkeys. *Microb Pathog* **46**:337-344.
285. **Tatum, F. M., A. G. Yersin und R. E. Briggs.** 2005. Construction and virulence of a *Pasteurella multocida* *phaB2* mutant in turkeys. *Microb. Pathog.* **39**:9-17.
286. **Thibault, S., R. Drolet, M. C. Germain, S. D'Allaire, R. Laroche und R. Magar.** 1998. Cutaneous and systemic necrotizing vasculitis in swine. *Vet Pathol* **35**:108-116.
287. **Thomson, J. R., N. MacIntyre, L. E. Henderson und C. S. Meikle.** 2001. Detection of *Pasteurella multocida* in pigs with porcine dermatitis and nephropathy syndrome. *Vet Rec* **149**:412-417.
288. **To, H., S. Someno und S. Nagai.** 2005. Development of a genetically modified non-toxicogenic *Pasteurella multocida* toxin as a candidate for use in vaccines against progressive atrophic rhinitis in pigs. *Am J Vet Res* **66**:113-118.
289. **Townsend, K. M., J. D. Boyce, J. Y. Chung, A. J. Frost und B. Adler.** 2001. Genetic organization of *Pasteurella multocida* *cap* Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J. Clin. Microbiol.* **39**:924-929.
290. **Townsend, K. M., H. J. Dawkins und J. M. Papadimitriou.** 1997. REP-PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates that cause haemorrhagic septicaemia. *Res Vet Sci* **63**:151-155.
291. **Townsend, K. M., A. J. Frost, C. W. Lee, J. M. Papadimitriou und H. J. Dawkins.** 1998. Development of PCR assays for species- and type-specific identification of *Pasteurella multocida* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **36**:1096-1100.
292. **Trevisan.** 1887. Sul micrococco della rabbia e sulla possibilita di riconoscere durante il periodo d'incubazione, all'esame del sangue della persona morsicata, se ha contratta l'infezione rabbica. *Rend. R. 1st. Lomb. Sci. Let. Ser. II* **20**:88-105.
293. **Tuomanen, E. und A. Weiss.** 1985. Characterization of two adhesins of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory-epithelial cells. *J Infect Dis* **152**:118-125.
294. **van Belkum, A., P. T. Tassios, L. Dijkshoorn, S. Haeggman, B. Cookson, N. K. Fry, V. Fussing, J. Green, E. Feil, P. Gerner-Smidt, S. Brisse und M. Struelens.** 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infect* **13 Suppl 3**:1-46.
295. **van Diemen, P. M., M. F. de Jong, G. de Vries Reilingh, P. van der Hel und J. W. Schrama.** 1994. Intranasal administration of *Pasteurella multocida* toxin in a challenge-exposure model used to induce subclinical signs of atrophic rhinitis in pigs. *Am J Vet Res* **55**:49-54.
296. **Vasfi Marandi, M., J. Harel und K. R. Mittal.** 1997. Identification by monoclonal antibodies of serotype D strains of *Pasteurella multocida* representing various geographic origins and host species. *J Med Microbiol* **46**:603-610.
297. **Veken, J. W., B. Oudega, J. Luirink und F. K. de Graaf.** 1994. Binding of bovine transferrin by *Pasteurella multocida* serotype B:2,5, a strain which causes haemorrhagic septicaemia in buffalo and cattle. *FEMS Microbiol Lett* **115**:253-257.
298. **Verma, R. und T. N. Jaiswal.** 1998. Haemorrhagic septicaemia vaccines. *Vaccine* **16**:1184-1192.
299. **Wang, C. und J. R. Glisson.** 1994. Identification of common antigens of serotype 1 and serotype 3 *Pasteurella multocida* in poultry expressed in vivo. *Avian Dis* **38**:334-340.
300. **Ward, C. K., S. R. Lumbley, J. L. Latimer, L. D. Cope und E. J. Hansen.** 1998. *Haemophilus ducreyi* secretes a filamentous hemagglutinin-like protein. *J Bacteriol* **180**:6013-6022.
301. **Westling, K., A. Farra, B. Cars, A. G. Ekblom, K. Sandstedt, B. Settergren, B. Wretling und C. Jorup.** 2006. Cat bite wound infections: a prospective clinical and

