

5. ERGEBNISSE

5.1 Pathologie

5.1.1 Makroskopische Befunde Genitaltrakt

5.1.1.1 männliche Tiere

In frühen Stadien der Erkrankung findet man nekrotische Auflagerungen um die Präputialöffnung, die sich nur unter Substanzverlust ablösen lassen. Darunter kann sich eitriges Exsudat befinden. Die Veränderungen reichen in diesem Stadium nur bis zur Umschlagstelle auf die Präputialschleimhaut (Abb.5.1).

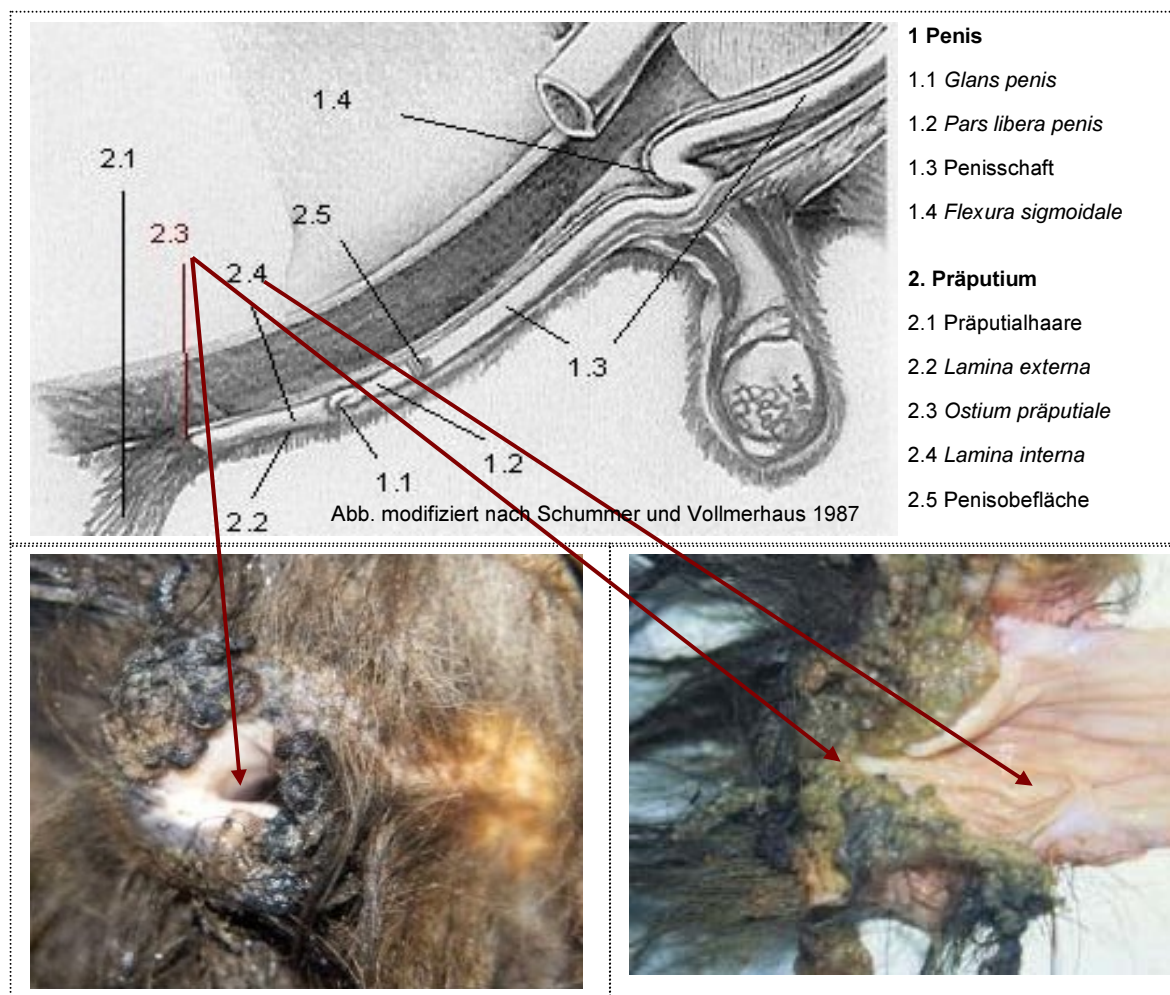


Abb. 5.1: Nekrotische Auflagerungen im Bereich der Präputialöffnung eines Wisentbullens mit Balanoposthitis

ERGEBNISSE

In fortgeschrittenen Stadien kann man eine Ausbreitung auf die *Lamina externa* und *interna* des Präputialschlauches feststellen (Abb. 5.2). Dabei kann die Präputialhöhle mit eitrigem Exsudat und nekrotischem Material gefüllt sein, welches nach außen abfließt (Abb. 5.3). Die Präputialschleimhaut ist zum Teil extrem verdickt und von zahlreichen Hämorrhagien durchzogen. In ausgeprägten Fällen kommt es zur Autamputation der Penisspitze (Abb. 5.4). Durch die Ansammlung von nekrotischem Gewebe im Bereich der Präputialöffnung kann sich letztere verschließen. In der Folge kann Harn nicht mehr abfließen und es kommt zu einer Ansammlung von Harn in der Präputialhöhle.



Abb. 5.2:
Ansammlung von eitrigem und nekrotischem Material in der Präputialhöhle eines Wisentbullen



Abb. 5.3:
eitriges Exsudat fließt aus der Präputialöffnung eines Wisentbullen



Abb 5.4: Autamputation der Penisspitze

5.1.1.2 weibliche Tiere

Bei den 66 untersuchten weiblichen Tieren wiesen die Schamlippen, die Vaginalschleimhaut und die Klitorisgrube keine erkennbaren makroskopischen Veränderungen auf. Auch das histologische Bild war unauffällig.

5.1.2 Histologische Befunde Genitaltrakt

Eine klar definierte Stadieneinteilung des klinischen Bildes der Krankheit war aufgrund des vielfältigen makroskopischen Erscheinungsbildes der Balanoposthitis schwierig. Die Einteilung der Krankheitsstadien wurde daher unter histologischen Gesichtspunkten durchgeführt. Es können drei Stadien unterschieden werden, wobei die Tiere im ersten Stadium klinisch unauffällig sind. Stadium I ist gekennzeichnet durch fokale Hyperkeratosen. Die Epidermis ist stark proliferiert und auf der Oberfläche sind rundliche Bakterien zu erkennen (Abb. 5.6).

