

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung von *Pasteurella multocida*-Subspezies und *Pasteurella*-Spezies

4.1.1 Biotypisierung

85 der insgesamt 272 Wildtypisolate wurden, da sie lediglich die Bezeichnung *Pasteurella*-Spezies trugen, auf die in den Tab. 8 und 9 aufgezeigten phänotypischen Merkmalsausprägungen untersucht. Aufgrund der Ergebnisse der biochemischen Tests konnten 58 dieser Isolate als *P. multocida* ssp. typisiert werden, während 27 Isolate nicht eindeutig einer *Pasteurella*-Spezies zugeordnet werden konnten und von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurden, so dass die Anzahl der im Folgenden untersuchten *P. multocida* ssp.-Wildtypstämme 245 betrug.

4.1.2 Molekularbiologische Typisierung

Sowohl die *P. multocida*-Wildtypisolate (245) als auch die Referenzstämme (44) wurden mittels DNS-DNS-Hybridisierung und Polymerase-Kettenreaktion auf Vorkommen und Verbreitung der bislang für *P. multocida* ssp. beschriebenen virulenzassoziierten Gene untersucht.

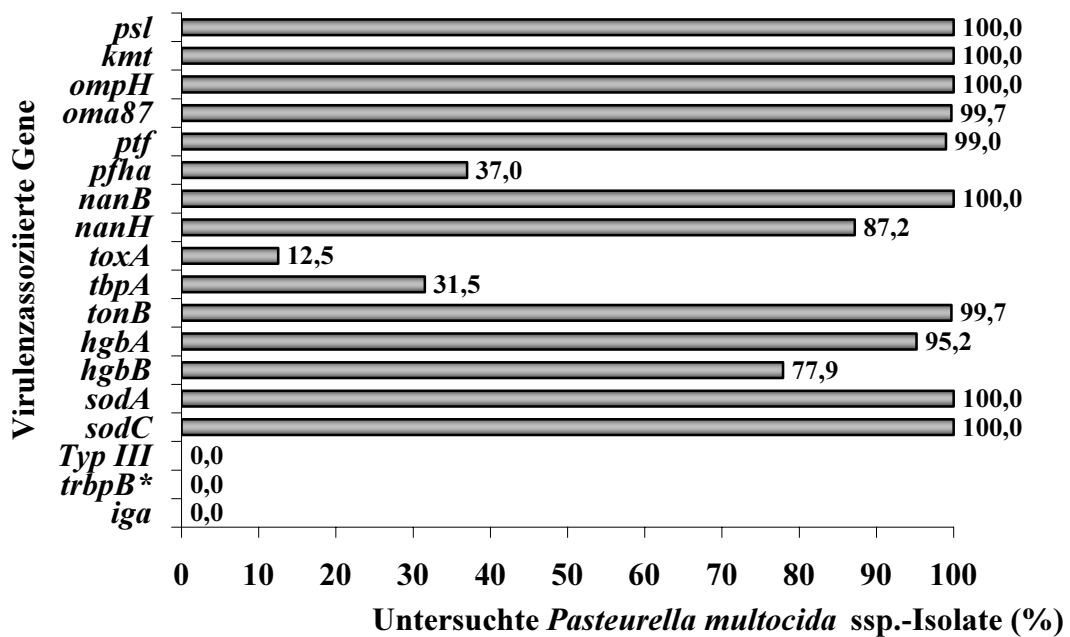
4.1.2.1 DNS-DNS-Hybridisierung

289 *Pasteurella multocida*-Isolate wurden in DNS-DNS-Hybridisierungs-Untersuchungen auf das Vorkommen der in Tab. 11-14 aufgeführten virulenzassoziierten Gene einbezogen. Zu 100 % konnten die als Spezies-spezifisch geltenden Gene *psl* und *kmt* sowie das für ein äußeres Membranprotein kodierende Gen *ompH* nachgewiesen werden. Das für die Untereinheit der *Pasteurella* Typ 4-Fimbrie kodierende Gen *ptf* sowie das für ein weiteres äußeres Membranprotein kodierende Gen *oma87* waren in 286 (99,0 %), respektive 288 (99,7 %) aller untersuchten Isolate vorhanden. Das Gen *tbpA* und der Genlocus *exbBD-tonB*, deren Produkte essentieller Bestandteil des Eisenakquirierungs-Systems sind, wurden in 91 (31,5 %) bzw. 288 (99,7 %) der untersuchten *P. multocida*-Isolate nachgewiesen. Die für

Hämin-bindende Proteine kodierenden Gene *hgbA* und *hgbB* waren in 95,2 % (275 Isolate) bzw. 77,9 % (225 Isolate) der untersuchten *P. multocida*-Stämme vorhanden.

Die vor allem für Kolonisationsfaktoren kodierenden Gene *nanB*, *nanH* und *pfha* waren in 289 (100 %), 252 (87,2 %) bzw. 93 (32,2 %) der untersuchten Isolate zu finden. Die Gene *sodA* und *sodC*, die für zwei Superoxid-Dismutasen kodieren, konnten zu 100 % in den Stämmen nachgewiesen werden. Schließlich war das für das Dermonekrotoxin kodierende Gen *toxA* in 36 (12,5 %) der untersuchten Isolate vorhanden.

In keinem der 289 untersuchten *P. multocida* ssp.-Stämme waren Gene bzw. Genabschnitte nachweisbar, die für den TypIII-Sekretionsmechanismus Gram-negativer Bakterien, des *M. haemolytica* Transferrin-bindenden Proteins B und für die *H. influenzae* Immunglobulin-Protease kodieren (Abb. 2).



* DNS-Sonde des *M. haemolytica* *trbpB*-Gens

Abb. 2: Nachweis virulenzassoziierter Gene bei *Pasteurella multocida* ssp.-Isolaten (n = 289) mittels DNS-DNS-Hybridisierung

Zur weiteren Charakterisierung der *Pasteurella sensu stricto*-Gruppe wurden ergänzend zu den *P. multocida* ssp. *multocida*-Isolaten repräsentativ einige Vertreter jeder Spezies dieser Gruppe mittels DNS-DNS-Hybridisierung untersucht (Tab. 21).

Tab. 21: Nachweis virulenzassoziierter Gene in *Pasteurella* ssp.- und -spp.-Isolaten mittels DNS-DNS-Hybridisierung

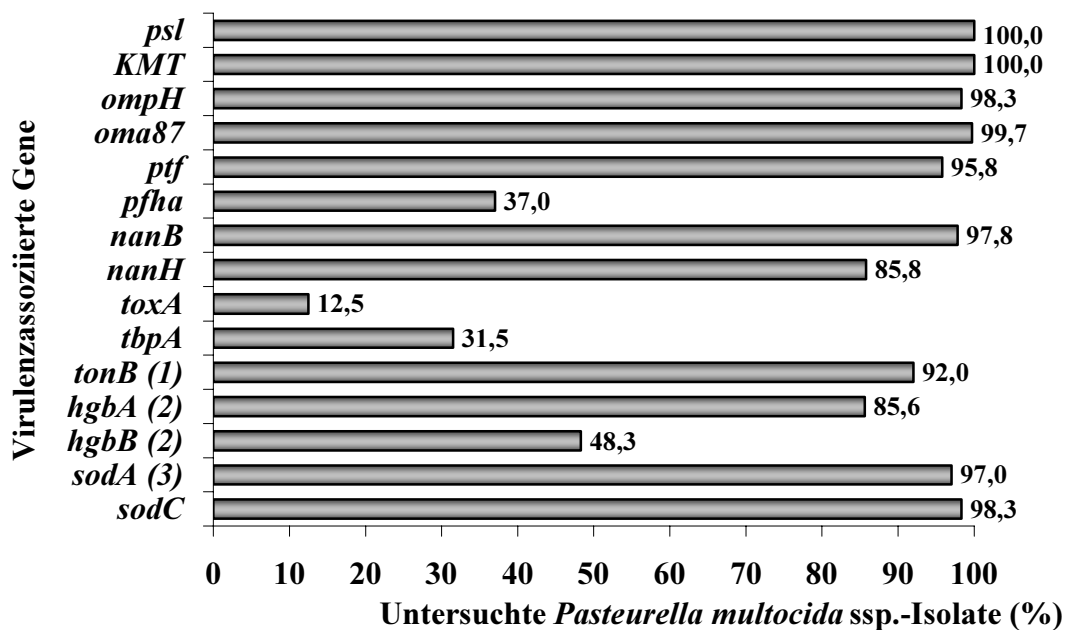
	<i>ompH</i>	<i>kmt</i>	<i>psl</i>	<i>hgbA</i>	<i>hgbB</i>	<i>ptf</i>	<i>pfha</i>	<i>sodA</i>	<i>sodC</i>	<i>oma87</i>	<i>tbpA</i>	<i>nanB</i>	<i>nanH</i>	<i>tonB</i>
<i>P. anatis/Gallibacterium anatis</i>														
MCCM 00140	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MCCM 00141	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMT 9387	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. avium</i>														
1585	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MCCM 00272	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. canis</i>														
MCCM 03430	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
MCCM 00045	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
MCCM 00047	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
IMT 658	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
IMT 9662	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>P. dagmatis</i>														
MCCM 00029	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
MCCM 00024	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
MCCM 03042	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>P. gallinarum</i>														
1720	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1721	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MCCM 00031	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. langaaensis</i>														
MCCM 03044	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. stomatis</i>														
MCCM 00100	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MCCM 00104	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IMT 653	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. volantium</i>														
MCCM 03064	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. multocida ssp. gallicida</i>														
MCCM 00021	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
<i>P. multocida ssp. septica</i>														
MCCM 00008	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
MCCM 00378	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+
MCCM 01209	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+

Während die *P. multocida* ssp. *septica*- und *gallicida*-Isolate ein ähnliches Virulenzgenmuster zeigten, wie es auch bei *P. multocida* ssp. *multocida* nachgewiesen wurde, unterschieden sich die sonstigen *Pasteurella*-Spezies bezüglich ihres Virulenzgenmusters erheblich von *P. multocida* ssp.-Isolaten. Während Isolate der Spezies *P. anatis*, *P. avium* und *P. volantium* keines der getesteten virulenzassoziierten Gene besaßen, wurden bei *P. dagmatis*-Stämmen regelmäßig die Gene *ompH*, *psl*, *oma87* und *tonB* nachgewiesen. In allen *P. canis*-Isolaten konnten die Gene *ompH*, *psl* und *oma87* detektiert werden. *P. gallinarum* und *P. langaaensis* besaßen *ompH* als einziges der untersuchten Gene. Bei keinem Isolat der nicht-*P. multocida* ssp. wurden die Gene *kmt*, *hgbA*, *hgbB*, *ptf*, *pfha*, *sodA*, *sodC*, *tbpA*, *nanB* und *nanH* nachgewiesen.

4.1.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Verifizierung der mit der DNS-DNS-Hybridisierung erzielten Ergebnisse wurden alle 289 *P. multocida* ssp.-Isolate zusätzlich mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf das Vorkommen von *psl*, *kmt*, *ompH*, *oma87*, *ptf*, *toxA*, *tbpA*, *nanB*, *nanH*, *pfha* und *sodC* untersucht. Das Spezies-spezifische Gen *psl* und der ebenfalls Spezies-spezifische Genabschnitt *kmt* wurden in 100 % der 289 untersuchten Isolate nachgewiesen. Mit einer ähnlich hohen Prävalenz wurden die für äußere Membranproteine kodierenden Gene *ompH* in 284 (98,3 %) sowie *oma87* in 288 (99,7 %) Isolaten nachgewiesen. 277 (95,8 %) der untersuchten Isolate hatten das Fimbriengen *ptf*, 282 (97,8 %) bzw. 248 (85,8 %) der Isolate die Neuramidase-kodierenden Gene *nanB* und *nanH* und 107 (37,0 %) Isolate das putative Adhäsion-Gen *pfha*. Bei 284 Stämmen (98,3 %) wurde das für eine Superoxid-Dismutase kodierende Gen *sodC* gefunden.

Das Vorkommen der Gene *tonB*, *hgbA*, *hgbB* und *sodA* wurde nur stichprobenartig mittels PCR untersucht. Die zu untersuchenden Isolate wurden so ausgewählt, dass sie den prozentualen Gesamtanteil an Kapseltypen, Wirtsorganismen und klinisch kranken bzw. gesunden Individuen repräsentierten, um später eine valide Aussage über eine mögliche Variabilität in der Prävalenz der entsprechenden Gen-Sequenzen in Assoziation zu den genannten Parametern diskutieren zu können. Das in die Eisenakquirierung involvierte Gen *tonB* war in 138 (92,0 %) von 200 untersuchten Isolaten vorhanden, die Gene *hgbA* und *hgbB* wurden in 101 (85,6 %) bzw. 57 (48,3 %) von 118 untersuchten Isolaten nachgewiesen. *SodA* kam in 194 (97,0 %) von 200 untersuchten *P. multocida* ssp.-Stämmen vor (Abb. 3).



(1) von 150 untersuchten Isolaten (2) von 118 untersuchten Isolaten (3) von 200 untersuchten Isolaten

Abb. 3: Nachweis virulenzassoziierter und Spezies-spezifischer Gene in *Pasteurella multocida*- Wildtypisolaten (n = 289) mittels Polymerase-Kettenreaktion

4.1.2.3 Vergleich der mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und DNS-DNS-Hybridisierung ermittelten Ergebnisse

Um die Übereinstimmung der erzielten Ergebnisse von PCR und DNS-DNS-Hybridisierung für die einzelnen virulenzassoziierten bzw. Spezies-spezifischen Gene bewerten zu können, wurden alle untersuchten Isolate einzeln betrachtet und miteinander verglichen. Die Gene *psl*, *kmt*, *oma87*, *toxA*, *pfha* und *tbpA* wurden mit beiden Methoden übereinstimmend nachgewiesen. Bei den übrigen untersuchten Genen wurden mit der sensitiveren Methode der DNS-DNS-Hybridisierung mehr positive Isolate nachgewiesen als durch die PCR (Tab. 22 - 29).

