

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurde ein großes Kollektiv von Stämmen der wichtigen Tierseuchenerreger aus der Gattung *Pasteurella*- und *Mannheimia* unterschiedlicher Wirtstiere und Erkrankungskomplexe mittels phäno- und genotypischer Methoden charakterisiert. Ausgangspunkt der molekularen Analysen war es, die etablierten unzureichenden phänotypischen Identifizierungstests durch unzweifelhafte molekulare Methoden zu ersetzen. Somit sollte die Basis für zukünftige molekulare epidemiologische Arbeiten geschaffen werden, mit denen endlich das Vorkommen und die pathogenetische Bedeutung dieser wichtigen Tierseuchenerreger valide analysiert werden kann

Unseres Wissens wurde mit 289 *P. multocida* ssp.-, 25 *P. sensu stricto*- und 104 *M. species*-Isolaten erstmals ein derart umfangreiches repräsentatives Kollektiv an Stämmen untersucht, wodurch die Etablierung aussagefähiger diagnostischer Werkzeuge gelang. *Pasteurella* ssp. und spp. wurden mittels PCR und DNS-DNS-Hybridisierung auf das Vorhandensein von 16 virulenzassoziierten Genen [*psl*, *ompH*, *oma87*, *ptf*, *pfha*, *nanB*, *nanH*, *toxA*, *tbpA*, *tonB*, *hgbA*, *hgbB*, *sodA*, *sodC*, *iga*, *escv*], einem Spezies-spezifischen- [*kmt*] und fünf Kapsel-Genen [*capA*, *capB*, *capD*, *capE*, *capF*], *M. haemolytica* und sonstige *Mannheimia*-Spezies auf das Vorhandensein von 12 virulenzassoziierten Genen [*lktA*, *pomA*, *gcp*, *trBA*, *tonB*, *irp*, *sodA*, *sodC*, *escv*, *iga*, *adh*] hin untersucht.

Bei den *P. multocida* ssp.-Isolaten gelang fast regelmäßig der Nachweis von Genen, die für äußere Membranproteine (*psl*, *ompH*, *oma87*), Kolonisationsfaktoren (*ptf*, *nanB*, *nanH*), Superoxid-Dismutasen (*sodC*, *sodA*) und Eisenakquirierungssysteme (*tonB*, *hgbA*, *hgbB*) kodieren. Mit einer niedrigeren Prävalenz kamen dagegen das offensichtlich für Isolate ruminaler Wirte spezifische Eisenakquirierungs-Gen *tbpA* (31,5 %), das für ein filamentöses Hämagglutinin kodierende *pfha* (37,0 %) sowie das Dermonekrotoxin-kodierende *toxA* (12,5 %) vor. *P. sensu stricto*-Isolate besaßen z. T. keines der untersuchten Gene bzw. je nach Spezies *ompH*, *oma87*, *psl* und *tonB* und konnten auf diese Weise genotypisch von *P. multocida* ssp. differenziert werden. 86,9 % der *P. multocida* ssp. wiesen eine Kombination der drei Adhäsionsgene *ptf*, *nanH* und *nanB* auf; 39 % dieser Stämme besaßen zusätzlich *pfha*, das auffallend selten bei Kapseltyp D-Stämmen (4,8 %) vorkam. Die gleichzeitige Expression von Fimbrien, Sialidasen sowie dem Hämagglutinin in *P. multocida* ssp. stellt eine wichtige

Voraussetzung für eine erfolgreiche Etablierung des Bakteriums in verschiedenen Wirtsorganismen bzw. deren Geweben dar und könnte ein Grund für das außerordentlich breite Wirtsspektrum dieser Pasteurellen sein. Auch die häufig vorkommende Kombination der Eisenakquirierungs-Gene *hgbA*, *hgbB* und *tonB* (76,5 %), sowie zusätzlich von *tbpA* (20,4 %) sollte *P. multocida* ssp. einen entscheidenden Wachstumsvorteil in unterschiedlichen Wirtstieren ermöglichen. Diese Ergebnisse geben somit entscheidende Anhaltspunkte für zukünftige experimentelle Untersuchungen zur Bedeutung von Adhäsions- und Eisenakquirierungsgenen in der Pathogenese unterschiedlicher *Pasteurella*-bedingter Erkrankungskomplexe. Weiterhin sollte die Eignung der entsprechenden Genprodukte als mögliche Kandidaten für Impfstoffe geprüft werden.