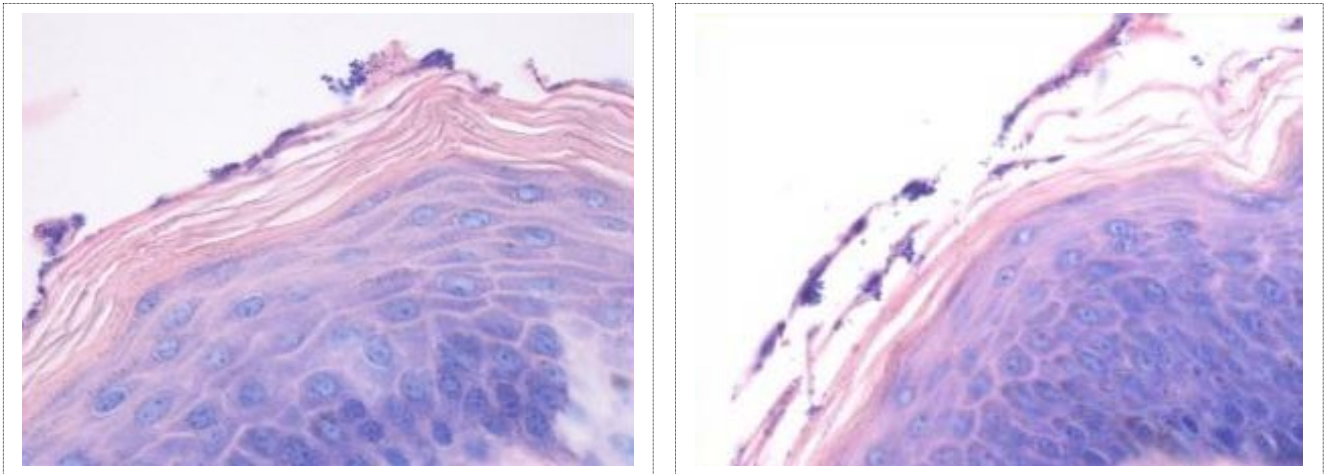


Abb. 5.5: Histologisches Bild der Balanoposthitis in Stadium I (Giemsa Färbung, Vergrößerung x1000)

ERGEBNISSE

Im Stadium II ist eine epidermale Nekrose erkennbar. Diese dehnt sich bis in das *Stratum spinosum* aus. Eine ausgeprägte bakterielle Besiedlung ist deutlich zu erkennen (Abb. 5.7)

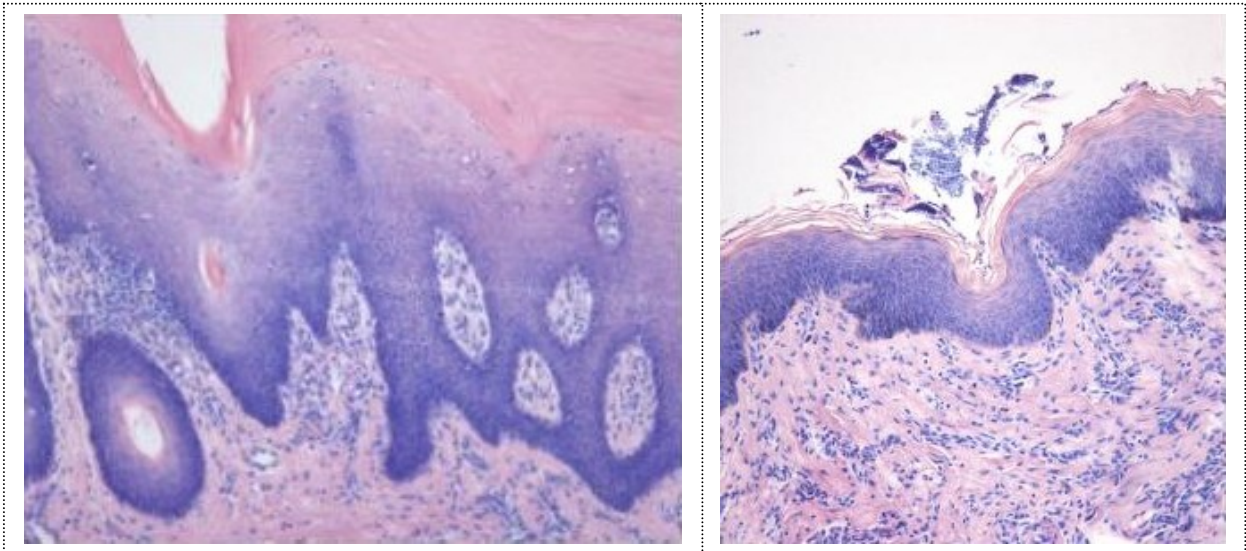


Abb. 5.6: Histologisches Bild der Balanoposthitis in Stadium II (Giemsa Färbung, Vergrößerung x1000)

Stadium III zeigt die Ulzeration des Plattenepithels (Abb. 5.8). Eine massive Beteiligung von runden bis keulenförmigen sowie fadenförmigen und gewundenen Bakterien (Abb. 5.9), die sich auch elektronenmikroskopisch darstellen lassen (Abb. 5.10), ist erkennbar.

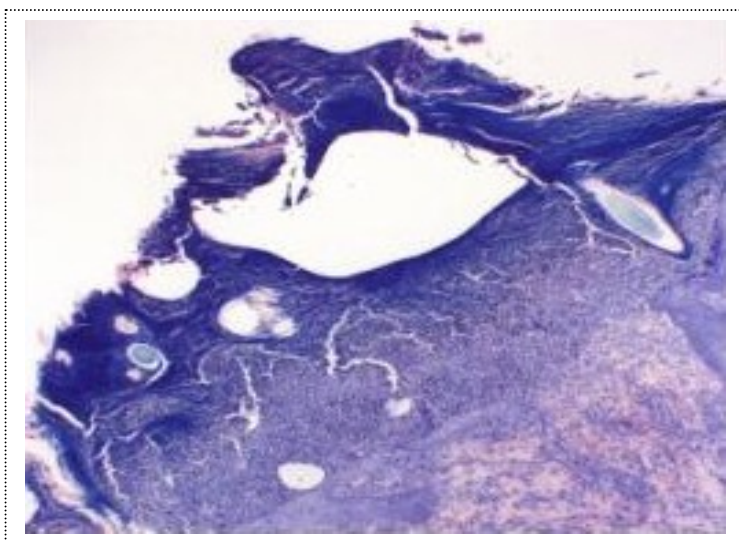


Abb.5.7: Histologisches Bild der Balanoposthitis in Stadium III (Giemsa Färbung, Vergrößerung x400)

ERGEBNISSE

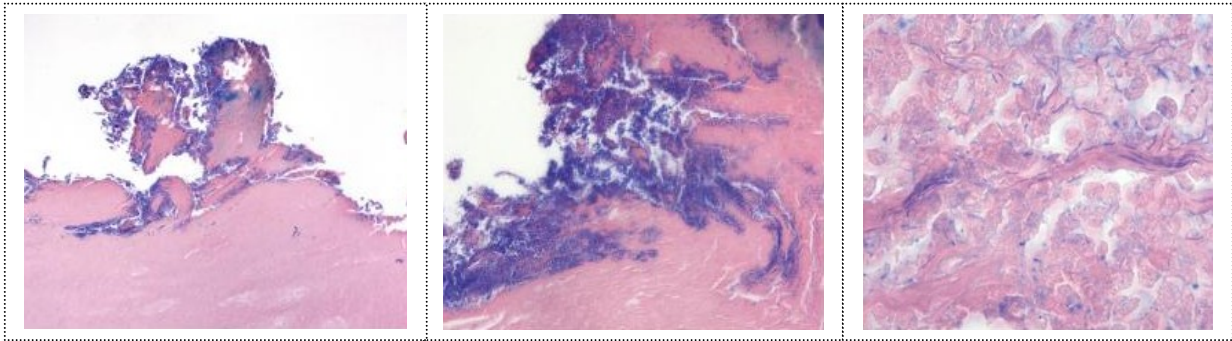


Abb. 5.8: Hyperkeratose mit massiven Ansammlungen von Bakterien (Giemsa Färbung, Vergrößerungen x400, x1000)

Es wurde weiterhin eine Silberfärbung nach Warthin und Starry durchgeführt um Bakterien, insbesondere möglicherweise vorhandene Fusobakterien und Spirochäten, besser darzustellen.