- microbiological study at three emergency wards in Stockholm, Sweden. *J Infect* **53**:403-407.
302. **White, D. J., W. L. Jolley, C. W. Purdy und D. C. Straus.** 1995. Extracellular neuraminidase production by a *Pasteurella multocida* A:3 strain associated with bovine pneumonia. *Infect Immun* **63**:1703-1709.
303. **Wilson, B. A., X. Zhu, M. Ho und L. Lu.** 1997. *Pasteurella multocida* toxin activates the inositol triphosphate signaling pathway in *Xenopus* oocytes via G(q)alpha-coupled phospholipase C-beta1. *J Biol Chem* **272**:1268-1275.
304. **Wirth, T., D. Falush, R. Lan, F. Colles, P. Mensa, L. H. Wieler, H. Karch, P. R. Reeves, M. C. Maiden, H. Ochman und M. Achtman.** 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* **60**:1136-1151.
305. **Wu, J. R., J. H. Shien, H. K. Shieh, C. F. Chen und P. C. Chang.** 2007. Protective immunity conferred by recombinant *Pasteurella multocida* lipoprotein E (PlpE). *Vaccine* **25**:4140-4148.
306. **Yang, Y., W. R. Thomas, P. Chong, S. M. Loosmore und M. H. Klein.** 1998. A 20-kilodalton N-terminal fragment of the D15 protein contains a protective epitope(s) against *Haemophilus influenzae* type a and type b. *Infect Immun* **66**:3349-3354.
307. **Zhao, G., C. Pijoan, M. P. Murtaugh und T. W. Molitor.** 1992. Use of restriction endonuclease analysis and ribotyping to study epidemiology of *Pasteurella multocida* in closed swine herds. *Infect Immun* **60**:1401-1405.
308. **Zywietz, A., A. Gohla, M. Schmelz, G. Schultz und S. Offermanns.** 2001. Pleiotropic effects of *Pasteurella multocida* toxin are mediated by Gq-dependent and -independent mechanisms. involvement of Gq but not G11. *J Biol Chem* **276**:3840-3845.

8. ANHANG

8.1. Nährmedien

8.1.1. flüssige Nährmedien

BHI-Medium	Brain Heart Infusion (Oxoid)	37 g
	A. bidest	ad 1000 ml
	Autoklavieren (121 °C, 15 min)	

8.1.2. feste Nährmedien

Schafblutagar Oxoid

TSYE-Blutagar	Pankreatisches Pepton (Casein)	17,0 g/l
	Agar	15,0 g/l
	Hefeextrakt	6,0 g/l
	NaCl	5,0 g/l
	Sojabohnenextrakt	3,0 g/l
	K ₂ HPO ₄	2,5 g/l
	Glukose	2,5 g/l
	pH	7,3 ± 0,2

Autoklavieren (121 °C, 15 min; abkühlen lassen auf 45-50 °C, Zugabe von 5 % defibriniertem Schafblut)

8.2. Reagenzien

Cytochromoxidase-reagenz	1,4 Phenylendiamoniumdichlorid	0,5 g
	Aqua bidest.	ad 50,0 ml
	Verwendung ab dem nächsten Tag	

Indolreagenz (Kovacs)	p-Dimethylaminobenzaldehyd	5,0 g
	Amylalkohol (100 %)	75,0 ml
	HCl (spez. Gewicht 1,19)	25,0 ml
	p- Dimethylaminobenzaldehyd bei 50-60°C im Wasserbad in Amylalkohol lösen; abkühlen lassen; unter ständigem Rühren HCl zugeben	

Katalasereagenz	H ₂ O ₂ -Lösung	3 %
------------------------	---------------------------------------	-----

8.3. Lösungen, Puffer und Enzyme

8.3.1. Puffer, Lösungen und Enzyme für die Polymerase-Kettenreaktion

10x PCR Puffer	Tris-HCl, pH 8,4 KCl	200 mM 500 mM
Taq Polymerase		5 U/μl
MgCl₂-Lösung		50 mM
dNTP	PCR Nukleotid-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	je Nukleotid 10 mM
Mix 20	10 x PCR-Puffer MgCl ₂ dNTPs Millipore-Wasser	150 μl 60 μl 20 μl 1090 μl