Tab. 22-29: Vergleich der mittels DNS-DNS-Hybridisierung und Polymerase-Kettenreaktion ermittelten Daten

Methode	Hybridisierung			
		+	-	
Polymerase-Kettenreaktion	+	284	0	284
	-	5	0	5
		289	0	289

Tab. 22: Nachweis von *ompH*

Methode	Hybridisierung			
		+	-	
Polymerase-Kettenreaktion	+	277	0	277
	-	9	3	12
		286	3	289

Tab. 23: Nachweis von *ptf*

Methode	Hybridisierung			
		+	-	
Polymerase-Kettenreaktion	+	282	0	282
	-	7	0	7
		289	0	289

Tab. 24: Nachweis von *nanB*

Methode	Hybridisierung			
		+	-	
Polymerase-Kettenreaktion	+	248	0	248
	-	4	37	41
		252	37	289

Tab. 25: Nachweis von *nanH*

Methode	Hybridisierung			
		+	-	
Polymerase-Kettenreaktion	+	101	0	101
	-	3	14	17
		104	14	118

Tab. 26: Nachweis von *hgbA* (118)

Methode	Hybridisierung			
		+	-	
Polymerase-Kettenreaktion	+	57	0	57
	-	19	42	61
		76	42	118

Tab. 27: Nachweis von *hgbB* (118)

Methode	Hybridisierung			
		+	-	
Polymerase-Kettenreaktion	+	138	0	138
	-	12	0	12
		150	0	150

Tab. 28: Nachweis von *tonB* (150)

Methode	Hybridisierung			
		+	-	
Polymerase-Kettenreaktion	+	194	0	194
	-	6	0	6
		200	0	200

Tab. 29: Nachweis von *sodA* (200)

4.1.2.4 Nachweis Kapseltyp-assoziiierter Gene in *P. multocida* ssp.-Wildtypisolaten

Ergänzend wurde das Vorkommen Kapseltyp-assoziiierter Gene bei den *P. multocida*-Wildtypisolaten mittels PCR untersucht. Am häufigsten wurden der *capA*-Genlocus in 187 (76,3 %) sowie der *capD*-Genlocus in 35 (14,3 %) der 245 untersuchten Wildtypisolate nachgewiesen. Fünf (2,0 %) Isolate besaßen *capB*, weitere 6 (2,4 %) Isolate *capF* und in 12 der *P. multocida*-Wildtypisolate konnte keiner der fünf *cap*-Genloci nachgewiesen werden. Bei keinem der Wildtypisolate wurde der *capE*-Locus nachgewiesen (Abb. 4).

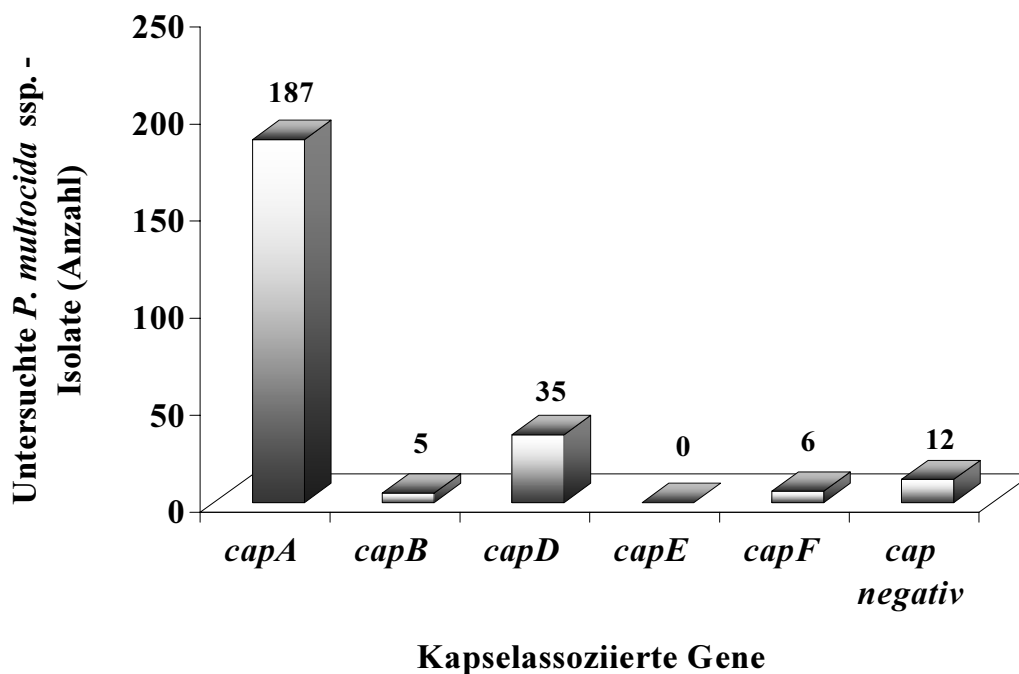


Abb. 4: Nachweis der *cap*-Genloci A, B, D, E und F mittels Polymerase-Kettenreaktion in *P. multocida* ssp.-Wildtypisolaten (n = 245)

4.1.2.5 Prävalenz von *cap*-Genen in *P. multocida* ssp.-Wildtypisolaten in Assoziation zum Wirtsorganismus

Tab. 30 zeigt die Ergebnisse der genotypisch nachgewiesenen *cap*-Genloci der *P. multocida* ssp.-Wildtypisolate im Zusammenhang mit dem jeweiligen Wirtsorganismus.

Tab. 30: Vorkommen der mittels PCR bei *P. multocida* ssp.-Wildtypisolaten (n = 245) nachgewiesenen *cap*-Genloci bezogen auf die tierartliche Herkunft der Isolate

	<i>capA</i>	<i>capB</i>	<i>capD</i>	<i>capE</i>	<i>capF</i>	<i>cap</i> -negativ
Alle Isolate n = 245	187	5	35	0	6	12
%	76,3	2,0	14,3	0	2,5	4,9
Rind/Kalb n = 91	84	0	3	0	2	2
%	92,3	0	3,3	0	2,2	2,2
Bison/Büffel n = 5	0	5	0	0	0	0
%	0	100,0	0	0	0	0
Kleine Wdk. n = 13	9	0	4	0	0	0
%	69,2	0	30,8	0	0	0
Schwein n = 43	15	0	27	0	0	1
%	34,9	0	62,8	0	0	2,3
Kaninchen n = 20	20	0	0	0	0	0
%	100,0	0	0	0	0	0
Geflügel n = 7	6	0	0	0	0	1
%	85,7	0	0	0	0	14,3
Katze n = 54	41	0	1	0	4	8
%	75,0	0	1,9	0	7,4	14,8
Hund n = 8	8	0	0	0	0	0
%	100,0	0	0	0	0	0
Mensch n = 2	1	0	0	0	0	1
%	50,0	0	0	0	0	50,0
Sonstige n = 4	4	0	0	0	0	0
%	100,0	0	0	0	0	0

P. multocida ssp.-Wildtypstämme von Rindern (n = 91) besaßen mit 84 positiven Isolaten (92,3 %) überwiegend *capA* und nur zu einem geringen Anteil *capD* (drei Isolate), *capF* (zwei Isolate) bzw. keinen der untersuchten *cap*-Genloci (zwei Isolate). Der insgesamt vorherrschende Kapseltyp A fand sich zu 100 % bei Isolaten von Kaninchen (n = 20), Hunden (n = 8) und sonstiger tierartlicher Herkunft (n = 4), bei einem Großteil der Geflügel- (85,7 %) und Katzen-Stämme (75,9 %), sowie bei einem vom Menschen stammenden Isolat. *P. multocida* ssp.-Isolate von Büffeln bzw. von einem Bison wiesen ausschließlich den Kapseltyp B auf, der bei keiner der sonstigen Tierarten zu finden war. Bei Schweinen wurde mit 27 Isolaten (62,3 %) vorwiegend der Kapseltyp D nachgewiesen, die restlichen der insgesamt 43 Schweinestämme besaßen *capA* (15 Isolate, 34,9 %) oder waren *cap*-negativ (ein Isolat, 2,3 %). Auch bei Stämmen von kleinen Wiederkäuern wurden neben *capA*-positiven Stämmen (69,2 %) zahlreiche *capD*-Stämme identifiziert (34,9 %). Der größte Anteil *cap*-negativer Stämme fand sich mit 8 (14,8 %) von insgesamt 54 Stämmen bei Katzen-Isolaten. Auch die insgesamt selten nachgewiesenen *capF*-Stämme (6 Isolate) wurden mit vier Isolaten (7,4 %) überwiegend bei Katzen gefunden, die restlichen zwei Isolate stammten vom Rind.

4.1.2.6 Prävalenz und Kombination virulenzassoziierter Gene bei *P. multocida* ssp.-Isolaten in Assoziation zum Kapseltyp, Wirtsorganismus und Gesundheitsstatus des Wirtsorganismus

Nachdem die Prävalenz der in Tab. 11 und 13 genannten virulenzassozierten Gene bei *P. multocida* ssp.-Isolaten (245 Wildtypisolate und 44 Referenzstämme) untersucht worden war, sollte nun überprüft werden, ob eine Assoziation des Vorkommens bzw. einer Kombination bestimmter Virulenzgene mit dem Kapseltyp des Bakteriums, der tierartlichen Herkunft der Isolate und dem Gesundheitsstatus des jeweiligen Wirtstieres bestand. Bei der Berechnung dieser Assoziationen wurden die Resultate für den Genabschnitt *kmt*, der lediglich als Spezies-spezifisches Diagnostikum, nicht aber als virulenzassoziierte Determinante von Bedeutung ist, nicht berücksichtigt. Die in den Prävalenzuntersuchungen bei sämtlichen Stämmen nachgewiesenen *psl*, *ompH*, *nanB*, *sodA* und *sodC* sowie die bei jeweils 99,7 % der Isolate vorhandenen *oma87* und *tonB* bzw. das bei 99,0 % der Stämme nachgewiesene *ptf* wiesen entsprechend zu allen Isolaten unterschiedlicher *cap*-Genloci eine gleiche Assoziation auf und werden in den Erläuterungen der nachfolgenden Tab. 31 – 33 nicht näher beschrieben.

Kombination der bei *P. multocida* ssp.-Isolaten nachgewiesenen virulenzassoziierten Gene in Assoziation zum Gesundheitsstatus der Wirtstiere

Zunächst wurde untersucht, ob grundsätzlich eine Assoziation von bei *P. multocida* ssp.-Isolaten nachgewiesenen virulenzassoziierten Genen zum Gesundheitsstatus der Wirtsorganismen bestand. Da ein gesicherter Vorbericht nur für 234 der insgesamt 289 untersuchten *P. multocida* ssp.-Isolate vorhanden war, beschränkt sich die in Abb. 5 dargestellte Auswertung auf diese Stämme.

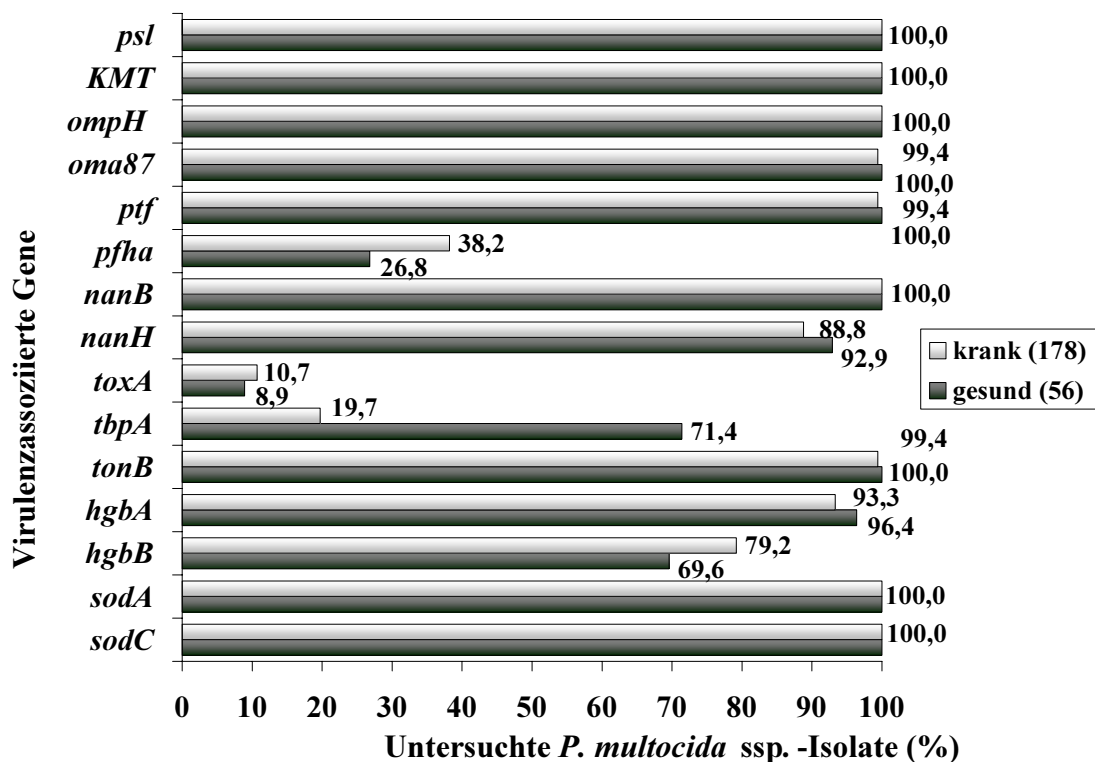


Abb. 5: Vergleich der Prävalenz virulenzassoziierten Gene bei *Pasteurella multocida* ssp.-Isolaten von klinisch kranken (n = 178) und gesunden (n = 56) Wirtsorganismen

Bei der Mehrzahl der nachgewiesenen virulenzassoziierten Gene zeigte sich kein erheblicher Unterschied bezogen auf ihr Vorkommen bei klinisch gesunden oder kranken Wirtstieren. Lediglich *pfha*, *toxA* und *hgbB* waren mit 38,2 %, 10,7 % bzw. 79,2 % häufiger bei Isolaten aus klinisch kranken, verglichen mit solchen aus gesunden Tieren vorhanden, wo sie bei 26,8 %, 8,9 % respektive 69,2 % der *P. multocida* ssp.-Stämme nachgewiesen wurden. Auffällig war das deutlich häufigere Vorkommen des Eisenakquirierungs-Gens *tbpA* bei

71,4 % der Isolate aus gesunden Tieren im Gegensatz zu 19,7 % bei Stämmen, die von Tieren mit klinischer Erkrankung isoliert wurden. Betrachtet man die Daten nicht differenziert nach einzelnen Wirtstierspezies besteht in keinem Fall eine bedeutende Assoziation zwischen dem vermehrten Auftreten eines virulenzassoziierten Gens und dem Gesundheitsstatus der Tiere, von denen die *P. multocida* spp.-Stämme isoliert worden sind. Bei der später folgenden Besprechung der Assoziation der Isolate zum Wirtstierorganismus erfolgt eine differenziertere Betrachtung des Zusammenhanges der virulenzassoziierten Gene und dem Gesundheitsstatus der Tiere, sofern es der zu den entsprechenden Isolaten mitgelieferte Vorbericht erlaubt. Zunächst wird aber der Zusammenhang zwischen Genen und Kapseltypen bei *P. multocida* ssp.-Isolaten aufgezeigt.