In Präparaten von nekrotischem Präputialgewebe stellten sich fadenförmige und gewundene Strukturen dar, die in Abb. 5.11 gezeigt sind.

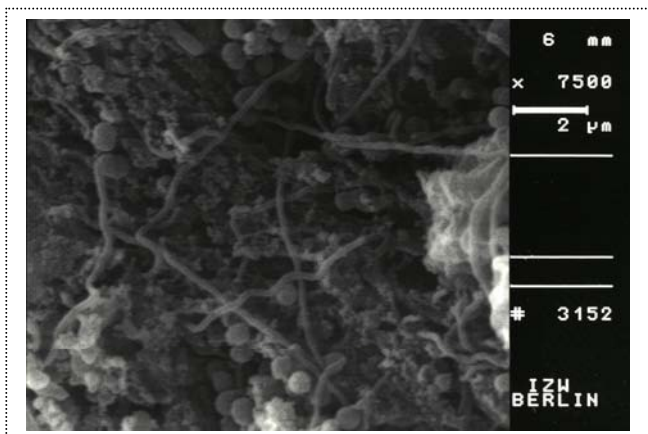


Abb. 5.9:
Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Spirochäten in einer Präputialgewebeprobe eines Wisentbullen

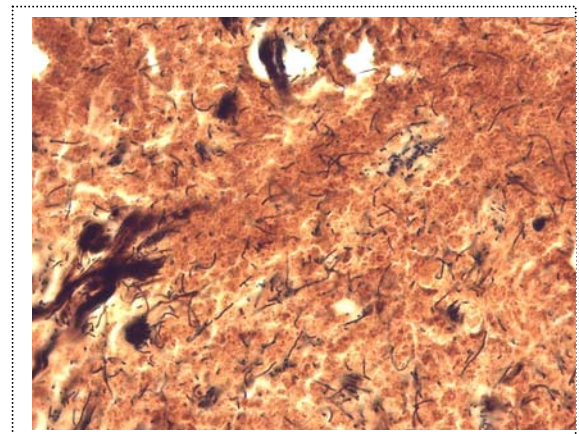


Abb. 5.10:
Silberfärbung nach Warthin und Starry. Zu erkennen sind fadenförmige und gewundene dunkel angefärbte Bakterien (x 1000)

E R G E B N I S S E

Es wurden insgesamt 44 Wisentbullen untersucht, von diesen waren 25 an Balanoposthitis in unterschiedlicher Ausprägung erkrankt (Tab. 5.1).

Datum der Probennahme	Wisentnummer	Alter	Krankheitsstadium	
1	18.12.01	W2/01	4 Jahre	III
2	18.12.01	W3/01	4 Jahre	III
3	19.12.01	W4/01	2 Jahre	III
4	04.01.02	W1/02	18 Jahre	gesund
5	09.01.02	W2/02	8 Monate	I
6	09.01.02	W4/02	5 Monate	I
7	10.01.02	W6/02	5 Monate	II
8	10.01.02	W7/02	5 Monate	gesund
9	21.01.02	W10/02	1 Jahr	II
10	06.02.02	W18/02	7 Monate	gesund
11	20.02.02	W28/02	8 Monate	gesund
12	17.12.02	W34/02	20 Jahre	II
13	18.12.02	W37/02	13 Jahre	gesund
14	05.11.02	W44/02	18 Jahre	II
15	19.11.02	W45/02	14 Jahre	gesund
16	25.11.02	W46/02	11 Jahre	II
17	5.12.02	W47/02	5 Jahre	III
18	5.12.02	W48/02	8 Jahre	gesund
19	18.02.03	W53/03	7 Monate	gesund
20	18.02.03	W54/03	9 Monate	III
21	19.02.03	W55/03	3,5 Jahre	III
22	28.01.03	W58/03	9 Jahre	gesund
23	31.01.03	W60/03	8 Monate	gesund
24	4.02.03	W63/03	4 Jahre	III
25	11.02.03	W70/03	4 Monate	gesund
26	12.02.03	W73/03	8 Jahre	gesund
27	06.02.03	W74/03	1,5 Jahre	gesund
28	04.03.03	W75/03	16 Jahre	gesund
29	04.03.03	W76/03	8 Monate	II
30	04.03.03	W77/03	9 Monate	III
31	04.03.03	W78/03	7 Monate	gesund
32	05.03.03	W79/03	2 Jahre	III
33	22.02.03	W81/03	18 Jahre	III
34	09.12.03	W84/03	5 Monate	gesund

E R G E B N I S S E

35	09.12.03	W87/03	9 Jahre	II
36	13.01.04	W89/04	2,8 Jahre	III
37	13.01.04	W91/04	5 Monate	III
38	13.01.04	W90/04	2,6 Jahre	gesund
39	27.01.04	W94/04	7 Monate	gesund
40	28.01.04	W99/04	6 Monate	gesund
41	09.03.04	W101/04	10 Jahre	III
42	12.03.04	W103/04	4 Jahre	III
43	12.05.04	W105/04	3 Jahre	III
44	12.05.04	W106/04	3 Jahre	III

Tab. 5.1: Einteilung der Wisentbullen nach Krankheitsstadium und Alter (I: Initialstadium der Balanoposthitis, II: zweites Stadium der Balanoposthitis, III: drittes Stadium der Balanoposthitis)

Die am häufigsten beobachteten Stadien der Balanoposthitis waren nach histologischen Gesichtspunkten die Stadien II und III. In Stadium I befanden sich zwei Bullen, die beide unter zwei Jahre alt waren. Die meisten Tiere in Stadium III der Balanoposthitis waren zwischen zwei und sechs Jahre alt (Abb. 5.5)