Von den 89 *M. haemolytica*-Stämmen konnten aufgrund der Biotypisierung 66 der Biogruppe 1 zugeordnet werden, während 23 Stämme anderen Biogruppen angehörten bzw. sechs ein derart abweichendes Biochemieprofil aufwiesen, dass sie nur durch anschließende Sequenzanalyse ihrer 16S-rRNS-Gene als *M. varigena* (5) bzw. *M. ruminalis* (1) identifiziert werden konnten. Mit Ausnahme der Gene *lktA*, *pomA* und *trBA*, die fast regelmäßig bei den *M. haemolytica*-Stämmen vorkamen, war bei anderen untersuchten Faktoren, wie *tonB*, *irp*, *gcp* und *sodA* eine deutlich höhere Prävalenz bei den pathogenetisch bedeutenderen Biogruppe 1-Stämmen im Vergleich zu denen anderer Biogruppen vorhanden. Auch diese neuen Daten zu den erst kürzlich identifizierten Genen geben Anlass, deren Bedeutung für den Infektionsprozess zukünftig stärker zu überprüfen.

Auf der Grundlage dieser Analyse-Daten konnten zwei Multiplex-PCRen entwickelt werden, die einen Verzicht auf den konventionellen und teilweise unzuverlässigen Nachweis von *P. multocida* ssp. und *M. haemolytica* auf der Basis ihrer phänotypischen Merkmalsausprägungen ermöglichen. Aufgrund der in dieser Arbeit bestätigten regionalen Bedeutung von *P. multocida* ssp. *multocida* Kapseltyp A- und D-Stämmen sowie der tierseuchenrechtlichen Relevanz des *toxA*-Gens wurde der Nachweis dieser drei Gene neben dem für das *M. haemolytica* *lktA* und *pomA* in die erste Multiplex-PCR zur Differenzierung der beiden bakteriellen Spezies integriert, die beispielsweise im Rahmen der Enzootischen Bronchomopneumonie oft als Mischkultur angetroffen werden. Eine zweite Multiplex-PCR, die in Zukunft für umfassende epidemiologische Studien zur Bestimmung des Besiedlungsmusters von *P. multocida* ssp.-Isolaten bei unterschiedlichen Wirtstieren angewendet werden kann, erlaubt den gleichzeitigen Nachweis der Gene *oma87*, *ptf*, *pfha*, *capF*, *tbpA*, *hgbA*, *hgbB*, *tonB*, *nanH*

und *nanB*. Dies schien erforderlich, da die Prävalenzdaten der bei *P. multocida* ssp.-Isolaten untersuchten Gene auf eine sich möglicherweise ändernde Epidemiologie bei diesen Stämmen hinweisen. So ergab sich beispielsweise die Frage nach einem horizontalen Gen-Transfer des phagenkodierte *toxA* nicht nur zwischen Stämmen mit einzelnen Kapseltypen, sondern auch zwischen Stämmen unterschiedlicher Wirtstiere, da *toxA* entgegen früherer Angaben vermehrt bei Kapseltyp A-Stämmen nicht nur beim Schwein sondern auch beim Wiederkäuer nachgewiesen werden konnte. Des weiteren deutete die Tatsache, dass bei Isolaten, die von an Rhinitis Atrophicans erkrankten Schweinen isoliert worden waren, z. T. kein *toxA* nachgewiesen werden konnte, darauf hin, dass die Tiere mit mehreren *P. multocida* ssp.-Stämmen infiziert sein können. Dieser epidemiologisch wichtige Befund blieb jedoch aufgrund der begrenzten Möglichkeiten der konventionellen Diagnostik zur Differenzierung der Isolate bislang unerkannt.

Ein weiteres interessantes Ergebnis war der Nachweis von *P. multocida*-Kapseltyp F-Stämmen bei Rindern und Katzen. Laut entsprechender Literatur kommen diese Stämme nur beim Geflügel vor. Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass auch hier ein Wandel in der Adaptation von Kapseltypen an bestimmte Wirtstiere erfolgt ist, dessen Ausmaß in Folgeuntersuchungen mittels der hier etablierten Multiplex-PCRs eingeschätzt werden kann.

Abschließend wurden phylogenetische Untersuchungen auf Basis der DNS-Sequenzanalyse des variablen *ompH* von Pasteurellen durchgeführt. Aufgrund des Nachweises von *ompH* nicht nur bei *P. multocida* ssp. sondern auch bei verschiedenen *P. sensu stricto*-Isolaten wurden diese Analysen an 12 *Pasteurella*-Isolaten vorgenommen. Obwohl es sich bei dem Genprodukt um ein äußeres Membranprotein handelt, das aufgrund seiner Lokalisation einem ständigen Selektionsdruck unterliegt, spiegeln die DNS-Sequenzdaten jene phylogenetischen und taxonomischen Einordnungen von *Pasteurellaceae*-Spezies wider, die auf der Basis der 16S-rRNS erhoben wurden. Die Untersuchung stellt insofern eine sinnvolle Ergänzung anderer Methoden zur phylogenetischen Einordnung einzelner *Pasteurella*-Spezies dar und führt zu einem besseren Verständnis der evolutionären Entwicklung dieser Mikroorganismen.