Assoziation zwischen virulenzassoziierten Genen und Kapseltypen bei *P. multocida* ssp.-Isolaten

Die Prävalenzdaten der virulenzassoziierten Gene bei *P. multocida* ssp.-Referenzstämmen und -Wildtypisolaten (n = 289) in Assoziation zum genotypisch identifizierten Kapseltyp sind in der folgenden Tab. 31 aufgezeigt.

Aufgrund der Heterogenität von *P. multocida* ssp. *multocida*, insbesondere im Hinblick auf die z. T. mit verschiedenen Erkrankungskomplexen assoziierten Kapselantigene dieser Spezies wurden außerdem Kombinationen von virulenzassoziierten Genen im Zusammenhang mit ihrem jeweiligen Kapselantigen analysiert. Im Folgenden werden die in den Tab. 31 und 32 gezeigten Daten besprochen. Die in Tab. 32 grau unterlegten Zellen bzw. die darin enthaltenen Zahlenwerte weisen auf häufig auftretende Genkombinationen hin.

Kapseltyp A

P. multocida ssp.-Isolate des Kapseltyps A wiesen neben den in der Einleitung dieses Kapitels genannten Genen eine hohe Prävalenz des Adhäsion-vermittelnden Gens *pfha* auf (Tab. 30). Das Transferrin-Gen *tbpA* wurde bei Isolaten dieses Kapseltyps mit 80 (37,9 %) positiven Isolaten nach Kapsel B-Stämmen prozentual am zweithäufigsten nachgewiesen. Lediglich 13 (6,3 %) A-Stämme besaßen das Dermonekrotoxin-kodierende Gen *toxA*.

Kapseltyp A-Stämme wiesen vier größere Gruppen von Isolaten mit jeweils gleichen Genkombinationen auf. Die größte Gruppe setzte sich aus 60 Isolaten (29,0 %) zusammen, die bis auf *pfha*, *toxA* und *tbpA* alle in dieser Arbeit für *P. multocida* ssp. getesteten Gene besaßen. Drei weitere Gruppen, die sich durch das Vorkommen von *hgbB*, *tbpA* und *pfha* unter-

schieden, konstituierten sich aus 32 (15,5 %), 30 (14,5 %) bzw. 24 (11,6 %) Isolaten. Die restlichen Kapseltyp A-Stämme (61 Isolate, 29,4 %) verteilten sich auf insgesamt 19 Gruppen mit jeweils unterschiedlichen Genkombinationen und ließen somit kein homogenes Virulenzmuster erkennen. Die Eisenakquirierungsgene *tbpA*, *tonB*, *hgbA* und *hgbB* kamen bei allen A-Stämmen in jeglichen Kombinationen ohne eine regelrechte Assoziation zueinander vor. Lediglich 40 Isolate (19,3 %) besaßen eine Kombination aller vier Gene (dreifacher Rahmen in Tab. 32). Bei 75 (36,2 %) Kapseltyp A-Stämmen wurden die für Kolonisationsfaktoren kodierenden Gene *ptf*, *pfha*, *nanB* und *nanH* in Kombination nachgewiesen (zweifacher Rahmen in Tab. 32). 175 Isolate (84,5 %) besaßen mit *ptf*, *nanB* und *nanH* drei dieser Adhäsionsgene (gestrichelter Rahmen in Tab. 32). Etwa die Hälfte aller Stämme (45,9 %) wies eine Kombination der Gene *psl*, *ompH*, *oma87*, *ptf*, *nanB*, *nanH*, *tonB*, *sodA* und *sodC* auf, 41,1 % der Isolate besaßen zusätzlich *pfha*.

Kapseltyp B

Kapseltyp B-Stämme besaßen, ähnlich wie E- und F-Stämme, ein homogenes Virulenzmuster. Mit Ausnahme von *toxA* (kein Isolat positiv), sowie *tbpA* und *hgbB* (jeweils 70,0 %, 7 Isolate) waren alle übrigen getesteten Gene zu 100 % bei diesen Isolaten vorhanden. In ihrer Genkombination unterschieden sich Kapseltyp B-Stämme lediglich durch das Vorkommen von *tbpA* und *hgbB*. Die Hälfte der 10 getesteten Isolate besaßen mit Ausnahme von *toxA* alle aufgeführten Virulenzgene. Die andere Hälfte wiesen unterschiedliche Kombinationen der Gene *tbpA* und *hgbB* auf, ansonsten waren sie bezüglich ihres Virulenzgenmusters vergleichbar mit den übrigen Kapseltyp B-Isolaten. Alle Stämme waren positiv für die Adhäsionsvermittelnden Gene *ptf*, *pfha*, *nanB* und *nanH*.

Kapseltyp D

Das Dermonekrotoxin-kodierende Gen *toxA* war deutlich assoziiert mit Kapseltyp D-Stämmen. 22 (62,9 %) der insgesamt 35 Kapseltyp D-Stämme, jedoch nur 13 (6,3 %) der insgesamt 207 Kapseltyp A-Stämme besaßen dieses Gen. Von den Isolaten der restlichen Gruppen wurde lediglich ein *cap*-negatives Isolat *toxA*-positiv getestet. Hingegen wurde das Adhäsions-vermittelnde *pfha* lediglich bei zwei (4,8 %) Isolaten nachgewiesen.

Kapseltyp D-Stämme wiesen mit 18 (42,8 %) bzw. 17 (40,5 %) von insgesamt 42 Isolaten zwei große Gruppen an Genkombinationen auf, die sich lediglich in dem Vorkommen von *toxA* unterschieden. Nur zwei Isolate (4,8 %) besaßen *pfha*, lediglich bei vier Stämmen (9,5 %) wurde *tbpA* nachgewiesen.

Kapseltyp E

Die Kapseltyp E-Stämme zeigten das einheitlichste Genkombinations-Muster unter allen Kapseltypen, denn alle sieben Isolate besaßen mit Ausnahme von *toxA* und *tbpA* alle sonstigen bei *P. multocida* ssp. untersuchten virulenzassoziierten Gene.

Kapseltyp F

Kapseltyp F-Isolate wiesen ein ähnlich homogenes Virulenzgenmuster wie Kapseltyp E-Stämme auf. Es wurden zwei Virulenzgenmuster nachgewiesen, die sich lediglich im Vorkommen von *pfha* unterschieden. Das bei vier Isolaten (57,1 %) vorkommende Gen war prozentual am zweithäufigsten bei Isolaten der Kapselgruppe F vorhanden, die statistische Aussagekraft ist jedoch aufgrund der geringen Anzahl von sieben *capF*-positiven Stämmen eingeschränkt. Keines der Kapselgruppe F-Isolate besaß *toxA* oder das Transferrin-bindende Gen *tbpA*.

Kapsel-Gen (A, B, D, E, F)-negativ

Bei *cap*-negativen Stämmen herrschte bei der Mehrzahl der Isolate (81,3 %) ein einheitliches Virulenzgenmuster vor, das bis auf die Gene *pfha*, *toxA* und *tbpA* alle sonstigen untersuchten Virulenzgene enthielt. Keines der *cap*-negativen *P. multocida* ssp.-Isolate besaß *pfha*.

Tab. 31: Prävalenz virulenzassoziierter Gene bei *Pasteurella multocida* ssp.- Isolaten (n = 289) in Assoziation zum Kapseltyp

	<i>psl</i>	<i>ompH</i>	<i>oma87</i>	<i>ptf</i>	<i>pfha</i>	<i>nanB</i>	<i>nanH</i>	<i>toxA</i>	<i>tbpA</i>	<i>tonB</i>	<i>hgbA</i>	<i>hgbB</i>	<i>sodA</i>	<i>sodC</i>
Alle Stämme n = 289	289	289	288	286	107	289	252	36	91	288	275	225	289	289
%	100	100	99,7	99,0	37,0	100	87,2	12,5	31,5	99,7	95,2	77,9	100	100
Kapseltyp A n = 207	207	207	207	205	84	207	176	13	80	207	196	153	207	207
%	100	100	100	99,0	40,6	100	85,0	6,3	37,9	100	94,7	73,9	100	100
Kapseltyp B n = 10	10	10	10	10	10	10	10	0	7	10	10	7	10	10
%	100	100	100	100	100	100	100	0	70,0	100	100,0	70,0	100	100
Kapseltyp D n = 42	42	42	42	41	2	42	38	22	4	42	41	37	42	42
%	100	100	100	97,6	4,8	100	90,5	51,2	9,5	100	97,6	88,1	100	100
Kapseltyp E n = 7	7	7	7	7	7	7	7	0	0	7	7	7	7	7
%	100	100	100	100	100	100	100	0	0	100	100	100	100	100
Kapseltyp F n = 7	7	7	7	7	4	7	7	0	0	7	7	7	7	7
%	100	100	100	100	57,1	100	100	0	0	100	100	100	100	100
Kapsel-negativ n = 16	16	16	15	16	0	16	14	1	0	15	14	14	16	16
%	100	100	93,8	100	0	100	87,5	6,3	0	100	87,5	87,5	100	100

Tab. 32: Genkombinationen bei *P. multocida* ssp.-Isolaten unterschiedlicher Kapseltypen

Virulenzassoziierte Gene														n	%	
<i>psl</i>	<i>ompH</i>	<i>oma87</i>	<i>ptf</i>	<i>pfha</i>	<i>nanB</i>	<i>nanH</i>	<i>toxA</i>	<i>tbpA</i>	<i>tonB</i>	<i>hgbA</i>	<i>hgbB</i>	<i>sodA</i>	<i>sodC</i>			
Kapseltyp A																
1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0,5	
1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	32	15,5	
1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0,5	
1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	30	14,5	
1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	2	1,0	
1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	9	4,3	
1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	8	3,9	
1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1,5	
1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	2	1,0	
1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	5	2,4	
1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	24	11,6	
1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0,5	
1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	60	29,0	
1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0,5	
1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	3	1,5	
1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0,5	
1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0,5	
1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	8	3,9	
1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	5	2,4	
1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	6	3,0	
1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0,5	
1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0,5	
1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0,5	
														Gesamt:	207	100,0
Kapseltyp B																
1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	5	50,0	
1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	2	20,0	
1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	2	20,0	
1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	10,0	
														Gesamt:	10	100,0
Kapseltyp D																
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	2,4	
1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	2,4	
1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	18	42,8	
1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	17	40,5	
1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	2,4	
1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	3	7,1	
1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	2,4	
														Gesamt:	42	100,0
Kapseltyp E																
1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	7	100,0	
														Gesamt:	7	100,0
Kapseltyp F																
1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	4	57,1	
1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	3	42,9	
														Gesamt:	7	100,0

Assoziation und Kombination virulenzassoziierter Gene bei *P. multocida* ssp.-Stämmen zur Herkunft (Wirtsorganismus) der Isolate

In Tab. 33 ist zunächst die Prävalenz virulenzassoziierter Gene bei *P. multocida* ssp.-Referenzstämmen und Wildtypisolaten (n = 289) in Assoziation zur Wirtstierspezies dargestellt. Da alle untersuchten Isolate die Gene *psl*, *ompH*, *nanB*, *sodA* und *sodC* besaßen, werden diese Gene in der Auswertung nicht gesondert erwähnt. Ähnliches gilt für das Oma87-Protein-kodierende Gen, das lediglich in einem der Geflügelisolate nicht nachgewiesen wurde sowie das Fimbrien-Gen *ptf*, das bei allen Isolaten der unterschiedlichen Wirtsspezies vorhanden war, mit Ausnahme eines *P. multocida*-Isolates vom Rind und zweier von kleinen Wiederkäuern isolierten Stämme. Die nachfolgenden Tab. 33 - 39 zeigen Genkombinationen bei *P. multocida* ssp.-Isolaten bezogen auf die tierartige Herkunft der Stämme. Eine differenzierte Betrachtung der Virulenzgenmuster bei den einzelnen Wirtstieren erlaubt einerseits die Beantwortung der Frage, ob bestimmte Genkombinationen wirtsspezifisch sind bzw. ob ein Zusammenhang zwischen Genkombinationen und Gesundheitsstatus besteht, der bei der undifferenzierten Betrachtung aller Daten nicht ersichtlich war (Abb. 5).

Neben den oben erwähnten häufig bis regelmäßig vorkommenden Genen wurde *pfha* mit der höchsten Prävalenz (100 %) bei den sieben von Bison und Büffel isolierten *P. multocida* ssp.-Stämmen nachgewiesen, gefolgt von Isolaten vom Kaninchen (75,0 %), sonstigen Wirtsspezies (57,1 %), Rindern und Kälbern (46,2 %), und Geflügel (45,0 %) (Tab. 33). Mit einer deutlich niedrigeren Prävalenz wurde dieses Gen bei Isolaten von Hunden (25,0 %), Schweinen (21,2 %), Katzen (18,5 %) und kleinen Wiederkäuern (6,7 %) nachgewiesen. Keines der beiden Isolate, die vom Menschen isoliert worden waren, besaßen *pfha*. Während das für einen weiteren Kolonisationsfaktor kodierende Gen *nanB* bei sämtlichen Isolaten aller Wirtsspezies vorhanden war, wurde *nanH* mit hohen Prävalenzen (83,3 % - 100 %) bei Isolaten der meisten anderen Wirtsspezies nachgewiesen. Lediglich Geflügelisolate (65,0 %) sowie Isolate von kleinen Wiederkäuern (53,3 %) zeigten niedrigere Prävalenzdaten.

Das Dermonekrotoxin-kodierende *toxA* wies erwartungsgemäß eine deutliche Assoziation zu Schweine-Isolaten auf (36,5 %). Ein erheblich höherer Anteil *toxA*-positiver Isolate wurde jedoch bei Isolaten kleiner Wiederkäuer gefunden (66,7 %). Nur sechs (5,8 %) *P. multocida* ssp.-Stämme von Rindern und Kälbern und ein Stamm (5,0 %) vom Geflügel

besaßen das *toxA*-Gen, während dieses bei Isolaten der restlichen Wirtsspezies nicht nachgewiesen werden konnte.