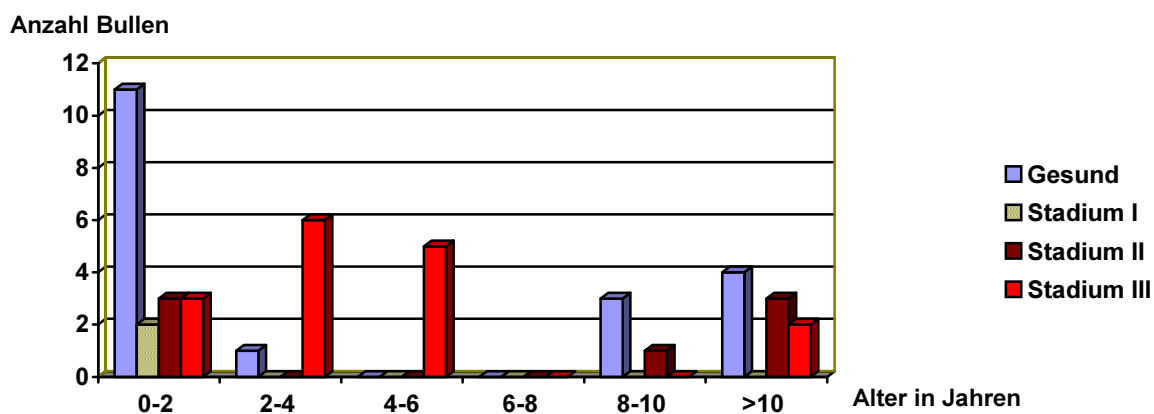


Abb. 5.11: Anzahl der gesunden und an Balanoposthitis erkrankten Bullen in den jeweiligen Krankheitsstadien in Abhängigkeit vom Alter

5.2 Bakteriologie

5.2.1 Anzucht

5.2.1.1 männliche Tiere Białowieża

Insgesamt wurden 44 Bullen untersucht, von diesen waren 25 an Balanoposthitis erkrankt und 19 ohne klinische Veränderungen am Genitaltrakt. Die Anzahl und Menge der isolierten Bakterienspezies sind in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium in Tab. 5.2. dokumentiert.

Die bakterielle Besiedelung des Genitaltrakts kranker und gesunder Bullen unterschied sich deutlich. Auch in den drei Krankheitsstadien ließen sich Unterschiede sowohl in der Häufigkeit des Nachweises der einzelnen Bakterienarten, als auch in der Diversität des isolierten Bakterienspektrums feststellen.

Bei den gesunden Bullen und den Bullen in Stadium I wurden hauptsächlich Bakterien isoliert, die zur Gruppe der grampositiven Kokken und Stäbchen gehören oder aber in der Umwelt verbreitet sind. Gramnegative Keime wurden kaum gefunden. Die Menge der isolierten Keime war + bis ++.

Bei Bullen in Stadium II und III der Krankheit wurde eine größere Anzahl an verschiedenen Bakterienarten isoliert, auch die Anzahl an anaeroben Bakterien war wesentlich höher. Es wurden außerdem zwei bislang unbekannte *Arcanobacterium* spp. isoliert, auf die in Kapitel 5.2.2 näher eingegangen wird.

E R G E B N I S S E

Wisente ♂ (n=44)															
gesund (n=19)	Menge	Anzahl Wirts Individuen	Stadium I (n=2)			Stadium II (n=7)			Stadium III (n=16)			Menge	Anzahl Wirts- Individuen		
			Menge	Anzahl Wirts- Individuen	Stadium I (n=2)	Menge	Anzahl Wirts- Individuen	Stadium II (n=7)	Menge	Anzahl Wirts- Individuen	Stadium III (n=16)				
<i>Bacillus</i> spp.	+ - + +	1												+++	9
<i>Corynebacterium (C.) renale</i> group	+ - + +	3												+++ + + +	4
<i>Corynebacterium</i> spp.	+ - + +	5												+++ + + +	3
<i>Micrococcus</i> sp.	+ - + +	3												+++ + + +	5
<i>Staphylococcus</i> Spp.	+ - + +	4												+++ + + +	1
														++	2
														+++ + + +	4
														+++ + + +	1
														++	5
														+++ + + +	6

Tab.5.2: Anzahl und Menge isolierter Bakterienspezies bei den Wisentbullen in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium

E R G E B N I S S E

5.2.1.2 weibliche Tiere Białowieża

Im Rahmen des Projekts wurden auch 40 weibliche Wisente bakteriologisch untersucht. Die Anzahl der isolierten Bakterienspezies sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst. Die Menge angezüchteter Bakterien betrug nie mehr als +--+-. Die isolierten Spezies gehören zum großen Teil den grampositiven Kokken und Stäbchen an. Weiterhin wurden Bakterien angezüchtet die zu den *Enterobacteriaceae* gehören.

Wisente (n=40)	
Isolierte Bakterienspezies	Anzahl Wirtsindividuen
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	3
<i>Brevibacterium</i> Gruppe B	5
<i>Corynebacterium afermentans/ coyleae</i>	11
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	1
<i>Corynebacterium propinquum</i>	1
<i>Corynebacterium accolens</i>	1
<i>Corynebacterium cystitidis</i>	1
<i>Corynebacterium jeikeum</i>	6
<i>Corynebacterium renale group</i>	3
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	4
<i>Escherichia coli</i>	10
<i>Enterococcus spp.</i>	11
<i>Enterobacter sp.</i>	1
<i>Kocuria varians</i>	1
<i>Micrococcus spp.</i>	8
<i>Pasteurella sp.</i>	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	9
<i>Staphylococcus capitis</i>	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
<i>Staphylococcus hyicus/ chromogenes</i>	22
<i>Staphylococcus hominis</i>	1
<i>Staphylococcus lentus</i>	1
<i>Staphylococcus sciuri</i>	1
<i>Staphylococcus warneri</i>	1
<i>Staphylococcus xylosus</i>	4
<i>Staphylococcus spp.</i>	5
<i>Streptococcus spp.</i>	17

Tab. 5.3: Anzahl isolierter Bakterienspezies bei den Wisentkühen

5.2.1.3 männliche Tiere aus Zoos und Wildgehegen in Deutschland

Zum Vergleich der Bakterienflora der Wisentbullen wurden Tupferproben von gesunden Wisenten aus Gehegehaltung in Deutschland genommen. Die Menge der isolierte Bakterien betrug nie mehr als +---.

Die Anzahl der isolierten Bakterienspezies sind in Tabelle 5.4 zusammengefasst.

Wisente ♂ Deutschland (n=8)		
Isolierte Bakterienspezies	Anzahl Wirtsindividuen diverse Zoos (n=3)	Anzahl Wirtsindividuen Wisentgehege Springe (n=5)
<i>Corynebacterium propinquum</i>	1	-
<i>Corynebacterium renale group</i>	-	4
<i>Escherichia coli</i>	-	-
<i>Enterococcus spp.</i>	-	-
<i>Micrococcus spp.</i>	3	-
<i>Pasteurella sp.</i>	1	-
<i>Staphylococcus hominis</i>	-	1
<i>Staphylococcus spp.</i>	-	2
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	-
<i>Staphylococcus xylosus</i>	2	-
<i>Pseudomonas putida</i>	1	-
<i>Streptococcus spp.</i>	-	5

Tab. 5.4: Anzahl isolierter Bakterienspezies bei den Wisentbullen aus Deutschland

