

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der molekulargenetischen Charakterisierung von Mitgliedern des *P. pneumotropica*-Komplexes und anderen nagerrelevanten V-Faktor-unabhängigen Pasteurellaceen im Hinblick auf ihre taxonomische Einteilung. Basis für die vorgenommenen Untersuchungen war eine Einteilung von über 1600 Isolaten aufgrund biochemischer Daten in phänotypische Gruppen. Insgesamt wurden 234 Feldisolate sowie 10 Referenzstämme mit verschiedenen molekulargenetischen Methoden weiterführend untersucht. Die angewandten Methoden umfaßten die Sequenzierung der 16S rDNA zur allgemeinen Einordnung der Stämme (24 Isolate untersucht), die DNA-DNA-Hybridisierung zur Klärung von Verwandtschaftsbeziehungen auf Speziesebene (57 Isolate untersucht), die AP-PCR als hochsensitive Fingerprinttechnik (233 Isolate untersucht) sowie die ITS-PCR als PCR-Methode mit Potential zur Speziesdifferenzierung (107 Isolate untersucht).

Die Ergebnisse der 16S rDNA-Sequenzierung ermöglichten eine Einordnung von repräsentativen Vertretern der gebildeten biochemischen Gruppen in den gesamten Stammbaum der Familie Pasteurellaceae. Dabei zeigte sich, daß fast alle Nagerpasteurellaceen ein großes Cluster bilden, das sich wiederum in zwei Homologiegruppen unterteilt. Bei der einen handelt es sich um den *P. pneumotropica*-Komplex, bestehend aus 7 der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten V-Faktor-unabhängigen Gruppen („Pp3“, „Pp1“, „Pp1a“, „Past20“, „Pp4“, „Jp5“, „Pp6“) und außerdem einigen V-Faktor-abhängigen Gruppen (BÖHNING, pers. Mitteil.). Die zweite Gruppe enthält "*Haemophilus influenzaemurium*", „*P. sp. Ratte*“ und *Actinobacillus muris* (biochemische Gruppen „A. muris“, „Actino11“, „Actino12“, „Past21“, „Past22“, „P. sp. HW“), sowie die Gruppe „Past32“.

Alle dem *P. pneumotropica*-Komplex zugeordneten Isolate unterscheiden sich durch ihre positive Phosphatase-Reaktion von *A. muris*, „*H. influenzaemurium*“ und *P. sp. Ratte*. Der *P. pneumotropica*-Komplex unterteilt sich in zwei Unterkomplexe, *P. pneumotropica* Heyl und die *P. pneumotropica* Jawetz-Gruppe. Aufgrund molekulargenetischer Daten (DNA-Bindungswert von 30%) sind die Referenzstämme von *P. pneumotropica* Jawetz und *P. pneumotropica* Heyl nicht nur verschiedenen Spezies, sondern auch verschiedenen Genera zuzuordnen.

P. pneumotropica Heyl (biochemische Gruppe „Pp3“) zeigt innerhalb der Spezies DNA-Bindungswerte von $\geq 77\%$. Neben Ratten- und Mäuseisolaten enthält *P. pneumotropica* Heyl auch einzelne Stämme, die von *Mastomys* und Hamster stammen.

Zu *P. pneumotropica* Jawetz gehören aufgrund der Hybridisierungswerte die Gruppen „Pp1“, „Pp1a“ und „Past20“, die auf Speziesebene untereinander verwandt sind und hauptsächlich von Mäusen stammen, sowie die Gruppen „Pp4“, „Pp5“ und „Pp6“, die eine weitere, sehr heterogene, hauptsächlich bei Ratten isolierte Spezies bilden. Innerhalb der einzelnen biochemischen Gruppen des *P. pneumotropica*-Komplexes kann mittels AP-PCR weiter in Subgruppen differenziert werden. Für die Unterscheidung zwischen *P. pneumotropica* Jawetz und *P. pneumotropica* Heyl ist am besten eine Kombination von Arabinose-, Melibiose- und Raffinose-Reaktion geeignet. Die biochemischen Gruppen „A. muris“, „Actino11“, „Actino12“, „Past21“, „Past22“, „P. sp. HW“ sind mit der bisher beschriebenen Spezies *Actinobacillus muris* aufgrund der Hybridisierungsdaten auf Speziesebene verwandt (DNA-Bindungswerte $\geq 88\%$). Innerhalb dieser Gruppen kann mittels AP-PCR in vielen Fällen weiter unterschieden werden. Mit Ausnahme der Gruppe „Past22“, die einige wenige Rattenisolate enthält, umfaßt *Actinobacillus muris* ausschließlich Mäuseisolate.