Das für ein Transferrin-bindendes Protein kodierende Gen *tbpA* wurde ausschließlich bei bovinen, caprinen und ovinen Isolaten sowie bei zwei Isolaten unbekannter tierartlicher Herkunft nachgewiesen. 73 (70,2 %) der Rinder- und Kälber-, 12 (80,0 %) der kleinen Wiederkäuer-, sowie vier (57,1 %) der Bison- und Büffel-Isolate besaßen *tbpA*. Die drei weiteren in die Eisenakquierung involvierten Gene *tonB*, *hgbA* und *hgbB* wiesen im Gegensatz zu *tbpA* keine deutliche Assoziation zur tierartlichen Herkunft auf. Während *tonB* mit Ausnahme der Geflügelisolate (95,0 %) zu 100 % bei den Isolaten sämtlicher Wirtsspezies nachgewiesen wurde, zeigte *hgbA* Prävalenzdaten von 87,5 % (Hundeisolate) bis 100 % und *hgbB* von 57,7 % (Isolate von Rind und Kalb) bis 100 %.

Tab. 33: Prävalenz virulenzassoziierter Gene in *Pasteurella multocida* ssp.- Isolaten (n = 289) in Assoziation zum Wirtsorganismus

	<i>psl</i>	<i>ompH</i>	<i>oma87</i>	<i>ptf</i>	<i>pfha</i>	<i>nanB</i>	<i>nanH</i>	<i>toxA</i>	<i>tbpA</i>	<i>tonB</i>	<i>hgbA</i>	<i>hgbB</i>	<i>sodA</i>	<i>sodC</i>
Alle Stämme n = 289	289	289	288	286	107	289	252	36	91	288	275	225	289	289
%	100	100	99,7	99,0	37,0	100	87,2	12,5	31,5	99,7	95,2	77,9	100	100
Rind/Kalb n = 104	104	104	104	103	48	104	92	6	73	104	99	60	104	104
%	100	100	100	99,0	46,2	100	88,5	5,8	70,2	100	95,2	57,7	100	100
Bison/Büffel n = 7	7	7	7	7	7	7	7	0	4	7	7	6	7	7
%	100	100	100	100	100	100	100	0	57,1	100	100	85,7	100	100
Kleine Wdk. n = 15	15	15	15	13	1	15	8	10	12	15	15	11	15	15
%	100	100	100	86,7	6,7	100	53,3	66,7	80,0	100	100	73,3	100	100
Schwein n = 52	52	52	52	52	11	52	51	19	0	52	51	45	52	52
%	100	100	100	100	21,2	100	98,1	36,5	0	100	98,1	86,5	100	100
Kaninchen n = 20	20	20	20	20	15	20	20	0	0	20	20	20	20	20
%	100	100	100	100	75,0	100	100	0	0	100	100	100	100	100
Geflügel n = 20	20	20	19	20	9	20	13	1	0	19	18	17	20	20
%	100	100	95,0	100	45,0	100	65,0	5,0	0	95,0	90,0	85,0	100	100
Katze n = 54	54	54	54	54	10	54	45	0	0	54	49	51	54	54
%	100	100	100	100	18,5	100	83,3	0	0	100	90,7	94,4	100	100
Hund n = 8	8	8	8	8	2	8	8	0	0	8	7	7	8	8
%	100	100	100	100	25,0	100	100	0	0	100	87,5	87,5	100	100
Mensch n = 2	2	2	2	2	0	2	2	0	0	2	2	2	2	2
%	100	100	100	100	0	100	100	0	0	100	100	100	100	100
Sonstige n = 7	7	7	7	7	4	7	6	0	2	7	7	6	7	7
%	100	100	100	100	57,1	100	85,7	0	28,8	100	100	85,7	100	100

Genkombinationen bei Isolaten von Rindern und Kälbern (Tab. 34)

Bei Rindern und Kälbern lag die häufigste Genkombination (A), bei der alle untersuchten virulenzassoziierten Gene mit Ausnahme von *toxA* und *hgbB* vorhanden waren, bei 33 Isolaten (31,7 %) vor. Diese Prozentzahl entspricht in etwa der bei der gleichen Genkombination bei *capA*-Stämmen genannten (Tab. 32). Ähnliches galt für eine zweite Gruppe (B), die sich aus 22 *P. multocida* ssp.-Isolaten (21,1 %) zusammensetzte.

32 Isolate von Rindern und Kälbern (30,8 %) besaßen eine Kombination der in die Eisenakquirierung involvierten Gene *tbpA*, *tonB*, *hgbA* und *hgbB* (dreifacher Rahmen in Tab. 34), während dies lediglich bei neun von kleinen Wdk. und bei keinem der von anderen Wirtstierspezies isolierten Stämme der Fall war. Eine Kombination der Adhäsionsgene *ptf*, *pfha*, *nanB* und *nanH* trat bei 47 (45,2 %) Isolaten von Rind und Kalb auf (doppelter Rahmen in Tab. 34). Eine große Anzahl von Stämmen (43 Isolate, 41,3 %) besaß eine Kombination der Gene *psl*, *ompH*, *oma87*, *ptf*, *nanB*, *nanH*, *tonB*, *sodA* und *sodC* unter Abwesenheit von *pfha* und *toxA*.

Tab. 34: Genkombinationen bei *P. multocida*-Isolaten von Rind und Kalb (n = 104)

Virulenzassoziierte Gene													n	%	
<i>psl</i>	<i>ompH</i>	<i>oma87</i>	<i>ptf</i>	<i>pfha</i>	<i>nanB</i>	<i>nanH</i>	<i>toxA</i>	<i>tbpA</i>	<i>tonB</i>	<i>hgbA</i>	<i>hgbB</i>	<i>sodA</i>	<i>sodC</i>		
1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1,0
1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	33 ^a	31,7
1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1,0
1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	8	7,6
1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	2	1,9
1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	2	1,9
1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1,0
1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1,0
1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	22 ^b	21,1
1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	5	4,8
1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1,0
1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	14	13,4
1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1,0
1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	4	3,8
1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1,0
1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	5	4,8
1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1,0
1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1,0
Gesamt:													104	100,0	

^a = Genkombination A^b = Genkombination B

Genkombinationen bei Isolaten von Bison und Büffeln

Die Genkombinationen bei den von Bison und Büffel mit hämorrhagischer Septikämie isolierten *P. multocida* ssp.-Isolaten entsprachen im Wesentlichen jenen, die bei den mit dieser Erkrankung assoziierten Kapseltyp B-Stämmen vorlag (Tab. 32). Sie werden dementsprechend nicht gesondert aufgeführt.

Genkombinationen bei Isolaten von kleinen Wiederkäuern (Tab. 35)

Das Virulenzgenmuster der *P. multocida* ssp.-Isolate von kleinen Wiederkäuern erwies sich mit neun verschiedenen Genkombinationen bei nur 15 Isolaten als sehr divers. Gehäuft auftretende Assoziationen zwischen bestimmten virulenzassoziierten Genen konnten hier nicht festgestellt werden. Lediglich ein Isolat, das von einem Tier mit einer Bronchopneumonie stammte, besaß das für ein filamentöses Hämagglutinin kodierende Gen *pfha*. Bei mehr als der Hälfte der Isolate (66,7 %) wurde das Toxin-Gen *toxA* nachgewiesen. Neben dem bereits erwähnten Isolat von einem klinisch erkrankten Tier gibt es lediglich von einem weiteren Tier einen gesicherten klinischen Vorbericht. Der von diesem Tier isolierte *P. multocida* ssp.-Stamm besaß mit Ausnahme von *pfha*, *toxA*, *tbpA* alle sonstigen untersuchten Gene. Zur Assoziation von Genkombinationen und Gesundheitsstatus bei den *P. multocida* ssp.-Isolaten der restlichen 13 Tiere kann aufgrund fehlender Angaben zur klinischen Symptomatik keine Aussage getroffen werden.

Tab. 35: Genkombinationen bei *P. multocida* ssp.-Isolaten von kleinen Wiederkäuern (n = 15)

Virulenzassoziierte Gene														n	%
<i>psl</i>	<i>ompHoma87</i>	<i>ptf</i>	<i>pfha</i>	<i>nanB</i>	<i>nanH</i>	<i>toxA</i>	<i>tbpA</i>	<i>tonB</i>	<i>hgbA</i>	<i>hgbB</i>	<i>sodA</i>	<i>sodC</i>			
1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	6,7
1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	20,0
1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	6,7
1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	2	13,3
1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	6,7
1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	2	13,3
1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	3	20,0
1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	6,7
1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	6,7
Gesamt:														15	100,0

Genkombinationen bei Schweine-Isolaten (Tab. 36)

Die 52 *P. multocida* ssp.-Isolate vom Schwein konnten aufgrund ihres Virulenzgenbesatzes in sieben Gruppen mit unterschiedlichen Genkombinationen eingeteilt werden. Das häufigste Virulenzgenmuster bei Schweine-Isolaten war eine Kombination der Gene *psl*, *ompH*, *oma87*, *ptf*, *nanB*, *nanH*, *tonB*, *hgbA*, *hgbB*, *sodA* und *sodC* bei 23 (44,2 %) Isolaten, die sich aus acht Kapseltyp A-Stämmen und 15 D-Stämmen zusammensetzten. Elf dieser Isolate stammten von Schweinen, die klinische Symptome einer Pneumonie zeigten, sieben von klinisch gesunden Tieren und für fünf der 23 Isolate gab es keine Angaben zum Gesundheitsstatus der Wirtstiere. Ein ähnliches Genmuster wie die erste Gruppe zeigten 17 (32,7 %) weitere Isolate (15 Kapseltyp D-, 2 Kapseltyp A-Stämme), die sich lediglich durch den zusätzlichen Nachweis von *toxA* unterschieden. 15 dieser Isolate stammten von Schweinen, die klinisch an einer Pneumonie erkrankt waren, ein Schwein zeigte die Symptomatik einer Rhinitis atrophicans, lediglich ein Schwein war laut Vorbericht klinisch gesund. Von den insgesamt 19 (36,5 %) *toxA*-positiven Isolaten stammten 17 von Schweinen mit klinischer Erkrankung, ein Isolat wurde im Zuge einer Reihenuntersuchung von einem Nasentupfer eines klinisch gesunden Tieres gewonnen und bei einem Isolat fehlte, wie bereits oben erwähnt, ein klinischer Vorbericht.

Tab. 36: Genkombinationen bei *P. multocida* ssp.-Isolaten von Schweinen (n = 52)

Virulenzassoziierte Gene														n	%	
<i>psl</i>	<i>ompH</i>	<i>oma87</i>	<i>ptf</i>	<i>pfha</i>	<i>nanB</i>	<i>nanH</i>	<i>toxA</i>	<i>tbpA</i>	<i>tonB</i>	<i>hgbA</i>	<i>hgbB</i>	<i>sodA</i>	<i>sodC</i>			
1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1,9
1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	3	5,8
1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	6	11,6	
1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1,9
1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	17	32,7	
1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1,9
1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	23	44,2	
Gesamt:														52	100,0	

Genkombinationen bei Kaninchen-Isolaten (Tab. 37)

P. multocida ssp.-Isolate vom Kaninchen wiesen ein sehr einheitliches Virulenzgenmuster auf und wurden in zwei Gruppen aufgeteilt, von denen die eine, bestehend aus 15 (75,0 %) Isolaten, alle Virulenzgene außer *toxA* und *tbpA* besaß. Die aus fünf (25,0 %) Isolaten zusammengesetzte zweite Gruppe unterschied sich durch das Fehlen von *pfha*. Alle Tiere

waren klinisch krank. Eine Assoziation des Vorkommens virulenzassoziierter Gene zum Gesundheitsstatus konnte daher nicht aufgezeigt werden.

Tab. 37: Genkombinationen bei *P. multocida* ssp.-Isolaten von Kaninchen (n = 20)

Virulenzassozierte Gene														n	%
<i>psl</i>	<i>ompH</i>	<i>oma87</i>	<i>ptf</i>	<i>pfha</i>	<i>nanB</i>	<i>nanH</i>	<i>toxA</i>	<i>tbpA</i>	<i>tonB</i>	<i>hgbA</i>	<i>hgbB</i>	<i>sodA</i>	<i>sodC</i>		
1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	15	75,0
1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	5	25,0
Gesamt:														20	100,0

Genkombinationen bei Geflügel-Isolaten (Tab. 38)

Bei den Geflügelisolaten fiel ein inhomogenes Virulenzgenmuster auf, denn die 20 untersuchten *P. multocida* ssp.-Stämme wiesen 8 Genkombinationen auf. Sieben Isolate (35,0 %) besaßen mit Ausnahme von *pfha*, *toxA* und *tbpA* alle sonstigen untersuchten Gene. Bei einem Isolat, das von einem klinisch erkrankten Huhn stammte, konnten mit *psl*, *ompH*, *ptf*, *nanB*, *sodA* und *sodC* auffallend wenige virulenzassozierte Gene nachgewiesen werden.

Tab. 38: Genkombinationen bei *P. multocida* ssp.-Isolaten von Geflügel (n = 20)

Virulenzassozierte Gene														n	%
<i>psl</i>	<i>ompH</i>	<i>oma87</i>	<i>ptf</i>	<i>pfha</i>	<i>nanB</i>	<i>nanH</i>	<i>toxA</i>	<i>tbpA</i>	<i>tonB</i>	<i>hgbA</i>	<i>hgbB</i>	<i>sodA</i>	<i>sodC</i>		
1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	3	15,0
1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	5,0
1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	5	25,0
1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	5,0
1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	7	35,0
1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	5,0
1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	5,0
1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	5,0
Gesamt:														20	100,0

Genkombinationen bei Katzen-Isolaten (Tab. 39)

Die 54 von Katzen mit klinischer Erkrankung isolierten *P. multocida* ssp.-Stämme teilten sich in sieben Gruppen mit verschiedenen Genkombinationen auf. Mehr als die Hälfte dieser Isolate (61,1 %) wiesen ein einheitliches Virulenzgenmuster auf, bei dem bis auf die Gene *pfha*, *toxA* und *tbpA* alle sonstigen untersuchten Gene nachweisbar waren. Eine zweite Gruppe, die sich aus neun Isolaten (16,6 %) zusammensetzte, zeigte ein ähnliches Virulenzgenmuster, enthielt aber im Gegensatz zur ersten Gruppe das Adhäsions-vermittelnde Gen

pfha. Da für die Untersuchung keine *P. multocida* ssp.-Isolate von klinisch gesunden Katzen zur Verfügung standen, kann keine differenzierte Aussage zur Assoziation bestimmter Genkombinationen zum klinischen Status bei Katzen getroffen werden.