5.2.2 Charakterisierung von zwei bislang unbekanntem *Arcanobacterium* spp.

Im Rahmen dieser Untersuchung konnten zwei neue *Arcanobacterium* spp. (Stamm 1 und Stamm 2) von erkrankten Bullen isoliert werden. Es gelang die Anzucht von jeweils einer der beiden Spezies aus Präputialtupfern von 13 erkrankten Tieren (Tab. 5.5). Sie wurden immer massenhaft isoliert (+++). Bei Inkubation unter anaeroben Bedingungen und in CO₂ angereicherter Atmosphäre war das Wachstum verlangsamt. Von Stamm 1 wurden vier Isolate angezüchtet und von Stamm 2 neun Isolate

Wisent- Nummer (Stammnummer <i>Arcanobacterium</i> spp.)	Balanoposthitis Stadium
W3/01 (1)	III
W4/01 (2)	III
W10/02 (1)	II
W34/02 (2)	II
W76/03 (2)	II
W79/03 (2)	III
W87/03 (2)	II
W89/04 (1)	III
W91/04 (1)	III
W101/04 (2)	III
W103/04 (2)	III
W105/04 (2)	III
W106/04 (2)	III

Tab. 5.5: Anzucht *Arcanobacterium* spp. im Zusammenhang mit dem Stadium der Balanoposthitis

5.2.2.1 Kulturmorphologie

Die beiden neuen Spezies unterschieden sich morphologisch nicht voneinander. Die Wachstumszeit auf Columbia Agar betrug 48-72 h. Die Isolate waren nach 48 h aerober Bebrütung bei 37°C als feine, glasige, stecknadelkopfgroße runde Kolonien mit mehr oder weniger stark ausgeprägter vollständiger Hämolyse zu erkennen (Abb. 5.12 und 5.13). Die Oberfläche der Kolonien ist glatt und glänzend, der Rand scharf abgegrenzt. Mit einer Impföse sind die Kolonien leicht vom Agar abzuheben.

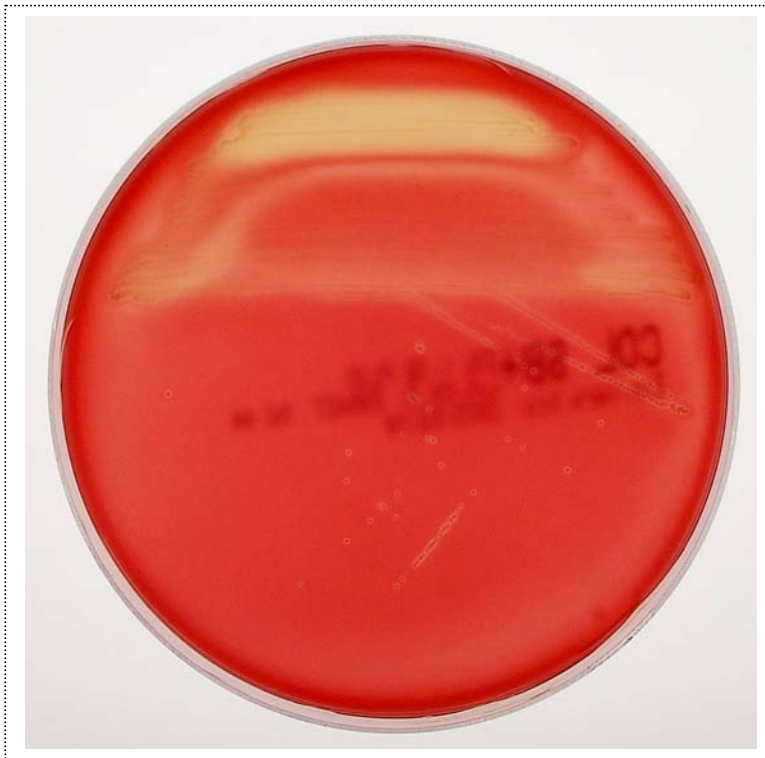


Abb. 5.12: *Arcanobacterium* sp. auf Columbia Agar

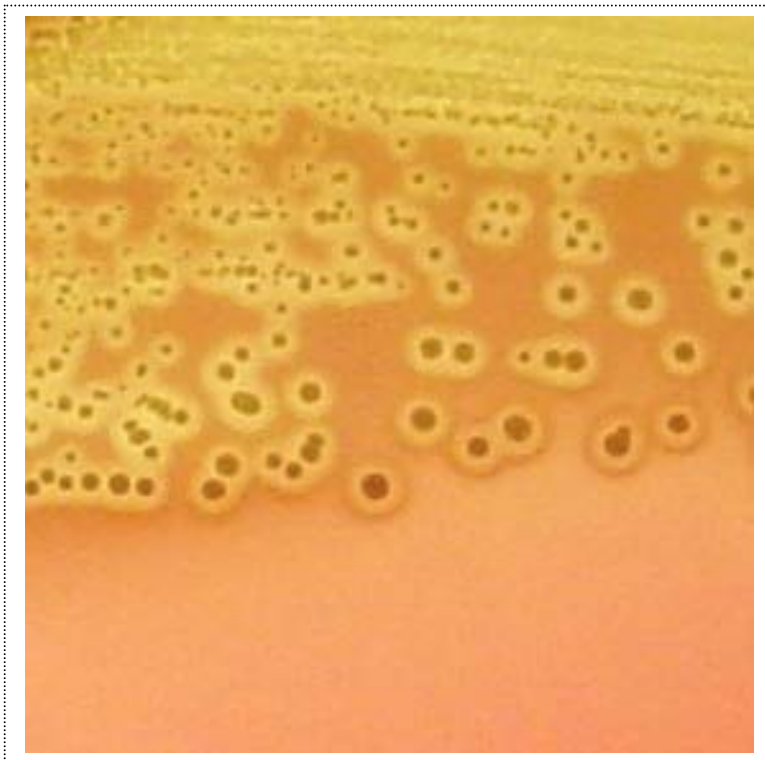


Abb. 5.13: *Arcanobacterium* sp. Hämolyse auf Columbia Agar

5.2.2.2 Lichtmikroskopie

Unter dem Lichtmikroskop waren bei 1000x Vergrößerung in einem nach Gram gefärbten Präparat pleomorphe grampositive zum Teil auch gramlabile, ca. 1 µm lange Stäbchen zu erkennen (Abb. 5.14).