„*H. influenzaemurium*“ und *P. sp. Ratte* sind sich in ihrem biochemischen Profil sehr ähnlich, können molekulargenetisch jedoch klar sowohl als verschiedene Spezies als auch verschiedene Genera unterschieden werden. Die „*H. influenzaemurium*“ zugeordneten Isolate bilden aufgrund hoher Hybridisierungswerte eine klar abgegrenzte, ausschließlich bei Mäusen gefundene Spezies.

Bei einer kleinen Gruppe von Isolaten, die aufgrund ihrer biochemischen Merkmale *P. multocida* sbsp. *gallicida* zugeordnet worden waren, hat sich mit molekulargenetischen Methoden diese Zuordnung bestätigt. Damit wurden Literaturhinweise über das natürliche Vorkommen von *P. multocida* bei Ratten bestätigt.

Die nur selten gefundenen Mitglieder der biochemischen Gruppen Past31 und Past32 konnten keiner bekannten Spezies zugeordnet werden. Die Gruppe Past31 zeigt aufgrund des Sequenzierungsergebnisses die nächste Verwandtschaft zu Keimen des *P. haemolytica*-Komplexes (heute *Mannheimia* gen. nov.), ohne einer der beschriebenen Spezies zugeordnet werden zu können. Diese Gruppe gehört vermutlich einer noch unbeschriebenen Spezies innerhalb dieses Komplexes an. Bei der Gruppe Past32 sprechen die Sequenzierungsdaten dafür, daß es sich hierbei um eine noch unbeschriebene Spezies innerhalb des „*A. muris*“/„*H. influenzaemurium*“/„*P. sp. Ratte*“-Komplexes handelt.

Auf Basis der erhaltenen phänotypischen und molekulargenetischen Daten wurden phänotypische Minimalakriterien definiert, die eine rasche Zuordnung von Isolaten zu den einzelnen Spezies und teilweise auch innerhalb dieser Spezies eine Differenzierung in Biotypen ermöglichen.

Die Verteilung der untersuchten Wildnagerisolate auf die einzelnen Tierarten entspricht der Verteilung der Versuchsnagerisolate, wobei die Wildnagerisolate aufgrund der AP-PCR-Daten eine größere Variabilität aufweisen.

Viele der biochemisch und molekulargenetisch definierten Gruppen werden ausschließlich oder bis auf nur wenige Ausnahmen bei einer einzigen Tierart gefunden, was für eine hohe Wirtstierspezifität spricht. Andere Gruppen verteilen sich auf mehrere Tierarten. Das Vorkommen identischer AP-PCR-Fingerprints auch zwischen Stämmen verschiedener Tierarten läßt auf eine Übertragungsmöglichkeit eines Teils der von Nagern stammenden Pasteurellaceen zwischen diesen Tierarten schließen. Die von Gelbhalsmäusen stammenden *P. pneumotropica*-ähnlichen Isolate sind dagegen aufgrund molekulargenetischer Daten nicht mit *P. pneumotropica* verwandt, so daß eine Übertragung auf Versuchsnager nicht wahrscheinlich erscheint.

Summary

Susanne Kirschnek:

Molecular genetic characterisation of bacteria of the *Pasteurella pneumotropica*-complex and other V factor independent *Pasteurellaceae* relevant for rodents

This work deals with the molecular genetic characterisation of members of the *P. pneumotropica*-Komplex and other rodent relevant V factor independent *Pasteurellaceae* regarding its taxonomic organisation. The studies are based on a phenotypic group formation resulting from biochemical characteristics including more than 1600 isolates. Altogether, 234 field isolates and 10 reference strains have been investigated by different molecular genetic methods. The applied methods are comprising sequencing of the 16S rDNA for general classification and DNA-DNA hybridisation for clarification of relationships at the species level, AP-PCR as a highly sensitive fingerprint technique and ITS-PCR as a PCR method with potential for species differentiation.