Tab. 39: Genkombinationen bei *P. multocida* ssp.-Isolaten von Katzen (n = 54)

Virulenzassoziierte Gene														n	%
<i>psl</i>	<i>ompHoma87</i>	<i>ptf</i>	<i>pfha</i>	<i>nanB</i>	<i>nanH</i>	<i>toxA</i>	<i>tbpA</i>	<i>tonB</i>	<i>hgbA</i>	<i>hgbB</i>	<i>sodA</i>	<i>sodC</i>			
1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	9	16,6
1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1,9
1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	33	61,1
1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1,9
1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	2	3,7
1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	7	12,9
1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1,9
Gesamt:														54	100,0

Genkombinationen bei Hunde-Isolaten (Tab. 40)

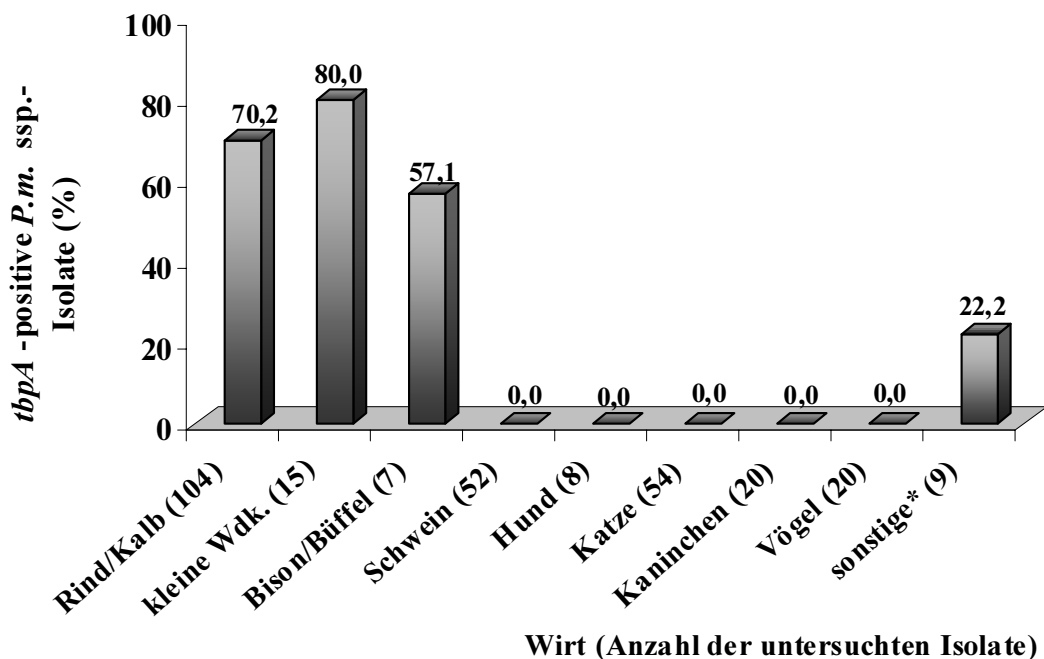
Von den acht von klinisch erkrankten Hunden isolierten *P. multocida* ssp.-Stämmen wiesen mehr als die Hälfte (62,5 %) jene Genkombination auf, die auch bei den meisten Katzen-Isolaten festgestellt wurde. Insgesamt traten drei unterschiedliche Genkombinationen auf. Ähnlich wie bei den Katzenisolaten standen auch hier keine *P. multocida* ssp.-Isolate klinisch gesunder Hunde zur Verfügung, um eine Aussage zum Zusammenhang zwischen dem Vorkommen bestimmter Virulenzgene und dem Gesundheitsstatus der Tiere vornehmen zu können.

Tab. 40: Genkombinationen bei *P. multocida* ssp.-Isolaten von Hunden (n = 8)

Virulenzassoziierte Gene														n	%
<i>psl</i>	<i>ompHoma87</i>	<i>ptf</i>	<i>pfha</i>	<i>nanB</i>	<i>nanH</i>	<i>toxA</i>	<i>tbpA</i>	<i>tonB</i>	<i>hgbA</i>	<i>hgbB</i>	<i>sodA</i>	<i>sodC</i>			
1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	2	25,0
1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	5	62,5
1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	12,5
Gesamt:														8	100,0

4.1.3 Charakterisierung von *tbpA* und dessen flankierender DNS-Region in *Pasteurella*-Spezies

Das *tbpA*-Gen wurde in 31,5 % aller untersuchten *Pasteurella multocida* ssp.- Wildtyp- und Referenz-Stämme mittels PCR und DNS-DNS-Hybridisierung nachgewiesen. Hingegen gelang mit keiner der genannten Methoden bei einem der übrigen *P. sensu stricto*-Referenz- und Wildtypstämme ein Gennachweis. Die 91 positiven *P. multocida* ssp.-Isolate verteilten sich wie folgt auf die unterschiedlichen Tierarten (Abb. 6):

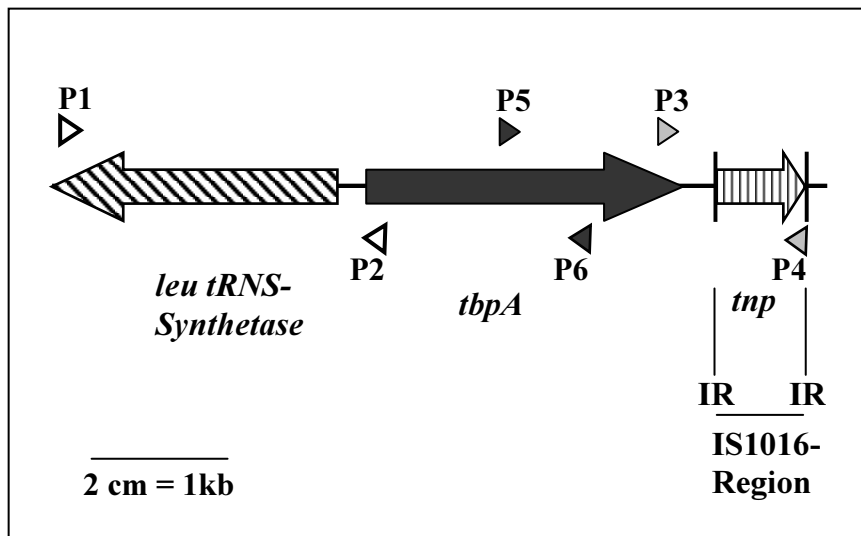


sonstige*: 1 Frettchen, 1 Chinchilla, 2 Menschen, 5 unbekannte Wirte

Abb. 6: Vorkommen von *tbpA* in *Pasteurella multocida* ssp.-Isolaten von unterschiedlichen Wirten (n = 289)

Abb. 6 veranschaulicht, dass fast ausschließlich von Wiederkäuern isolierte *P. multocida* ssp.-Isolate (89 von insgesamt 91 positiven Isolaten) das *tbpA*-Gen besaßen. Bei keinem der Stämme von Schweinen, Hunden, Katzen, Kaninchen und Vögeln konnte das an der Eisenakquirierung beteiligte Gen nachgewiesen werden.

Bei den 91 *tbpA*-positiven *P. multocida* ssp.-Isolaten wurden zur Charakterisierung der Struktur dieses Gens inklusive seiner flankierenden DNS-Regionen und zum Ausschluss des Vorliegens einer operonalen Struktur mit vorgeschaltetem *trbpB*-Gen, wie man es beispielsweise bei *M. haemolytica* und anderen Spezies aus der Familie der *Pasteurellaceae* kennt, die DNS-Bereiche stromauf- und -abwärts mittels PCRen untersucht (Abb. 7).



Acc.-Nr.: AY007725: 5.667 bp

1-2.102: *leu tRNS-Synthetase*

2.272-4.605: *tbpA*

4.790-4.806: inverted repeat (IR)

4.813-5.466: *tnp* (Transposase)

5.482-5.498: inverted repeat (IR)

P1: *leu tRNA* fw: 41-65

P2: *tbpA* rv (574): 2.451-2.331

P3: *tbpA* fw (615): 4.479-4.504

P4: IS1016 rv (814): 5.562-5.538

P5: Pm TbpA FP: 3.240-3.259

P6: Pm TbpA RP: 3.968-3.949

Abb. 7: Genomische Karte der 5.667bp großen *P. multocida* *tbpA*-Region (modifiziert nach Ogunnariwo und Schryvers, 2001 [235]):

Gene und Genregionen sind dargestellt mittels großer Blockpfeile unter Berücksichtigung der Orientierung der Transkription der Gene bzw. der „inverted repeats“. Die Lage der Oligonukleotid-Primer wird indiziert durch kleine Blockpfeile.

84 (92,3 %) der untersuchten Isolate wiesen stromaufwärts ein 1.800 bp- und alle 91 Isolate stromabwärts ein 970 bp-großes PCR-Amplifikat auf. Daraus konnte geschlossen werden, dass die *tbpA*-flankierende Genregion von 84 Isolaten der Organisation des in der Datenbank für Pm70 (Acc.-Nr.: AY007725) angegebenen Genabschnittes gleicht und diese *P. multocida* ssp.-Isolate offensichtlich keine operonale Struktur mit einem Gen, das für ein zweites transferrinbindendes Protein kodiert, aufweisen. Eine DNS-DNS-Hybridisierung der *tbpA*-positiven und -negativen *P. multocida* ssp.-Stämme mit einer *M. haemolytica-trbpB*-Sonde ergab zudem bei keinem der 289 untersuchten Isolate ein positives Signal.

Bei sieben Isolaten (4 Kapseltyp A- und drei Kapseltyp B-Stämme von Rindern) konnte das für eine Leucyl-tRNS-Synthetase kodierende Gen mittels PCR nicht nachgewiesen werden.

4.1.4 Untersuchungen zur Diversität des *ompH*-Gens bei *Pasteurella multocida* ssp.- und *Pasteurella* spp.-Isolaten

OmpH, das für ein Protein der äußeren Membran kodiert, wurde bislang ausschließlich für *P. multocida* ssp. *multocida* beschrieben. In dieser Arbeit konnte mittels PCR und DNS-DNS-Hybridisierung gezeigt werden, dass auch andere Spezies aus der Gruppe der *Pasteurella sensu stricto* sowie weitere *Pasteurella* spp. dieses Gen besitzen. In Tab. 21 (Kap. 4.1.2.1) sind die Ergebnisse zum Nachweis des *ompH*-Gens bei nicht-*P. multocida* ssp. *multocida*-Spezies dargestellt. Bei Vertretern aller untersuchten *Pasteurella*-Spezies, mit Ausnahme von *P. anatis* (heute: *Gallibacterium anatis*), *P. avium* und *P. volantium* konnte mittels PCR und DNS-DNS-Hybridisierung ein *ompH*-Gen nachgewiesen werden. Dabei fiel eine auf der Basis des elektrophoretischen Laufverhaltens der Fragmente auf dem Agarose-Gel geschätzte Variabilität bezüglich der Größe der PCR-Produkte von bis zu 150 bp auf.

Zur näheren Analyse dieser *ompH*-Diversität bei nicht-*Pasteurella multocida* ssp. *multocida*-Isolaten und zum Vergleich mit bisher bekannten, in den internationalen Datenbanken hinterlegten *ompH*-Gensequenzen verschiedener Serotypen von *P. multocida* ssp. *multocida*, wurden von positiv getesteten *Pasteurella*-Stämmen die *ompH*-Gene in die Vektoren pMOK und pCR 2.1-TOPO kloniert und anschließend sequenzanalysiert. Die Größe der ermittelten offenen Leserahmen differierte z. T. erheblich und betrug zwischen 1.014 bp bei dem *P. canis* Biotyp 2-Isolat MCCM 00045 und 1.192 bp bei dem *P. gallinarum*-Isolat MCCM 00031.

Die bioinformatische Auswertung aller identifizierten *ompH*-Sequenzen, bzw. deren entsprechender Aminosäure-Sequenzen zeigten charakteristische Merkmale von Porinen

Gram-negativer Bakterienspezies. Sie zeichneten sich durch einen stark negativen hydropathischen Index [174], einen hohen Glycin-Gehalt, einen niedrigen Prolingehalt und, mit Ausnahme des *P. langaaensis ompH*, einem Fehlen der Aminosäure Cystein aus (Tab. 41). Bei allen Genen (Proteinen) wurde mit Hilfe des Computerprogramms ProtSweep (HUSAR) eine 60 bp (20 AS) große, hoch konservierte Signalsequenz am 5'-Ende (aminoterminalen Ende) identifiziert, die den bis dato in der Datenbank hinterlegten Signalsequenzen dieses Gens bzw. Porins entsprach.