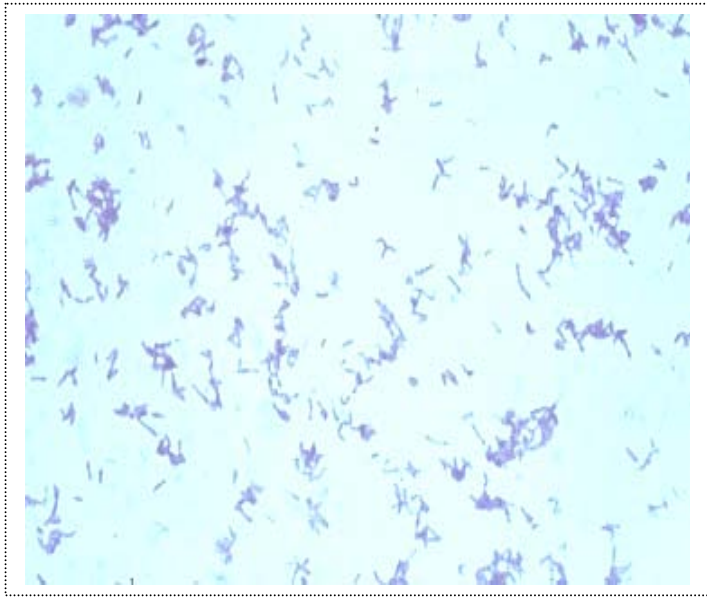


Abb. 5.14: Grampräparat *Arcanobacterium* sp. (x 1000)

5.2.2.3 Biochemische Eigenschaften

Zur Charakterisierung der beiden neuen Spezies und zur Abgrenzung von verwandten Spezies wurde ein biochemisches Profil erstellt. Hierzu wurden die Katalase und Oxidase Aktivität getestet, sowie ein O/F-Test durchgeführt. Weiterhin wurde die Lyse von Pferdeserum auf Löffler Serumplatten untersucht. Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten wurden folgende kommerziell erhältliche Testsysteme durchgeführt: api[®]CORYNE, api[®]ZYM und api[®]CH 50. Die Ergebnisse aller biochemischen Untersuchungen sind in Tab. 5.6., Tab. 5.7. und Tab. 5.8. aufgeführt. Alle Isolate waren Katalase und Oxidase negativ. Im O/F Test waren sie unreaktiv und sie zeigten auch keine Serolyse auf der Löffler Serumplatte.

E R G E B N I S S E

Wisentnummer (Stammnummer <i>Arcanobacterium</i> spp.)	W3/01 (1)	W4/01 (2)	W10/02 (1)	W34/02 (2)	W76/03 (2)	W79/03 (2)	W87/03 (2)	W89/03 (1)	W91/03 (1)	W101/04 (2)	W103/04 (2)	W105/04 (2)	W106/04 (2)
Katalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Serolyse	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CAMP test	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O/F - Test	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
api[®]ZYM													
Alkalische Phosphatase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esterase (C4)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esterase Lipase (C8)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lipase (C14)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leucin arylamidase	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Valin arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cystin arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trypsin	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-
a- chymotrypsin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
saure Phosphatase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Naphtol-ASBI-phosphohydrolyse	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
a-Galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Glucuronidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β- Galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
a- Glucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-acetyl-β-Glucosamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Glucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
a-Mannosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
a-Fucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 5.6: Biochemische und enzymatische Reaktionen im api[®]ZYM der 13 Isolate der neuen *Arcanobacterium* spp.

E R G E B N I S S E

Wisentnummer (Stammnummer <i>Arcanobacterium</i> spp.)	W3/01 (1)	W4/01 (2)	W10/02 (1)	W34/02 (2)	W76/03 (2)	W79/03 (2)	W87/03 (2)	W89/03 (1)	W91/03 (1)	W101/04 (2)	W103/04 (2)	W105/04 (2)	W106/04 (2)
api®CORYNE													
Nitratreduktion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyrazinamidase	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyrrolinodyl Arylamidase	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alkalische Phosphatase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β- Glucuronidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-Galactosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -Glucosidase	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
N-Acetyl-β-Glucosaminidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
β-Glucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Saccharose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 5.7: Reaktionen der 13 Isolate der neuen *Arcanobacterium* spp. im api®CORYNE

E R G E B N I S S E

api[®]CH 50

Reaktion	Anzahl positive Isolate/ Anzahl getestete Isolate 24 h		% positive insgesamt	Anzahl positive Isolate/ Anzahl getestete Isolate 48 h		% positive insgesamt
	Stamm 1 (n=4)	Stamm 2 (n=9)		Stamm 1 (n=4)	Stamm 2 (n=9)	
Glycerol	0/4	0/9	0%	4/4	7/9	85%
Erythritol	0/4	0/9	0%	1/4	7/9	62%
Ribose	0/4	0/9	0%	1/4	7/9	62%
Adonitol	0/4	0/9	0%	1/4	5/9	46%
D-Glucose	4/ 4	8/9	92%	4/4	9/9	100%
D-Fructose	0/ 4	7/9	54%	4/4	9/9	100%
Dulcitol	0/4	1/9	8%	0/4	1/9	8%
Inositol	0/4	0/9	0%	0/4	1/9	8%
Amygdaline	0/4	0/9	0%	0/4	1/9	8%
Arbutine	0/4	0/9	0%	0/4	1/9	8%
Maltose	3/4	0/9	23%	3/4	1/9	31%
Lactose	0/4	1/9	8%	0/4	3/ 9	23%
Melezitose	0/4	0/9	0%	1/4	0/9	8%
D-Raffinose	0/4	0/9	0%	0/4	1/9	8%
Amidose	0/4	0/9	0%	1/4	0/9	8%
Glycogene	0/4	0/9	0%	0/4	1/9	8%
Xylitol	0/4	0/9	0%	2/4	4/9	46%
β-Gentiobiose	0/4	0/9	0%	0/4	1/9	8%
D-Turanose	0/4	0/9	0%	0/4	1/9	8%
D-Xylose	0/4	0/9	0%	1/4	0/9	8%
D-Tagatose	0/4	0/9	0%	0/4	1/9	8%
D-Arabitol	0/4	0/9	0%	2/4	8/9	77%
L-Arabitol	0/4	0/9	0%	2/4	8/9	77%
Gluconate	0/4	0/9	0%	0/4	1/9	8%

Tab. 5.8: Reaktionen der 13 Isolate der neuen *Arcanobacterium* spp. im api[®]CH 50

5.2.2.4. Phylogenetische Einordnung

Zur phylogenetischen Einordnung der neuen Isolate wurden Strang und Gegenstrang der 16S rDNA (ca.1400 bp) sequenzanalysiert. Hierzu wurden die Primerkombination TPU1 und RTU8 sowie SeqFW und SeqRE verwendet. Der Vergleich der Sequenzen von allen 13 Isolaten mit Einträgen in der Genbank ergab eine Ähnlichkeit von 96% zu *Arcanobacterium pyogenes*. Beim Sequenzvergleich aller Isolate untereinander bildeten sich zwei verwandte Gruppen. In der Gruppe 1 gruppierten sich neun der Isolate. Die zweite, etwas heterogenere Gruppe, umfasst die anderen vier Isolate. Diese sind untereinander zu 99,2% identisch und mit den Isolaten in Gruppe 1 zu 97,2%. Die Einordnung der neuen Isolate in ein Dendrogramm der *Actinomycetaceae* ist in Abb. 5.15 zu sehen. Die Isolate sind am engsten mit *A. pyogenes* (96,1% und 96,4%) und *A. bernardiae* (95,5% und 95,8%) verwandt. Als Typstämme wurden die Isolate von Wisent W3/01 (Stamm 1) und W106/04 (Stamm 2) gewählt. Das Isolat von W3/01 wird unter der Bezeichnung *Arcanobacterium bialowiezense* geführt und das Isolat von W106/04 unter der Bezeichnung *Arcanobacterium bonasi*.