8.3.2. Puffer und Lösungen für die horizontale Agarosegel-Elektrophorese

EDTA-Lösung (500 mM)	EDTA	18.62 g/100 ml pH 8,0 mit NaOH einstellen
TBE-Puffer Stammlsg. 10x konzentriert (890 M Tris-HCl; 890 mM Borsäu- re; 500 mM EDTA pH 8)	Tris-HCl Borsäure EDTA-Lsg pH 8,0 Aqua bidest	107,82 g 55,03 g 40,0 ml ad 1000 ml
TAE-Puffer Stammlsg. 10x konzentriert	Tris-HCl Eisessig EDTA-Lsg. pH 8,0 Aqua bidest	242 g 57,1 ml 100 ml ad 1000 ml
Ladepuffer	Bromphenolblau Glycerin EDTA-Lsg. pH 8,0 Tris-HCl pH 8,0 Aqua bidest.	40 mg 20 mg 8 ml 400 μl 11,6 ml
Agarose	Agarose TBE (1 x konz.)	1,0-1,5 g ad 100 ml
	oder	
Ethidiumbromidlösung	Agarose TAE (1 x konz.)	0,7 g ad 100 ml 1%

8.3.3. Puffer und Lösungen für Southern Blot und DNS-DNS-Hybridisierung

HCl (250 mM)	HCl A. bidest.	10,8 ml 489,2 ml
Denaturierungslösung (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl)	NaOH NaCl A. bidest.	20 g 87,66 g ad 1000 ml
Neutralisationslösung (0,5 M Tris-HCl, 3 M NaCl; pH 7,5)	Tris-HCl NaCl A. bidest.	60,57 g 175,32 g ad 1000 ml pH-Wert mit HCl einstellen
20 x SSC (3 M NaCl; 300 mM Natriumcitrat (C ₆ H ₅ O ₇), pH 7,0)	NaCl C ₆ H ₅ O ₇ A. bidest	175,32 g 88,23 g ad 1000 ml pH-Wert mit HCl einstellen
2 x SSC	20 x SSC A. bidest.	100 ml ad 1000 ml
5 x SSC	20 x SSC A. bidest.	250 ml ad 1000 ml
Prähybridisierungslösung (5 x SSC, 1 % BRSS; 0,1 % N-Lauroylsarcosine; 0,02 % SDS)	20 x SSC 10 % w/V BRSS 10 % N-Lauroylsarcosine 10 % W/V SDS A. bidest	12,5 ml 5,0 ml 1,0 ml 0,1 ml ad 50 ml
Hybridisierungslösung	Prähybridisierungslösung DNS-Sonde	5 ml Endkonzentration im Medium: 20-30 ng
Waschpuffer 1 (Stringenz 1) (2 x SSC, 0,1 SDS)	20 x SSC 10 % SDS A. bidest.	40 ml 4 ml ad 400 ml
Waschpuffer 2 (Stringenz 2) (0,1 x SSC; 0,1 % SDS)	20 x SSC 10 % SDS A. bidest.	2 ml 4 ml ad 400 ml
Maleinsäurepuffer (Puffer 1) (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7.5, 0,3 % Tween 20)	1 M Maleinsäure 1 M NaCl Tween 20 A. bidest.	100 ml 150 ml 3 ml ad 1000 ml Tween 20 erst nach dem Autoklavieren (121 °C, 15 min) zufügen. pH-Wert mit NaOH einstellen
Puffer 2 (Puffer 1 ohne Tween mit BRSS)	10 % BRSS Puffer 1 (ohne Tween)	10 ml ad 100 ml
Detektionspuffer (Puffer 3) (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 9,5)	Tris-HCl (pH 9.5) NaCl A. bidest.	100 ml 100 ml ad 1000 ml

Antikörperkonjugat	Anti-DIG-AP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) Verdünnung entsprechend den Herstellerangaben	
CSPD-Lösung	Verdünnung entsprechend den Herstellerangaben (Roche Diagnostics, Mannheim)	
Blocking Reagenz Stock Solution (BRSS) (10x konz)	BRSS Maleinsäurepuffer (ohne Tween) Vorsichtig erwärmen, nicht kochen	10 g ad 100 ml
Blocking Reagenz (1x)	10 x BRSS Maleinsäurepuffer (ohne Tween)	10 g ad 100 ml
Stringenz I (2 x SSC, 0,1 % SDS)	20 x SSC 10 % SDS A. bidest.	40 ml 4,0 ml ad 400 ml
Stringenz II (0,1 x SSC, 0,1 % SDS)	20 x SSC 10 % SDS A. bidest.	2,0 ml 4,0 ml ad 400 ml
SDS (10 %)	SDS A. bidest.	20 g ad 200 ml
Stripping Puffer (0.2 M NaOH, 0.1 % SDS)	3 M NaOH 10 % SDS A. bidest.	33.3 ml 5 ml ad 500 ml
Maleinsäure (1M)	Maleinsäure A. bidest.	58.035 g ad 500 ml
Natriumchlorid (1 M)	NaCl A. bidest.	58.443 g ad 1000 ml