The results of 16S rDNA sequencing enabled the inclusion of representative isolates of the biochemical groups into the phylogenetic tree of the whole family *Pasteurellaceae*. Almost all rodent *Pasteurellaceae* are forming a large cluster which is subdivided into two groups. One of the groups consists of the *P. pneumotropica* complex including 7 biochemical groups ("Pp3", "Pp1", "Pp1a", "Past20", "Pp4", "Pp5", "Pp6" and additionally some V factor dependent groups. The second group contains "*Haemophilus influenzaemurium*", "*P. sp. rat.* *Actinobacillus muris* (biochemical groups "A. muris", "Actino11", "Actino12", "Past21", "Past22", "*P. sp. HW*") and "Past32".

All isolates assigned to the *P. pneumotropica* complex display a positive phosphatase reaction which distinguishes them from *A. muris*, *H. influenzaemurium*, and "*P. sp. rat.*".

P. pneumotropica is divided into two subcomplexes, *P. p.* Heyl and the *P. p.* Jawetz group. On the basis of molecular genetic data (hybridisation value of only 30%), the reference strains of *P. pneumotropica* Jawetz and *P. pneumotropica* Heyl have to be considered not only as belonging to different species, but also as belonging to different genera. *P. pneumotropica* Heyl (biochemical group Pp3) displays hybridisation values $\geq 77\%$ within the species as well as identical ITS-PCR-Profiles. Apart from isolates from rat and mouse, *P. p.* Heyl includes several isolates from *Mastomys* and hamster. *P. p.* Jawetz includes the groups "Pp1", "Pp1a" and "Past20" with relationship on the species level (mainly of mouse origin) as well as the

groups "Pp4", "Pp5" and "Pp6" which form a further, very heterogenous species (mainly of rat origin). Within the *P. pneumotropica*-Komplex, the biochemical groups can be differentiated further into subgroups by means of AP-PCR. The best means to distinguish between *P. p. Jawetz* and *P. p. Heyl* is a combination of the arabinose-, melibiose- and raffinose-reactions. The biochemical groups "A. muris", "Actino11", "Actino12", "Past21", "Past22" and "P. sp. HW" are related on the species level to the described species *A. muris* (hybridisation values of $\geq 88\%$). Within these groups a further differentiation by means of AP-PCR is possible in many cases. Except of "Past22", which comprises few rat isolates, *A. muris* is exclusively found in mice.

"*H. influenzaemurium*" and *P. sp. rat* display a rather similar biochemical profile but can clearly be differentiated as distinct species and even genera by molecular methods. The isolates affiliated to "*H. influenzaemurium*" form one distinct species (hybridisation values $\geq 73\%$) that is found only in mice.

A little group of isolates which had been assigned to *P. multocida* sbsp. *gallicida* on the basis of biochemical criteria has proved to be *P. multocida* with greatest similarity to the subspecies *gallicida* also by molecular data. This confirms literary references about the natural occurrence of *P. multocida* in rats.

The members of "Past31" and "Past32" are rarely found and could not be assigned to known species. Based on sequencing data, "Past31" has as nearest relatives members of the *P. haemolytica* complex (now *Mannheimia* gen nov.), and probably is a member of a separate not yet described species within this complex. "Past32", a member of the "*H. influenzaemurium*"/*A. muris*/"*P. sp. Ratte*" complex with a maximal sequence similarity of 96,4%, seems to be a separate species within the cluster of rodent Pasteurellaceae.

On the basis of the phenotypic and molecular genetic data obtained so far, phenotypic minimal criteria were defined which allow the affiliation of isolates to species and genera and the further differentiation of some species into biotypes.

The distribution of the examined isolates originating from wild rodents on the individual animal species corresponds to the distribution of the isolates obtained from laboratory rodents. Altogether the isolates originating from wild rodents display a larger variability compared with the isolates originating from laboratory rodents on the basis of AP-PCR data. Many of the biochemically and molecular genetically defined groups are found exclusively or mainly in a sole animal species. This indicates a high specificity for one single host. Other groups are found

in rats and mice as well as in hamsters or mastomys, even showing identical fingerprints between isolates originating from different animal species. This suggests a possible transmission between these animal species for a part of the rodent Pasteurellaceae. Isolates similar to *P. pneumotropica* which originate from *Apodemus flavicollis* are not related with the *P. pneumotropica* complex on the basis of molecular genetic data, so that a transmission to laboratory rodents does not seem to be probable.