ERGEBNISSE

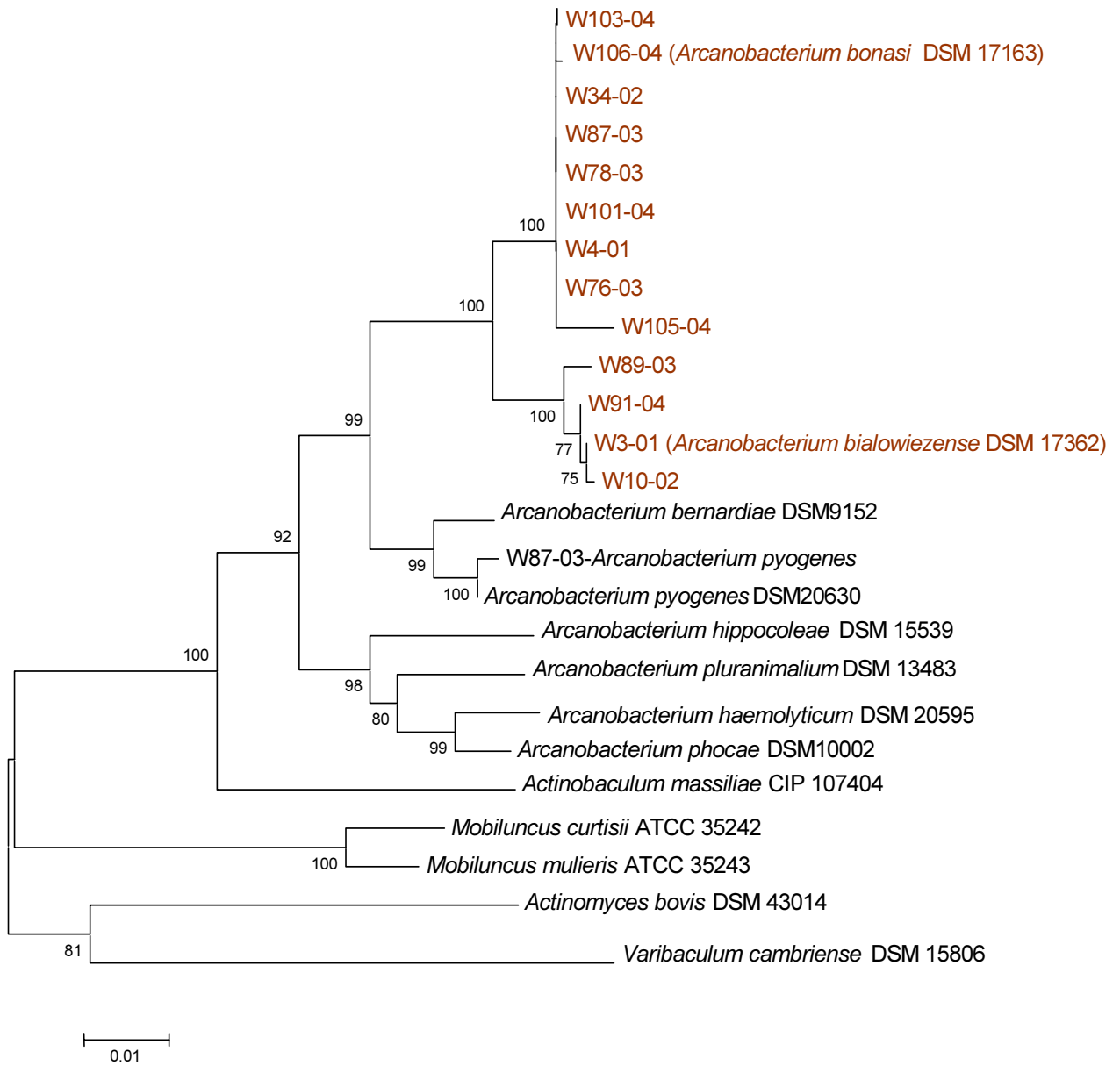


Abb. 5.15: Dendrogramm (Kimura-2-Parameter Distanzwerte; Neighbor-Joining) zur Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaft basierend auf den 16S rDNA Sequenzen der *Actinomycetaceae*

5.2.2.5 *A. bonasi* und *A. bialowiezense* spezifische PCR

Um die Möglichkeit zu haben, die beiden neuen *Arcanobacterium* spp. auch im Gewebe nachzuweisen, wurde eine spezifische PCR entwickelt. Zu diesem Zweck wurden mit Hilfe der Alignments der 16S rDNA der Isolate und von Vergleichssequenzen Primer ausgewählt die spezifisch für beide Isolate sind und ein ca. 250 bp großes Stück der 16S rDNA amplifizieren. Für die Primer wurde eine Annealing-Temperatur von 58°C berechnet.

Um die Spezifität der Primer auszutesten, wurden verschiedene Bakterienspezies als Kontrolle in die PCR eingesetzt. Die Ergebnisse der PCR sind in Abbildung 5.16 dargestellt.