8.4. Benötigte Materialien zum Aufbau eines Southern Blot (Kapillarblot)

Blotschale und Blottisch

Glas- oder Kunststoffplatte

Gewicht, 1 kg

Whatman-Papier

Zellstoff

Parafilm

Nylonmembran, positiv geladen

2 l 20 x SSC

Je 200 ml 2 x SSC und 5 x SSC

Glasröhrchen

8.5. Protokoll zur 16S rRNA-Ribotypisierung

Vorbereiten der Membran	20 ml Prähyb (pro 100 cm ² Membran) bei 68°C rotierend im Ofen	60 min
Vorbereiten der Sonde	5 ml Prähybridisierungslösung mit Sonde bis zu einer Endkonzentration von 20 - 30 ng/ml mischen 95°C Wasserbad Sofort auf Eis	10 min 3 min
Hybridisierung	5 ml Hybridisierungslösung 68°C; rotierend im Ofen	über Nacht
Waschen	Waschpuffer 1; RT; rotierend im Ofen Waschpuffer 2; 68°C; rotierend im Ofen	2x 5 min 2 x 15 min
Nachweis markierter DNS	Puffer 1 + Tween 20; RT; rotierend im Ofen Puffer 2 bei RT; rotierend im Ofen Anti-Digoxigenin- AP 3 Min zentrifugieren; Überstand: im Verhältnis 1:10.000 mit Puffer 2 mischen; RT; rotierend im Ofen Puffer 1 + Tween; bei RT; rotierend im Ofen Detektionspuffer; RT; rotierend im Ofen <i>CSPD im Verhältnis 1:100 mit Puffer 3 mischen; mäanderförmig auf Membran tropfen Membran luftblasenfrei in Klarsichtfolie verschließen</i>	1 min 60 min 30 min 2 x 15 min 2 min

8.6. Bezugsquellen von Geräten, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Biodeal®, 04416 Markkleeberg	Agarose; Elektrophoresekammer
Bio-Rad Laboratories GmbH, 80939 München	PowerSupply
Biometra, 37079 Göttingen	Thermocycler Trio-Thermoblock, Whatman-Papier
Biozym Diagnostics GmbH, 31840 Hess. Oldendorf	Biozym Masterpure DNA Purification Kit
Eppendorf, 50389 Wesseling-Berzdorf	Eppendorf Pipetten 10 µl, 100 µl, 200 µl und 1000 µl, Reaktionsgefäße (1,5 ml), Thermomixer 5436, Tischzentrifuge
Fermentas GmbH, 68789 St. Leon-Rot	Hpall + Enzympuffer
Gesellschaft für Labortechnik, 30938 Burgwedel	Wasserbad
Greiner Labortechnik, 72632 Frickenhausen	Einwegimpfösen 10 µl; Cryoröhrchen Cryo S, 2 ml
Heidolph Elektro GmbH & CoKG, 93309 Kehlheim	Schüttler
Heiland GmbH, Leipzig	Filmsafe-Kassetten für Röntgenfilme
Heraeus, 63405 Hanau	Brutschrank Typ B6060; Sterile Werkbank Lamin Air® HB 2448
Herolab GmbH, 69168 Wiesloch	Geldokumentation; Kamera E.A.S.Y 429K; Transilluminator UVT-28MP, Sony Video Graphic Printer VP890 CE
Hybaid GmbH, 69123 Heidelberg	Hybridisierungsöfen Shake'n'Stack; Power Supply PS250
IKA Labortechnik, 79219 Staufen i. Br.	Heizgerät und Magnetrührer
Invitrogen GmbH, 64293 Darmstadt	100 bp DNA-Marker; 1 kb DNA-Marker
Kodak GmbH, 70327 Stuttgart	BioMax™ Kassetten; Entwickler LX24; Fixierer AL4; X-Omat AR-Film
Merck, 64271 Darmstadt	Bromphenolblau, Glycerin, Natriumchlorid, Tween 20
MWG-Biotech Ag, 85560 Ebersberg	Oligonukleotid-Primer
Nunc GmbH, 65203 Wiesbaden	Gefriertruhe -70 °C