Tab. 41: Größe der *Pasteurella* ssp. und *Pasteurella* spp. *ompH*-Gene sowie auf Basis der Nukleinsäuresequenz errechnete proteinchemische Daten der *OmpH*-Proteine

<i>Pasteurella</i> ssp. und -spp.	Stamm-Bezeichnung	ORF*-Größe (bp)	Errechnete Proteingröße inkl. (exkl.) Signalpeptid (kDa)	Aminosäuregehalt (Mol %)		
				Prolin	Glycin	Cystein
<i>P. m. ssp. m. (A:16)</i>	P 2723	1.026	36,8 (35,0)	0,293	11,73	0
<i>P. m. ssp. m. (D:12)</i>	P 4881	1.035	37,2 (35,3)	0,581	11,626	0
<i>P. m. ssp. m. (E:2,5)</i>	P 1235	1.041	37,2 (35,3)	1,734	12,428	0
<i>P. m. ssp. m. (F:1)</i>	P 4679	1.029	37,0 (35,1)	0,877	11,404	0
<i>P. m. ssp. gallicida</i>	MCCM 00021	1.065	39,0 (36,8)	0,847	10,734	0
<i>P. m. ssp. septica</i>	MCCM 00008	1.029	36,9 (35,1)	0,877	11,696	0
<i>P. canis Biotyp1</i>	MCCM 03430	1.032	37,1 (35,2)	1,458	10,787	0
<i>P. canis Biotyp 2</i>	MCCM 00045	1.014	36,6 (34,7)	0,89	10,682	0
<i>P. dagmatis</i>	MCCM 00029	1.032	37,1 (35,2)	1,458	10,787	0
<i>P. gallinarum</i>	MCCM 00031	1.192	43,5 (41,7)	0,759	10,127	0
<i>P. langaaensis</i>	MCCM 03044	1.086	40,1 (38,2)	1,662	8,864	0,554
<i>P. stomatis</i>	MCCM 00100	1.047	38,0 (36,1)	0,575	9,77	0

* ORF = open reading frame (offener Leserahmen)

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

Auf der Basis der Nuklein- und Aminosäuresequenz der 12 neu identifizierten *Pasteurella-ompH*-Gene wurde mit Hilfe der Neighbour-Joining Methode (Softwareprogramm MEGA) ein phylogenetischer Baum erstellt. Zum Vergleich der bisher bei *P. multocida* ssp. *multocida* identifizierten *ompH*-Gensequenzen wurden die in den Datenbanken hinterlegten Sequenzen von 15 weiteren *ompH*-Genen (Acc.-Nummern: AE006075, U50907, U52200 -

U52212) in die Analysen mit einbezogen. Die Gene der unterschiedlichen *Pasteurella*-Spezies und –Subspezies verteilten sich nach der phylogenetischen Analyse auf vier Cluster (Abb. 8). Das erste Cluster wird gebildet durch die *ompH*-Sequenzen aller *P. multocida* ssp. sowie aller untersuchten *Pasteurella sensu stricto*-Spezies und der *ompH*-Sequenz von *P. dagmatis*. Drei weitere separate Cluster werden von den Spezies *P. stomatis*, *P. gallinarum* und *P. langaaensis* gebildet.

Nach einem Multiple Alignment (Lasergene Inc., ClustalW) von 15 bekannten mit 12 in dieser Arbeit identifizierten *ompH*-Sequenzen wurden die Abweichungen und Identitäten von jeweils zwei Sequenz-Paaren berechnet. Während *P. multocida* ssp. *multocida ompH*-Gene untereinander Divergenzen von 0,1 bis 18,0 % aufwiesen, lag dieser Wert bei *P. multocida* ssp. *multocida ompH*-Genen verglichen mit dem der Subspezies *P. multocida* ssp. *gallicida* bei 5,5 bis 18,1 % und dem *ompH* von *P. multocida* ssp. *septica* zwischen 0,1 und 16,7 %. Die Identitäten der *ompH*-Sequenzen unter den verschiedenen Sero- und Kapseltypen von *P. multocida* ssp. *multocida* lagen bei Werten zwischen 79,4 und 100 %. Die *P. multocida* ssp. *septica ompH*-Sequenz hatte zu diesen *ompH*-Genen eine Identität von 81,5 bis 99,9 %, bei der von *P. multocida* ssp. *gallicida* belief sich diese auf 82,7 bis 93,9 %.

Die größte Divergenz zu einem *P. multocida* ssp. *ompH* zeigte das entsprechende Gen des Stammes *P. langaaensis* MCCM 03044 mit einer Abweichung von 70,4 %, gefolgt von *P. gallinarum* MCCM 00031 (68,9 %). Die niedrigste Divergenz wurde für *P. canis* MCCM 00045 mit einem Wert von 23,0 % errechnet. Unter Ausklammerung der *P. multocida* ssp. *ompH*-Gene wiesen unter den *Pasteurella*-Spezies die *ompH*-Gene von *P. gallinarum* MCCM 00031 und *P. stomatis* die größte errechnete Divergenz von 74,3 % zueinander auf.

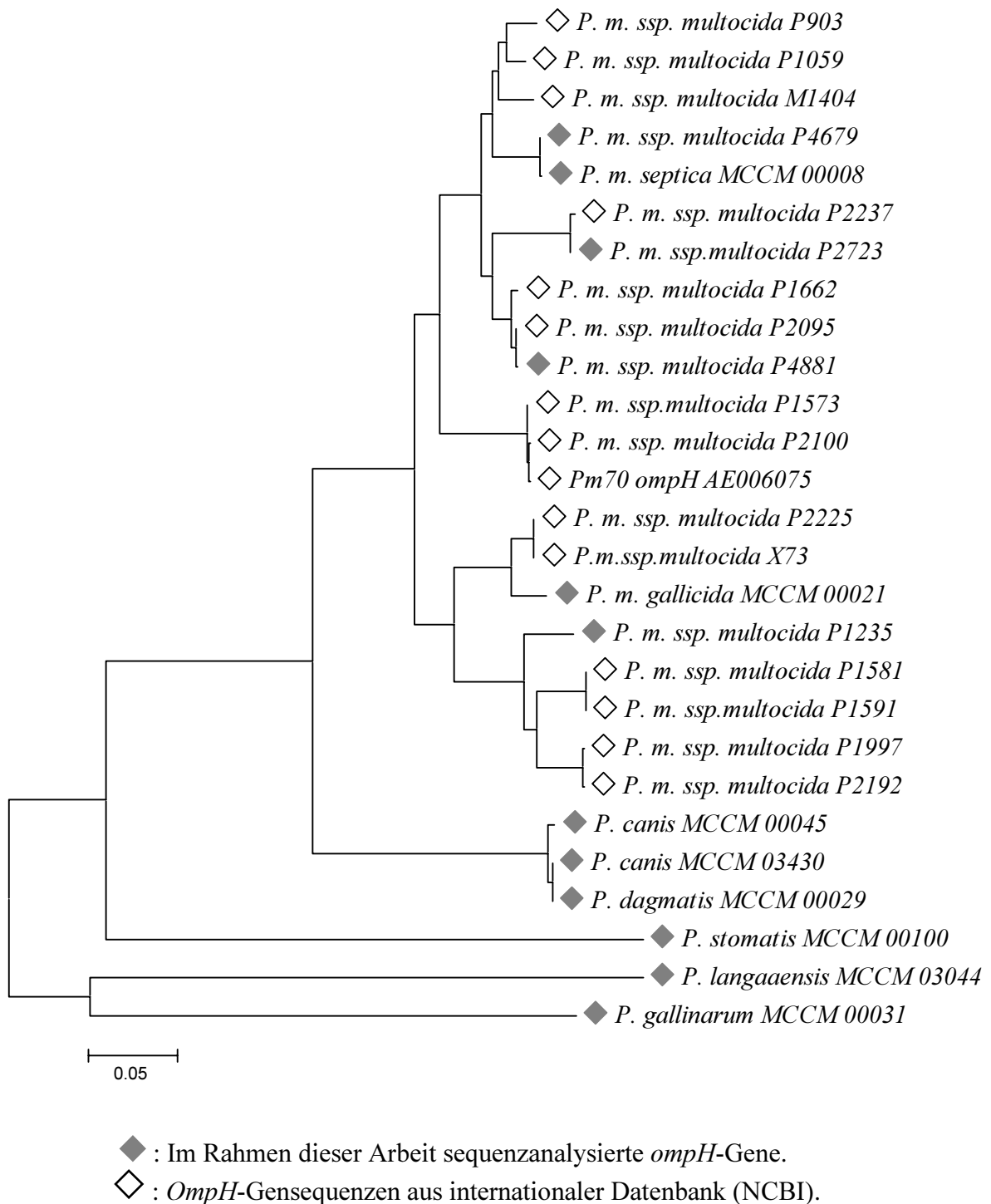


Abb. 8: Dendrogramm zur Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaft der *Pasteurella ompH*-Gene. Der phylogenetische Baum wurde mittels der Neighbour-Joining-Analyse erstellt und nach Kimura-2 korrigiert

4.2 Charakterisierung der [*Pasteurella*] *haemolytica*-Wildtypisolate

4.2.1 Biotypisierung und Speziesdeterminierung mittels 16S rRNS-Sequenzanalyse

Da sich die taxonomische Stellung und somit auch die Nomenklatur von *P. haemolytica* in den letzten Jahren erheblich geändert hat, wurden die 89 Wildtypisolate, die in einem Zeitraum von 20 Jahren im Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen gesammelt wurden und überwiegend aus Deutschland stammen, zunächst als [*P.*] *haemolytica* bezeichnet und zur weiteren Charakterisierung und Differenzierung auf die in Tab. 8 und 10 aufgeführten phänotypischen Merkmalsausprägungen hin getestet.

Tab. 42: Biochemisches Profil der [*P.*] *haemolytica*-Isolate (n = 89)

Biochemische Reaktion	Anzahl positiver Reaktionen
Cytochrom-Oxidase	89
Katalase	89
Indol	0
Ornithin	0
Trehalose	0
Xylose	87
Arabinose	12
Salicin	3
Sorbit	71
Cellobiose	3
Maltose	87
Alpha-Fucosidase	76
β-Glucosidase	6
Hämolyse auf Rinder-Waschblutagar	89
Wachstum auf McConkey-Agar	89

Auf der Grundlage der resultierenden Biochemieprofile wurden die Wildtypisolate in Biogruppen und Biogruppen-Varianten nach Jaworski et al. (1998) [155] mit dem in Tab. 43 aufgeführten Ergebnis differenziert. Nahezu drei Viertel (74,2 %, 66 Isolate) der getesteten [*P.*] *haemolytica*-Stämme gehörten der *M. haemolytica* Biogruppe 1 an. Vertreter der Biogruppen 4, 5, 6, 9, 11 sowie UT27 fanden sich nicht unter den 89 untersuchten [*P.*] *haemolytica*-Isolaten. Sechs Wildtypisolate konnten keiner der bekannten Biogruppen eindeutig zugeordnet werden.

Tab. 43: Klassifizierung der [*Pasteurella*] *haemolytica* Wildtypisolate (n = 89) in Biogruppen und Biogruppen-Varianten nach Jaworski et al., 1998 [155]

Biogruppe	Anzahl Isolate	Widersprüchliche Reaktionen (n Isolate)
1	66	keine
Variante von 1	3	Sorbit negativ (3)
2	1	Cellobiose negativ
3	2	keine
5	0	--
6	0	--
7	9	keine
8	3	alpha-Fucosidase negativ (3)
9	0	--
10	1	alpha-Fucosidase negativ
11	0	--
16	1	keine
UT27	0	--
nicht zuzuordnen	6	≥ vier

Sechs Wildtyp-Isolate, die keiner der bekannten *M. haemolytica*-Biogruppen zugeordnet werden konnten, wurden durch eine Sequenzanalyse der mittels eubakterieller Primer amplifizierten 16S rRNS typisiert (s. Kap. 3.4.2.1). Die Ergebnisse sowie nähere Angaben zur Herkunft der in früheren Untersuchungen als [*P.*] *haemolytica* biotypisierten Isolate sind der folgenden Tab. 44 zu entnehmen.

Tab. 44: Reklassifizierung von [*P.*] *haemolytica*-Wildtypisolaten nach 16S rRNS-Sequenzanalyse

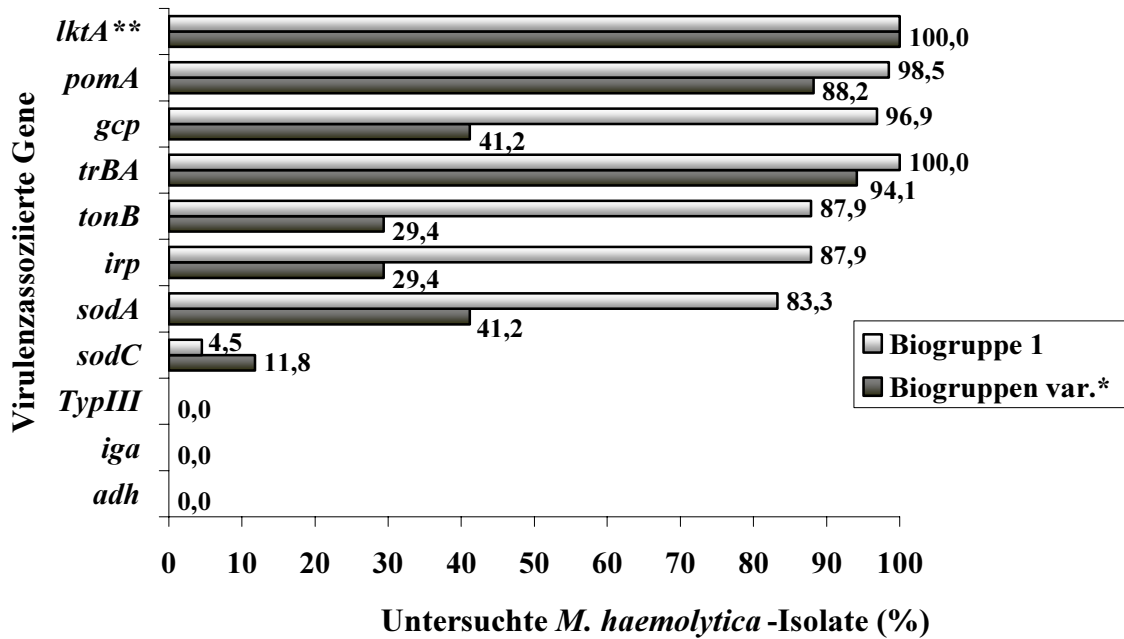
Stamm-Nr.	Spezies-Bezeichnung nach 16S rRNS-Sequenzanalyse	Hämolyse	Tierartliche Herkunft/ Vorbericht
IMT 1057	<i>M. varigena</i>	+	Schwein, Pneumonie/Enteritis; IMT Diagnostik
IMT 3001	<i>M. ruminalis</i>	-	kl. Wdk., Tagebuch-Nr. 751/98
IMT 4009	<i>M. varigena</i>	+	kl. Wdk., IMT Diagnostik
IMT 5009	<i>M. varigena</i>	+	Rind, Tagebuch-Nr. 788/98
IMT 5011	<i>M. varigena</i>	+	Rind, IMT Diagnostik
IMT 5147	<i>M. varigena</i>	+	Rind, Bronchopneumonie; IMT Diagnostik

4.2.2 Molekularbiologische Typisierung

Zur Untersuchung von Vorkommen und Verbreitung der bislang für *M. haemolytica* beschriebenen virulenzassoziierten Gene wurden sowohl 83 *M. haemolytica*-Wildtypisolate als auch Referenz- und Wildtypisolate verschiedener *Mannheima* spp. sowie *P. trehalosi*-Stämme mittels DNS-DNS-Hybridisierung und Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auf die in Tab. 12 und 13 aufgeführten virulenzassoziierten Gene untersucht.