Oxoid GmbH, 46483 Wesel	Nährmedien
Promega GmbH, 68199 Mannheim	PCR nucleotide mix
Rapidozym GmbH, 12103 Berlin	Magnesiumchlorid, PCR-Puffer, Taq-polymerase
Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim	Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film (18x24 cm; 100 sheets); Agarose Gel Extraktionskit; Blocking Reagent; PCR DIG Probe Synthesis Kit; Anti-DIG-AP; CSPD; PCR Probe Synthesis Kit; Nylon-Membrane, positiv geladen; High Pure PCR Purification Kit
Roth GmbH, 76185 Karlsruhe	Ethanol; Handschuhe; Isopropanol; Labor-Timer; Maleinsäure; NaOH; HCl; SDS; Tris; Zellstoff; EDTA
Sarstedt AG & Co., 51582 Nürnberg	Lagerkästen; PCR-Tubes 0,2 ml; Pipettenspitzen (0,5 – 1000 µl)
Sartorius GmbH, 37070 Göttingen	Waage Klimat LA 230S und BP 2100
Schott GmbH, 74889 Hofheim a. Ts.	pH-Meter CG 840
Sigma Chemie GmbH, 82041 Deisenhofen	N-Lauroylsarcosine
Thermo Scientific, 53113 Bonn	Nanodrop 1000
Th. Karow GmbH, 14089 Berlin	Eismaschine

8.7. Tabellarische Darstellung aller untersuchter Isolate, vorberichtlicher Informationen sowie der Ergebnisse der durchgeführten PCR-Untersuchungen, Ribotypisierung und MLST

StaSa	Vorbericht	Resp.-trakt	kmt	capA	capD	capF	cap neg	hssB	tbpA	toxA	oma87	nanB	nanH	pflaB	hgbB	hgba	exbB/tonB	ptfa	Ribo-typ	ST	STC
PmIMT-1	k.A.	k.A.	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
PmIMT-2	k.A.	k.A.	1	-	1	-	-	1	-	1	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT10060	Klinisch krank	k.A.	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT10313	Klinisch krank	k.A.	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT10314	Klinisch krank	k.A.	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT10315	Klinisch krank	k.A.	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT10316	Klinisch krank	k.A.	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT10317	Klinisch krank	k.A.	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT10319	Klinisch krank	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT10328	Klinisch krank	k.A.	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT10329	Klinisch krank	k.A.	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT10330	Klinisch krank	k.A.	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT10331	Klinisch krank	k.A.	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT10339	Klinisch krank	k.A.	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT10342	Klinisch krank	k.A.	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT10778	Klinisch krank/PAR	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT10779	Klinisch krank/PAR	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT10780	Klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT10781	Klinisch krank/PAR	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT10814	k.A.	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT10815	k.A.	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT10816	k.A.	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT10817	k.A.	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	13	13
IMT10818	k.A.	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	13	13
IMT10917	k.A.	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT10918	Klinisch krank/PAR	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT10919	Klinisch krank/PAR	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT10920	Klinisch krank/PAR	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT10921	Klinisch krank/PAR	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	

StaSa	Vorbericht	Resp.-trakt	kmt	capA	capD	capF	cap neg	hssB	tbpA	toxA	oma87	nanB	nanH	pflhaB	hgbB	hgbA	exbB/tonB	ptfa	Ribo-typ	ST	STC
IMT10922	klinisch krank/PAR	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT10923	klinisch unauffällig	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	50	
IMT10924	klinisch krank/PAR	oRT	1	-	1	-	-	-	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT10928	k.A.	uRT	1	-	1	-	-	-	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT10936	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	-	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT10937	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	50	
IMT10938	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	-	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	50	
IMT10939	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	-	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT10940	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	-	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT10941	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	-	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT10942	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	-	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT10943	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1 n.t.		
IMT10944	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	-	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT10945	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1 n.t.		
IMT10946	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	IIA-1	13	13
IMT10947	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT10948	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-2	50	
IMT10949	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT10950	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-2	70	
IMT10951	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1 n.t.		
IMT10952	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-9	71	
IMT10970	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT10971	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT10972	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	-	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	50	
IMT10973	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT10974	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	-	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT10975	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	-	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT10976	klinisch unauffällig	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT10987	k.A.	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1 n.t.		
IMT10988	k.A.	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	IIA-3 n.t.		
IMT10989	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT10990	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT10991	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	1	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	50	
IMT10992	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	1	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		

StaSa	Vorbericht	Resp.-trakt	kmt	capA	capD	capF	cap neg	hssB	tbpA	toxA	oma87	nanB	nanH	pflhaB	hgbB	hgbA	exbB/tonB	ptfa	Ribo-typ	ST	STC
IMT10993	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IIA-1 n.t.		
IMT10994	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IIA-1 n.t.		
IMT10995	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT10996	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT10997	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	-	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 50		
IMT10998	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT10999	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT11000	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT11001	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	IIA-1 13	13	13
IMT11002	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	IIA-1 n.t.		
IMT11003	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	IIA-1 n.t.		
IMT11004	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IIA-1 72		
IMT11005	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	IIA-1 n.t.		
IMT11006	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	IIA-1 n.t.		
IMT11007	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	IIA-1 n.t.		
IMT11008	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	IIA-1 n.t.		
IMT11023	klinisch krank/andere	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11024	k.A.	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1 n.t.		
IMT11025	klinisch krank/andere	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT11026	k.A.	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT11027	k.A.	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	IIA-1 n.t.		
IMT11028	klinisch krank/PAR	oRT	1	1	-	-	-	1	-	1	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-3 50	50	50
IMT11029	klinisch krank/PAR	oRT	1	1	-	-	-	1	-	1	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 50	50	50
IMT11030	klinisch krank/PAR	oRT	1	1	-	-	-	1	-	1	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11031	k.A.	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11032	klinisch krank/andere	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IB-1 50	50	50
IMT11033	klinisch krank/andere	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT11034	klinisch krank/andere	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1 n.t.		
IMT11035	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11036	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT11037	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11038	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11039	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11040	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		

StaSa	Vorbericht	Resp.-trakt	kmt	capA	capD	capF	cap neg	hssB	tbpA	toxA	oma87	nanB	nanH	pfaB	hgbB	hgbA	exbB /tonB	ptfa	Ribo-typ	ST	STC
IMT11041	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11042	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11043	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-3	50	
IMT11044	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11045	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11046	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11047	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-6	76	
IMT11048	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11049	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11050	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11051	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11052	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11053	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11054	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11055	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11056	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11058	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11059	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11060	k.A.	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11061	klinisch krank	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	50	
IMT11062	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11063	klinisch krank	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11064	klinisch krank	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11065	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11066	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11067	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11068	klinisch krank	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	27	
IMT11069	klinisch krank	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11070	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11071	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11099	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11100	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11101	klinisch krank/andere	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	50	
IMT11102	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	

StaSa	Vorbericht	Resp.-trakt	kmt	capA	capD	capF	cap neg	hssB	tbpA	toxA	oma87	nanB	nanH	pflhaB	hgbB	hgbA	exbB/tonB	ptfa	Ribo-typ	ST	STC
IMT11103	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11104	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11106	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11107	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11108	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11109	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11110	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11111	klinisch krank/PAR	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11112	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	1	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	50	
IMT11113	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	IIA-3	9	
IMT11114	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11115	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11116	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11117	k.A.	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11118	k.A.	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	IIA-3	n.t.	
IMT11119	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11120	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IIA-3	9	
IMT11140	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11141	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11142	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11143	klinisch krank	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11144	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11147	klinisch krank	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-4	50	
IMT11148	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11149	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11150	k.A.	k.A.	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11151	k.A.	k.A.	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11152	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11154	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11156	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11157	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11158	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11159	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11160	klinisch unauffällig	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	50	