4.2.2.1 DNS-DNS-Hybridisierung

Unter den 83 *M. haemolytica*-Isolaten wurden die virulenzassoziierten Gene bei Biogruppe 1-Isolaten (n = 66) sowie bei denen anderer untersuchter Biogruppen (n = 17) folgendermaßen nachgewiesen: *lktA*, das für einen Strukturteil des wichtigsten Virulenzfaktors von *M. haemolytica* kodiert, wurde bei allen 66 (100 %) Biogruppe 1-Isolaten und ebenso bei allen 17 (100 %) der sonstigen in die Untersuchung einbezogenen Biogruppen nachgewiesen. Die Gene, deren Produkte maßgeblich die Eisenakquirierung bestimmen, zeigten folgendes Verteilungsmuster für Biogruppe 1-Isolate bzw. Isolate sonstiger Biogruppen: die Operonstruktur *trBA* konnte in 65 (98,5 %) bzw. in 16 (94,1 %), die Gene *irp* und *tonB* jeweils in 58 (87,9 %) bzw. 5 (29,4 %) der Wildtypisolate nachgewiesen werden. Das für einen Kolonisationsfaktor kodierende Gen *gcp* war in 64 (96,9 %) der Biogruppe 1-Isolate und in 7 (41,2 %) der übrigen untersuchten Biogruppen-Isolate vorhanden. *PomA*, das für ein äußeres Membranprotein kodiert, wurde in 65 (98,5 %) der Biogruppe 1-Isolate und in 15 (88,2 %) der Isolate anderer Biogruppen nachgewiesen. Die für zwei Superoxid-Dismutasen kodierenden Gene *sodA* und *sodC* schließlich waren wie folgt vorhanden: in 55 (83,3 %) bzw. 3 (4,5 %) der Biogruppe 1-Isolate sowie in 7 (41,2 %) bzw. 2 (11,8 %) der Isolate sonstiger untersuchter Biogruppen. Die 83 *M. haemolytica*-Isolate wurden außerdem auf das Adhäsions-Gen *adh*, das *H. influenzae* Immunglobulin-Protease-Gen *igase*, sowie eine für Gram-negative Bakterien spezifische Sequenz für den TypIII-Sekretionsmechanismus untersucht. Keines der Isolate zeigte ein positives Signal bei der DNS-DNS-Hybridisierung mit den für die oben erwähnten Gene hergestellten DNS-Sonden. Die Ergebnisse der DNS-DNS-Hybridisierung sind in der folgenden Abb. 9 graphisch dargestellt.



* Nicht-Biogruppe 1-Isolate, wie in Tab. 42 gezeigt

** DNS-Sonde mit Primern MhLKT s/as hergestellt (s. Tab. 11)

Abb. 9: Nachweis virulenzassoziierter Gene in *Mannheimia haemolytica*-Wildtypisolaten der Biogruppe 1 (n = 66) und Nicht-Biogruppe 1-Isolaten (n = 17) mittels DNS-DNS-Hybridisierung

Ergänzend wurden Referenzisolate von verschiedenen *Mannheimia*-Spezies sowie von *P. trehalosi* mittels DNS-DNS-Hybridisierung auf das Vorkommen der oben genannten virulenzassozierten Gene untersucht (Tab. 45). Auch die aufgrund abweichender phänotypischer Merkmale identifizierte und mittels 16S rRNA-Sequenzierung typisierte *M. varigena*- und *M. ruminalis*-Wildtypisolate wurden auf diese Weise untersucht.

Die *M. haemolytica*-Referenzstämme besaßen alle untersuchten Gene mit Ausnahme von *sodC*. Das gleiche Virulenzgenmuster wurde bei dem Referenzstamm DSM 5283 nachgewiesen, der vor der Reklassifizierung des [*P.*] *haemolytica*-Komplexes als *P. haemolytica* A1-Isolat bezeichnet wurde und nach aktueller Taxonomie die Spezies *M. ruminalis* darstellt. Ebenso besaßen die beiden *M. glucosida*-Stämme dieses Virulenzgenmuster. Die Eisenakquirierungsgene *tonB* und *irp* wurden bei allen *M. haemolytica*-, *M. ruminalis*-, und *M. varigena*-

Isolaten nachgewiesen, jedoch besaß keiner der *M. glucosida*- und *P. trehalosi*-Stämme diese Gene.

M. varigena-Isolate besaßen weder *tonB* und *irp*, noch *gcp*, *sodA* und *sodC*. Mit Ausnahme des porcinen Isolates IMT 1057, bei dem trotz phänotypisch nachgewiesener Hämolyse auf Rinder-Waschblutagar kein *lktA* bestimmt wurde, wiesen die fünf *M. varigena*-Wildtypisolate ein einheitliches Virulenzgenmuster auf. Die *P. trehalosi*-Stämme besaßen von den getesteten virulenzassoziierten Genen ausschließlich *lktA*.

Tab. 45: Nachweis virulenzassoziiertes Gene mittels DNS-DNS-Hybridisierung in Referenz- und Wildtypisolaten von *Mannheimia*-Spezies und *P. trehalosi*

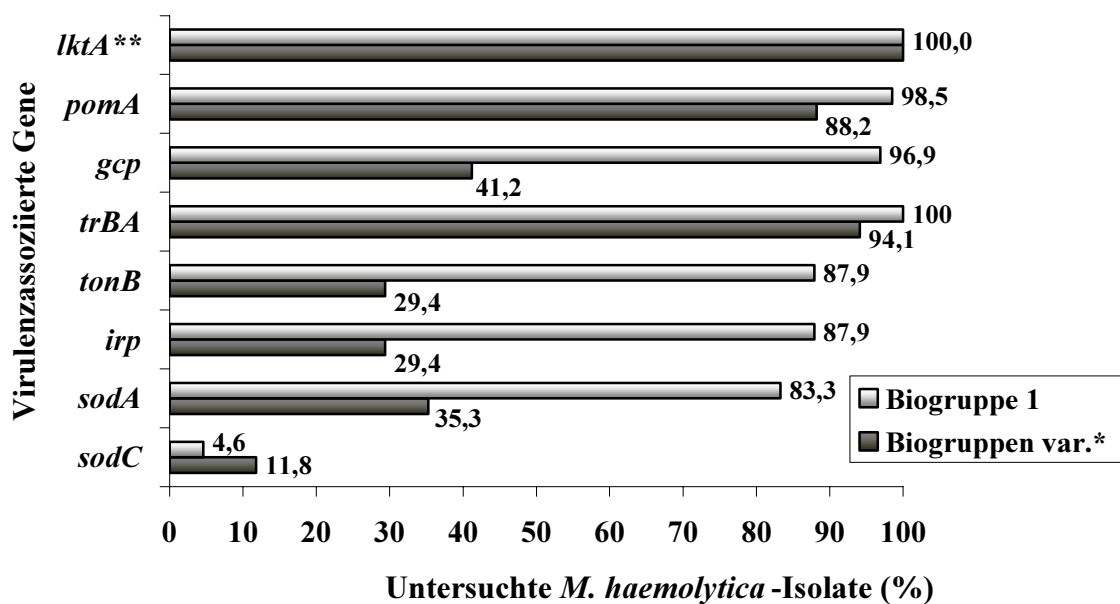
Stamm	Spezies	<i>lktA</i> ⁵	<i>trBA</i>	<i>irp</i>	<i>tonB</i>	<i>pomA</i>	<i>gcp</i>	<i>sodA</i>	<i>sodC</i>
MCCM 03304	<i>M. haemolytica</i>	+	+	+	+	+	+	+	-
MCCM 00399	<i>M. haemolytica</i>	+	+	+	+	+	+	+	-
DSM 5283	<i>M. ruminalis</i> *	+	+	+	+	+	+	+	-
MCCM 03051	<i>M. ruminalis</i>	-	-	+	+	-	-	-	-
MCCM 02527	<i>M. ruminalis</i>	-	-	+	+	-	-	+	-
IMT 3001	<i>M. ruminalis</i>	-	-	+	+	+	-	+	-
MCCM 00388	<i>M. glucosida</i>	+	+	+	+	+	+	+	-
MCCM 00575	<i>M. glucosida</i>	+	+	+	+	+	+	+	-
IMT 1057	<i>M. varigena</i>	-	+	-	-	+	-	-	-
IMT 4009	<i>M. varigena</i>	+	+	-	-	+	-	-	-
IMT 5009	<i>M. varigena</i>	+	+	-	-	+	-	-	-
IMT 5011	<i>M. varigena</i>	+	+	-	-	+	-	-	-
IMT 5147	<i>M. varigena</i>	+	+	-	-	+	-	-	-
MCCM 03431	<i>P. haemolytica</i> T	+	-	-	-	-	-	-	-
MCCM 02084	<i>P. trehalosi</i>	+	-	-	-	-	-	-	-

* vor taxonomischer Reklassifizierung: [*P.*] *haemolytica* Serotyp 1A

⁵ Der genotypische Nachweis von *lktA* war übereinstimmend mit dem Hämolyseverhalten der Isolate auf Rinder-Waschblutagar

4.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Verifizierung der mittels DNS-DNS-Hybridisierung erzielten Ergebnisse wurden die *M. haemolytica*-Wildtypisolate zusätzlich mit Hilfe der PCR auf die virulenzassoziierten Gene untersucht (Abb. 10). Die Gene wurden in den 66 Biogruppe 1-Isolaten folgendermaßen nachgewiesen: *lktA* in 66 (100,0 %), *trBA* in 66 (100 %), *irp* und *exbBD-tonB* in jeweils 58 (87,9 %), *pomA* in 65 (98,5 %), *gcp* in 64 (96,9 %), sowie *sodA* und *sodC* in 55 (83,3 %) bzw. drei (4,6 %) der untersuchten Stämme. Bei den nicht zur Biogruppe 1 gehörenden 17 Isolaten sah die Genverteilung folgendermaßen aus: *lktA* war in allen 17 Isolaten, *trBA* in 16 (94,1 %), *irp* und *tonB* in jeweils 5 (29,4 %), *pomA* in 15 (88,2 %), *gcp* in 7 (41,2 %), sowie *sodA* und *sodC* in sechs (35,3 %) bzw. zwei (11,8 %) der untersuchten *M. haemolytica*-Wildtypisolate vorhanden. Da bei keinem der Isolate zuvor mittels DNS-DNS-Hybridisierung *adh*, *iga*, sowie der für ein TypIII-Sekretionsmechanismus kodierende Genabschnitt nachgewiesen werden konnten, erfolgte keine weitere Untersuchung auf diese Gene mittels PCR.



* Nicht-Biogruppe 1-Isolate, wie in Tab. 42 gezeigt

** Zum Nachweis des *lktA*-Gens wurden die Oligonukleotid-Primer MhLKT s/as (97,6 % der Isolate positiv) sowie LktA s/as (s. Tab. 11); alle (2) der mit MhLKT s/as-Primern *lktA*-negativen Isolate wurden mit den LktA s/as-Primern positiv getestet)

Abb. 10: Nachweis virulenzassoziierten Gene in *Mannheimia haemolytica*-Wildtyp-Isolaten der Biogruppe 1 (n = 66) und Nicht-Biogruppe 1-Isolaten (n = 17) mittels Polymerase-Kettenreaktion

Bei den *Mannheimia*-Spezies- und *P. trehalosi*-Referenzstämmen sowie den *Mannheimia* spp.-Wildtypisolaten stimmten die Ergebnisse der PCR-Untersuchungen mit den in der DNS-DNS-Hybridisierung gewonnenen Daten überein (s. Tab. 45).

4.2.2.3 Vergleich der mittels Polymerase-Kettenreaktion und DNS-DNS-Hybridisierung ermittelten Daten

Um die Übereinstimmung der erzielten Ergebnisse von PCR und DNS-DNS-Hybridisierung für die einzelnen virulenzassoziierten Gene bewerten zu können, wurden alle untersuchten Isolate einzeln betrachtet und miteinander verglichen. Die Gene *pomA*, *lktA*, *trBA*, *tonB*, *irp*, *gcp* und *sodC* wurden in den *M. haemolytica*- und *P. trehalosi*- Wildtyp-Isolaten mit beiden Methoden übereinstimmend nachgewiesen. Bei einem der untersuchten Gene gab es zwischen den Ergebnissen der PCR und der DNS-DNS-Hybridisierung die in der Tab. 46 aufgezeigte Abweichung:

Tab. 46: Direkter Vergleich der mittels PCR und DNS-DNS-Hybridisierung erzielten Ergebnisse (n = 83)

Methode	Hybridisierung			
		+	-	
Polymerase-Kettenreaktion	+	61	0	61
	-	1	21	22
		62	21	83

Tab. 46: Nachweis von *sodA*

4.2.2.4 Kombination der in *M. haemolytica*-Wildtypisolaten mittels PCR und DNS-DNS-Hybridisierung nachgewiesenen virulenzassoziierten Gene

Die Mehrzahl der 83 untersuchten *M. haemolytica*-Wildtypisolate besaß basierend auf den Ergebnissen der PCR- und DNS-DNS-Hybridisierungs-Analysen mit 74,7 % (62 Isolate) eine Kombination der Gene *pomA*, *lktA*, *trBA*, *tonB*, *irp* und *gcp*. Differenziert man zwischen Isolaten der Biogruppe 1 und denen sonstiger Biogruppen, kam diese Genkombination in 81,8 % (54 Isolate) bzw. 29,4 % (5 Isolate) dieser Stämme vor. Bei nicht-Biogruppe 1-Isolaten konnte eine Kombination der Gene *pomA*, *lktA* und *trBA* bei Abwesenheit der übrigen getesteten Gene mit 35,3 % (6 Isolate) vermehrt nachgewiesen werden. Fünf dieser Isola-

te gehörten zur Biogruppe 7, ein Isolat zur Biogruppe 8. Bei Isolaten der Biogruppe 1 trat eine Kombination der Gene *pomA*, *lktA* und *trBA* unter Abwesenheit aller anderen Gene nicht auf. In 75,9 % (63 Isolate) aller getesteten *M. haemolytica*-Wildtypisolate wurden die Gene *tonB*, *irp* und *trBA* nachgewiesen. *TonB* und *irp* traten ausschließlich in Kombination miteinander sowie zusammen mit *trBA* auf, während *trBA* nicht immer mit *tonB* und *irp* zusammen nachgewiesen wurde, sondern in 19 (22,9 %) Isolaten ohne weitere Eisenakquirierungs-Gene vorkam. Die Kombination *tonB*, *irp* und *trBA* trat bei Isolaten der Biogruppe 1 (87,9 %, 58 Isolate) noch häufiger auf, bei den anderen Biogruppen wurden die drei Gene in 29,4 % (5 Stämme) der Isolate zusammen nachgewiesen.