StaSa	Vorbericht	Resp.-trakt	kmt	capA	capD	capF	cap neg	hssB	tbpA	toxA	oma87	nanB	nanH	pflhaB	hgbB	hgbA	exbB /tonB	ptfa	Ribo-typ	ST	STC
IMT11161	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11162	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11163	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11164	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11165	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11166	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11167	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11168	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11169	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11170	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11171	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11172	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11173	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11174	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11175	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IIA-1 n.t.		
IMT11180	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT11181	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11182	klinisch krank	uRT	1	-	-	1	-	1	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	IIA-3	9	
IMT11264	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT11265	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11266	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11267	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT11268	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	50	
IMT11269	klinisch krank	uRT	1	-	-	-	1	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-5	73	
IMT11270	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11271	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11272	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT11273	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT11274	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT11275	klinisch krank	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11276	klinisch krank	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11277	klinisch krank	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11278	klinisch krank	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11279	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		

StaSa	Vorbericht	Resp.-trakt	kmt	capA	capD	capF	cap neg	hssB	tbpA	toxA	oma87	nanB	nanH	pflaB	hgbB	hgbA	exbB/tonB	ptfa	Ribo-typ	ST	STC
IMT11280	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11281	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11282	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11283	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11284	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11285	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11286	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11287	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11288	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	74	
IMT11289	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11290	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11291	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11292	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11296	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11297	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11298	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11299	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	13	13
IMT11300	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11301	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	1	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	50	
IMT11302	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	13	13
IMT11303	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11304	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11305	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11306	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IA-7	13	13
IMT11307	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IIA-1	50	
IMT11308	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IIA-1	50	
IMT11309	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11310	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11345	klinisch unauffällig	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11346	klinisch unauffällig	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11347	klinisch unauffällig	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11348	klinisch unauffällig	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11349	klinisch unauffällig	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11350	klinisch unauffällig	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	

StaSa	Vorbericht	Resp.-trakt	kmt	capA	capD	capF	cap neg	hssB	tbpA	toxA	oma87	nanB	nanH	pflhaB	hgbB	hgbA	exbB /tonB	ptfa	Ribo-typ	ST	STC
IMT11351	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11352	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11353	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	74	
IMT11354	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11355	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11356	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11357	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11358	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11359	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11360	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11361	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11362	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11363	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11364	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11365	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11366	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11367	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11368	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11369	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11370	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11371	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11372	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11373	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11374	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11376	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11377	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11378	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11379	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11380	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11381	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11382	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11397	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11398	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11399	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	

StaSa	Vorbericht	Resp.-trakt	kmt	capA	capD	capF	cap neg	hssB	tbpA	toxA	oma87	nanB	nanH	pfaB	hgbB	hgbA	exbB/tonB	ptfa	Ribo-typ	ST	STC
IMT11400	klinisch unauffällig	oRT	1	-	-	-	1	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-5	73	
IMT11401	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11402	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11403	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11404	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11405	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11406	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11407	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11408	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11410	Klinisch krank/andere	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11411	k.A.	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11412	Klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11413	Klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11414	Klinisch krank	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11415	Klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11416	Klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11417	Klinisch krank	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11418	Klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11419	Klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11420	Klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11421	Klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11507	Klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11508	Klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11509	Klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11510	Klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11511	Klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11512	Klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	75	
IMT11513	Klinisch krank/PAR	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11514	Klinisch krank/PAR	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11515	Klinisch krank/PAR	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11516	Klinisch krank/PAR	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11517	Klinisch krank/PAR	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11518	Klinisch krank/PAR	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11519	Klinisch krank/PAR	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	

StaSa	Vorbericht	Resp.-trakt	kmt	capA	capD	capF	cap neg	hssB	tbpA	toxA	oma87	nanB	nanH	pflaB	hgbB	hgbA	exbB /tonB	ptfa	Ribo-typ	ST	STC
IMT11520	klinisch krank/PAR	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11521	klinisch krank/PAR	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11522	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	IIA-1 n.t.		
IMT11523	klinisch unauffällig	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1 n.t.		
IMT11524	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11525	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11526	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	IIA-1	13	13
IMT11527	k.A.	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT11528	klinisch krank	uRT	1	-	1	-	-	1	-	1	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	50	50
IMT11529	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	IA-7	70	70
IMT11530	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT11531	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11532	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT11533	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT11534	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IIA-1 n.t.		
IMT11535	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT11536	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT11537	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT11538	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT11539	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT11540	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT11541	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11542	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT11543	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1 n.t.		
IMT11544	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT11568	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11569	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11570	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11571	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11572	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11573	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11576	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7 n.t.		
IMT11577	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		
IMT11578	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1 n.t.		

StaSa	Vorbericht	Resp.-trakt	kmt	capA	capD	capF	cap neg	hssB	tbpA	toxA	oma87	nanB	nanH	pflaB	hgbB	hgbA	exbB /tonB	ptfa	Ribo-typ	ST	STC
IMT11579	klinisch krank	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11580	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11581	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11582	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11583	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11584	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11585	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11586	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11587	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11669	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11670	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	50	
IMT11671	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11672	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11673	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11674	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11675	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11676	klinisch krank/andere	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IA-1	70	
IMT11677	klinisch unauffällig	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11678	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11679	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-8	27	
IMT11680	klinisch krank/andere	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11685	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IA-1	13	13
IMT11686	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IA-1	13	13
IMT11687	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11688	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11689	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11690	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11691	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11692	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11693	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11905	klinisch unauffällig	oRT	1	-	1	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11906	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11907	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11908	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	

StaSa	Vorbericht	Resp.-trakt	kmt	capA	capD	capF	cap neg	hssB	tbpA	toxA	oma87	nanB	nanH	pflaB	hgbB	hgbA	exbB/tonB	ptfa	Ribotyp	ST	STC
IMT11909	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT11910	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	13	13
IMT11911	klinisch unauffällig	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-7	n.t.	
IMT11950	k.A.	oRT	1	-	1	-	-	1	-	1	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	n.t.	
IMT11951	k.A.	oRT	1	-	1	-	-	1	-	1	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	50	
IMT1320	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT1769	klinisch krank/PAR	k.A.	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT1770	klinisch krank/PAR	k.A.	1	-	1	-	-	1	-	1	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	50	
IMT1771	klinisch krank/PAR	k.A.	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT4768	klinisch krank	k.A.	1	1	-	-	-	1	-	1	1	1	1	-	1	1	1	1	IA-1	50	
IMT6664	klinisch krank	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT6688	klinisch krank	oRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	
IMT6707	klinisch krank	uRT	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1	1	-	1	1	1	IIA-1	n.t.	

k.A.: keine Angabe; oRT: oberer Respirationstrakt; uRT: unterer Respirationstrakt; 1: positiv; -: negativ; n.t.: nicht getestet; ST: Sequenztyp; STC: Sequenztypkomplex

Publikationsverzeichnis

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Astrid Bethe, Lothar H. Wieler, Hans-J. Selbitz, Christa Ewers

Genetic diversity of porcine *Pasteurella multocida* strains from the respiratory tract of healthy and diseased swine

Veterinary Microbiology 139 (2009) 97-105

Danksagung

Herrn Prof. Dr. L. H. Wieler danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, seine stets freundliche, hilfsbereite und kompetente Unterstützung, seine offene Tür und die immer vorhandene Bereitschaft zu Gesprächen und Hilfestellung während der gesamten Zeit der Promotion.

Für die immer geduldige und kompetente Hilfe, für Denkanstöße, für Kaffeepausen, für ermutigende Worte und das Wissen, dass jede Frage gestellt werden kann, gebührt Dr. Christa Ewers mehr als nur Dank. An dieser Stelle muss er jedoch erst einmal genügen.

Für die freundschaftliche Aufnahme und die gute Atmosphäre danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und Tierseuchen. Es ist schön zu wissen, dass man bei allen Kollegen um Hilfe und Rat bitten kann und sie auch bekommt.

Für das gemeinsame Lachen an guten und die seelische Unterstützung an nicht so guten Tagen danke ich ebenfalls allen Mitarbeitern, vor allem „Büro 13“ und „Büro 11“ sowie Dr. Timo Homeier-Bachmann und Susanne Glodde.

Der IDT Biologika, besonders Herrn Prof. Dr. H. J. Selbitz danke ich sehr für die finanzielle Unterstützung während der Bearbeitung des Promotionsthemas.

Für die Überlassung der in dieser Arbeit untersuchten *P. multocida*-Isolate danke ich den einsendenden Instituten und Einrichtungen von Bund und Ländern sehr herzlich.

Schließlich und endlich: Für die immer vorhandene Unterstützung im Leben außerhalb des Institutes, für offene Ohren, für Ablenkung, Zuspruch und Widerworte danke ich meiner Familie und meinen Freunden, ohne die es für mich ein ziemlich leeres Leben wäre.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, Dezember 2010

Astrid Bethe