Sämtliche Genkombinationen sowie die Häufigkeit ihres Auftretens in den untersuchten *M. haemolytica*-Isolaten sind in den Tab. 47 und 48 dargestellt. Unter Berücksichtigung aller untersuchten Gene ist bei Biogruppe 1-Isolaten eine Kombination von *pomA*, *lktA*, *trBA*, *tonB*, *irp*, *sodA* und *gcp* am häufigsten vorhanden (49 Isolate, 74,2 %), während dieses Virulenzgenmuster lediglich bei 3 (17,6 %) Nicht-Biogruppe 1-Isolaten nachgewiesen wurde.

Tab. 47: Zusammenhang zwischen den über die Polymerase-Kettenreaktion und DNS-DNS-Hybridisierung nachgewiesenen virulenzassoziierten Genen in *M. haemolytica*-Isolaten der Biogruppe 1 (n = 66)

Virulenzassoziierte Gene									
<i>pomA</i>	<i>lktA</i>	<i>trBA</i>	<i>tonB</i>	<i>irp</i>	<i>sodA</i>	<i>sodC</i>	<i>gcp</i>	n	%
0	1	1	0	0	1	0	0	1	1,5
1	1	1	1	1	1	1	1	3	4,6
1	1	1	0	0	0	0	1	6	9,1
1	1	1	1	1	0	0	1	5	7,6
1	1	1	1	1	1	0	0	1	1,5
1	1	1	0	0	1	0	1	1	1,5
1	1	1	1	1	1	0	1	49	74,2
Gesamt:								66	100

0 = negativ, 1 = positiv

Tab. 48: Zusammenhang zwischen den über die Polymerase-Kettenreaktion und DNS-DNS-Hybridisierung nachgewiesenen virulenzassoziierten Genen in Nicht-Biogruppe 1- *M. haemolytica*-Isolaten (n = 17)

Virulenzassoziierte Gene									
<i>pomA</i>	<i>lktA</i>	<i>trBA</i>	<i>tonB</i>	<i>irp</i>	<i>sodA</i>	<i>sodC</i>	<i>gcp</i>	n	%
0	1	1	0	0	0	0	0	2	11,8
1	1	0	0	0	0	0	1	1	5,9
1	1	1	0	0	0	0	0	6	35,2
1	1	1	0	0	0	0	1	1	5,9
1	1	1	0	0	1	0	0	2	11,8
1	1	1	1	1	1	0	1	3	17,6
1	1	1	1	1	1	1	1	2	11,8
Gesamt:								17	100

0 = negativ, 1 = positiv

4.2.2.5 Kombination der in *Mannheimia haemolytica*-Wildtypisolaten nachgewiesenen virulenzassoziierten Gene in Assoziation zum Gesundheitsstatus der Wirtstiere

Für 57 der untersuchten *M. haemolytica*-Wildtypisolate lag ein klinischer Vorbericht vor. Dementsprechend stammten 29 (50,9 %) dieser Isolate von gesunden Tieren (4 Rinder, 24 Kälber, 1 Schaf), während 28 (49,1 %) *M. haemolytica*-Stämme von an Pneumonie bzw. Bronchopneumonie erkrankten Tieren (4 Rinder, 16 Kälber, 1 Schwein, eine unbekannte Wirtsspezies) isoliert worden waren. Eine Assoziation des Virulenzgenmusters zum klinischen Status der Tiere konnte bei keinem der Wildtypisolate festgestellt werden.

4.3 Etablierung diagnostischer Multiplex-Polymerase-Kettenreaktionen (Multiplex-PCRen)

Eine diagnostische Multiplex-PCR soll im Routine-Labor einen einfachen, spezifischen und schnellen Nachweis sowie die schnelle Differenzierung von *M. haemolytica* und *P. multocida* ssp. ermöglichen. Deshalb wurde zunächst das Primerpaar für KMT s/as für den Spezies-spezifischen Nachweis von *P. multocida* ssp. sowie PomA s/as für den Nachweis von *M. haemolytica* für eine Multiplex-PCR ausgewählt. Während *kmt* als Spezies-spezifischer Genabschnitt für *P. multocida* ssp. publiziert ist [311], wurden für den Nachweis von *M. haemolytica* Primerpaare zur Amplifizierung von *pomA* in die Multiplex-PCR integriert, da dieses Gen mittels Einzel-PCRen mit einer sehr hohen Prävalenz (96,4 %) in *M. haemolytica*-Wildtypisolaten nachgewiesen werden konnte. Das für den wichtigsten Virulenzfaktor bei *M. haemolytica* kodierende *lktA*-Gen, das mit dem o.g. Primerpaar in 97,6 % der Wildtypisolate nachweisbar war, wurde zur weiteren Virulenz-Charakterisierung der zu untersuchenden klinischen Isolate ebenfalls in die Multiplex-PCR einbezogen.

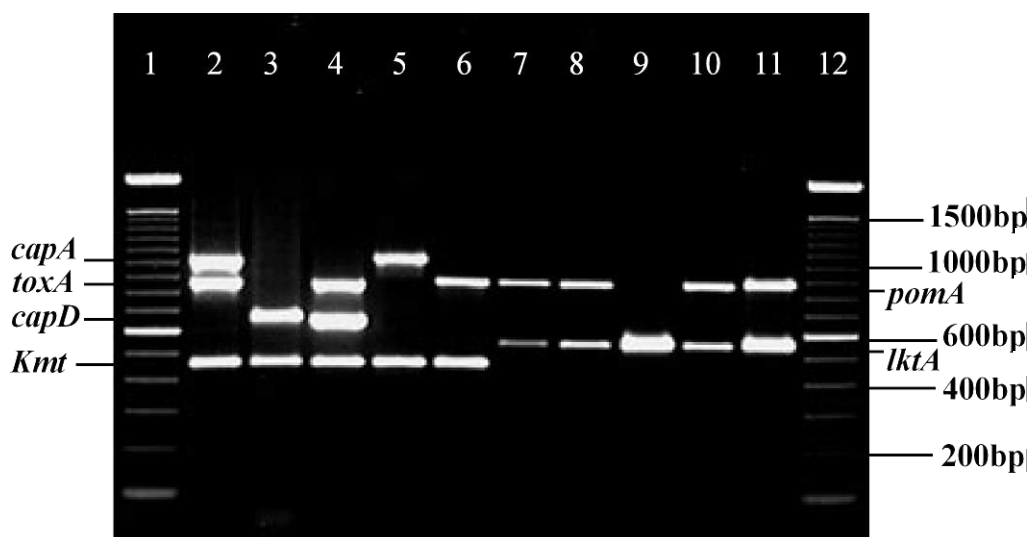
Die Auswahl weiterer bei *P. multocida* nachzuweisender Gene erfolgte unter dem Gesichtspunkt der regionalen Verbreitung und Bedeutung von Kapseltyp A- und D-Stämmen, sowie der tierseuchenrechtlichen Bedeutung des Dermonekrotoxin-kodierenden Gens *toxA*. Der genotypische Nachweis von *toxA* bei *P. multocida* ssp.-Stämmen, die von Schweinen mit typischer klinischer Symptomatik isoliert werden, begründet einen Verdacht des Vorliegens der meldepflichtigen Tierseuche Rhinitis atrophicans.

Als Template-DNS wurden in der Multiplex-PCR anfangs sowohl jeweils 2,5 µl Hitzelysate als auch, zum Vergleich, jeweils eine direkt von TSYE-Blutagar entnommene Kolonie des zu untersuchenden Stammes eingesetzt. Da die Ergebnisse beider Verfahren identisch waren, wurden zur Vereinfachung der diagnostisch einzusetzenden PCR nur noch Kolonien als Template-DNS eingesetzt. Dies erhöht auch die Praktikabilität dieser Methode, da beispielsweise bei Trachealtupfern pneumonisch erkrankter Rinder oder Schafe *P. multocida* ssp. und *M. haemolytica* oft als Mischkulturen vorhanden sind und einzelne verdächtige Kolonien mit der hier etablierten Methode direkt in die PCR-Untersuchung eingehen können.

Die Spezifität beider Multiplex-PCRen wurde durch Einbeziehung der in Tab. 7 (Kap. 3.1.1) aufgeführten Negativkontrollen sowie durch die Ergebnisse der Einzel-PCRen

und DNS-DNS-Hybridisierungen überprüft. Alle drei Methoden erbrachten übereinstimmende Ergebnisse und bei keiner der Negativ-Kontrollstämmen wurden die in den Multiplex-PCRs nachzuweisenden *Pasteurella*-Gene amplifiziert. Die Nachweisgrenze beider Multiplex-PCRs lag bei einer DNS-Konzentration von 10 ng, wo die Fragmente aller Größen mit deutlich visualisierbarem Resultat amplifiziert wurden. Als schnellste und somit praktikabelste Methode, deren Reproduzierbarkeit durch einen Vergleich der Ergebnisse mit den entsprechenden Einzel-PCRs gezeigt werden konnte, erwies sich allerdings die Verwendung von wenigen Kolonien einer Übernacht-Kultur der entsprechenden Bakterien-Stämme auf TSYE-Blutagar-Platten bzw. von 2 µl einer über Nacht inkubierten Flüssig-Kultur.

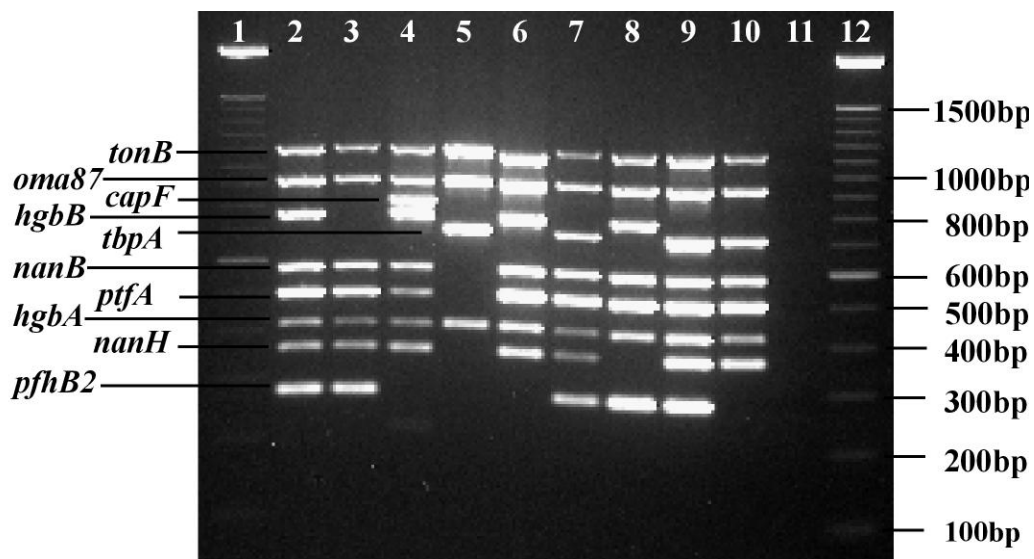
Ein beispielhaftes Elektropherogramm der ersten Multiplex-PCR zur Differenzierung von *P. multocida* ssp. und *M. haemolytica* ist in Abb. 11 dargestellt.



- 100bp-DNS-Marker, 2. IMT 1012 (*P.m.*), 3. IMT 1013 (*P.m.*), 4. IMT 1063 (*P.m.*), 5. IMT 1062 (*P.m.*), 6. IMT 1036 (*P.m.*), 7. IMT 5002 (*M.h.*), 8. IMT 5140 (*M.h.*), 9. MCCM 03431, 10. IMT 5004 (*M.h.*), 11. IMT 5061 (*M.h.*), 12. 100 bp DNS-Marker
- Die einzelnen PCR-Amplifikate besitzen folgende Fragmentgrößen in aufsteigender Reihenfolge: *kmt* 457 bp, *lktA* 518 bp, *capD* 657 bp, *toxA* 848 bp, *pomA* 868 bp, *capA* 1044 bp

Abb. 11: Elektropherogramm einer Multiplex-PCR zur Differenzierung von *Pasteurella multocida* ssp.- und *Mannheimia haemolytica*-Isolaten (1,5%iges Agarose-Gel, 2h, 90V)

Um eine modulare Analyse derart identifizierter *P. multocida* ssp.-Isolate zu ermöglichen, sollte eine zweite Multiplex-PCR etabliert werden. Diese konzentrierte sich auf den gleichzeitigen Nachweis von 10 virulenzassoziierten Genen. Es handelt sich hierbei um die für Kolonisationsfaktoren kodierenden Gene *pfha*, *ptfA*, *nanB* und *nanH*, die in die Eisenakquirierung involvierten Gene *hgbA*, *hgbB*, *tbpA* und *tonB*, sowie das für ein äußeres Membranprotein kodierende Gen *oma87*. Außerdem wurden Primerpaare zum Nachweis von *capF* in die Multiplex-PCR integriert, da dieser Kapseltyp offensichtlich eine Rolle bei verschiedenen Wirtsspezies spielt und daher in der Diagnostik überprüft werden sollte. Aufgrund der hohen intraspezifischen Variabilität von *ompH* bei *P. multocida* ssp. ist der Nachweis dieses Gens innerhalb einer Multiplex-PCR, die ohnehin eine Vielzahl unterschiedlicher Fragmentgrößen amplifiziert, nicht praktikabel. Die folgende Abb. 12 zeigt ein Elektropherogramm dieser zweiten Multiplex-PCR.



- 100 bp DNS-Marker, 2. P 1702, 3. NCTC 10322, 4. P 4679, 5. D37, 6. IMT 1013, 7. IMT 5018, 8. A48, 9. IMT 5000, 10. IMT 5018, 11. MCCM 03431, 12. 100 bp DNS-Marker
- Die einzelnen PCR-Amplifikate besitzen folgende Fragmentgrößen in aufsteigender Reihenfolge: *pfha* 275 bp, *nanH* 361 bp, *hgbA* 420 bp, *ptf* 500 bp, *nanB* 585 bp, *tbpA* 729 bp, *hgbB* 789 bp, *capF* 852 bp, *oma87* 949 bp, *exbB-tonB* 1144 bp

Abb. 12: Elektropherogramm einer Multiplex-PCR zur Charakterisierung von *Pasteurella multocida* ssp.- Isolaten (1,5%iges Agarose-Gel, 3h, 75V)