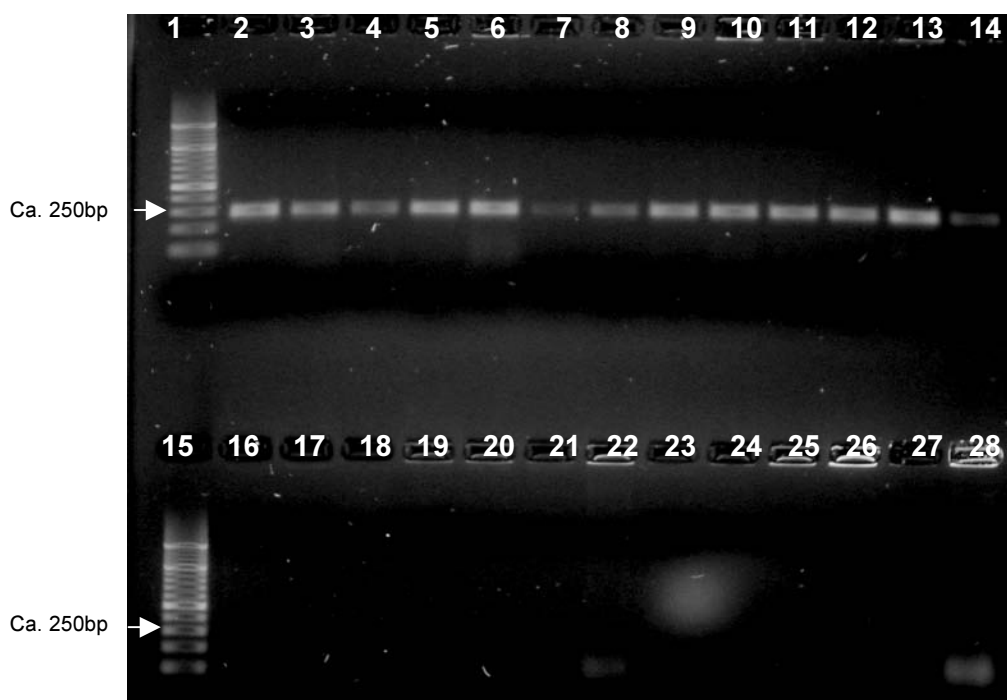


Abb. 5.16: *A. bialowiezense* und *A. bonasi* spezifische PCR

1.	Standard	15.	Standard
2.	W3/01 (<i>A. bialowiezense</i>)	16.	Negativkontrolle
3.	W4/01 (<i>A. bonasi</i>)	17.	<i>Arcanobacterium hippocolae</i> DSM 15539
4.	W10/02 (<i>A. bialowiezense</i>)	18.	<i>Arcanobacterium haemolyticum</i> DSM 20595
5.	W34/03 (<i>A. bonasi</i>)	19.	<i>Arcanobacterium bernardiae</i> DSM 9152
6.	W76/03 (<i>A. bonasi</i>)	20.	<i>Arcanobacterium pluranimalium</i> DSM 13438
7.	W79/03 (<i>A. bonasi</i>)	21.	<i>Arcanobacterium phocae</i> DSM 10002
8.	W87/03 (<i>A. bonasi</i>)	22.	<i>Arcanobacterium pyogenes</i> DSM 20630
9.	W89/04 (<i>A. bialowiezense</i>)	23.	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>
10.	W91/04 (<i>A. bialowiezense</i>)	24.	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>
11.	W101/04 (<i>A. bonasi</i>)	25.	<i>Staphylococcus luteus</i>
12.	W103/04 (<i>A. bonasi</i>)	26.	<i>Staphylococcus intermedius</i>
13.	W105/04 (<i>A. bonasi</i>)	27.	<i>Streptococcus agalactiae</i> DSM 6784
14.	W106/04 (<i>A. bonasi</i>)	28.	<i>Mannheimia haemolytica</i>

ERGEBNISSE

Im Anschluss daran wurde Gewebe von sieben gesunden Wisentbullen und neun der kranken Bullen, die keine Isolierung der neuen Spezies ergaben, mittels dieser PCR untersucht. Als Positivkontrolle wurde *Arcanobacterium bonasi* mitgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.17 und 5.18 dargestellt.

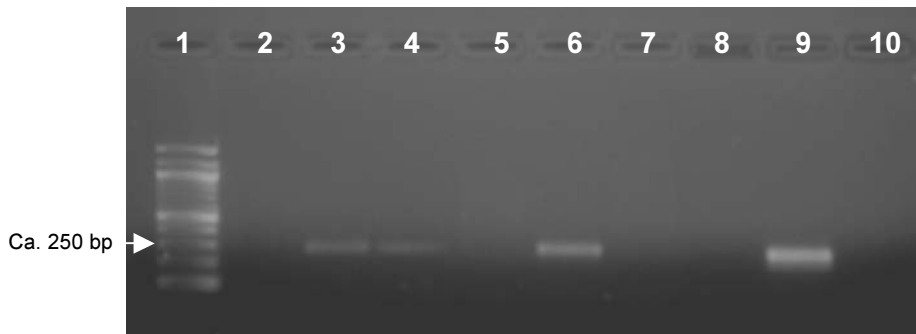


Abb.: 5.17

- | | |
|------------------|----------------------------------|
| 6. Standard | 1. W6/02 |
| 7. W1/01 | 2. W18/02 |
| 8. W2/01 | 3. W28/02 |
| 9. W2/02 | 4. <i>Arcanobacterium bonasi</i> |
| 10. W4/02 | 5. Negativkontrolle |

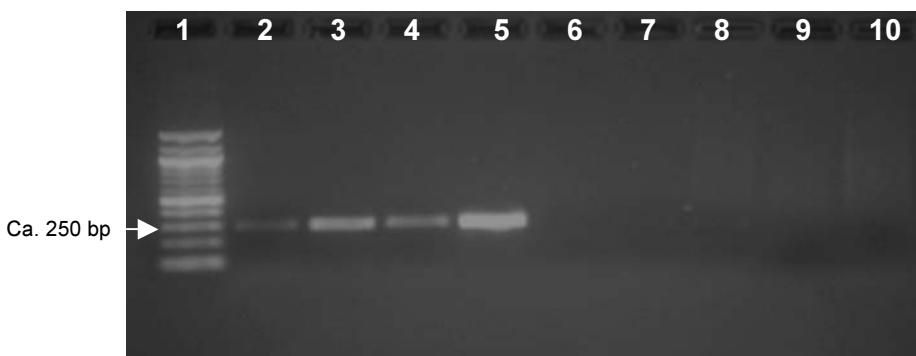


Abb.: 5.18

- | | |
|-------------------|---------------------|
| 6. Standard | 1. W55/03 |
| 7. W44/02 | 2. W75/03 |
| 8. W46/02 | 3. W90/03 |
| 9. W47/02 | 4. WD3 |
| 10. W54/03 | 5. Negativkontrolle |

Aus Präputialgewebe von sieben der neun erkrankten Bullen (fett gedruckt) konnte ein PCR Produkt gewonnen werden. Einer dieser Bullen (W2/02) befand sich in Stadium I der Balanoposthitis, drei befanden sich in Stadium II und vier in Stadium III der Erkrankung.

ERGEBNISSE

5.2.2.6 BOX PCR

Mit der BOX PCR lassen sich die Isolate in zwei Gruppen einordnen, die untereinander identisch sind. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.19 und 5.20 dargestellt.

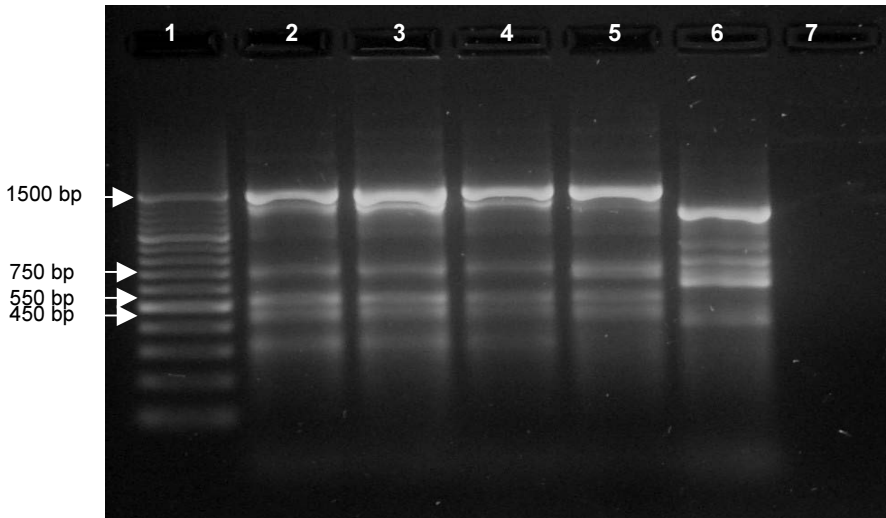


Abb.: 5.19 : Box PCR *A. bialowiezense*

- | | | | |
|----|----------|----|--------------------|
| 1. | Standard | 5. | W91/04 |
| 2. | W3/01 | 6. | <i>A. pyogenes</i> |
| 3. | W10/02 | 7. | Negativkontrolle |
| 4. | W89/03 | | |

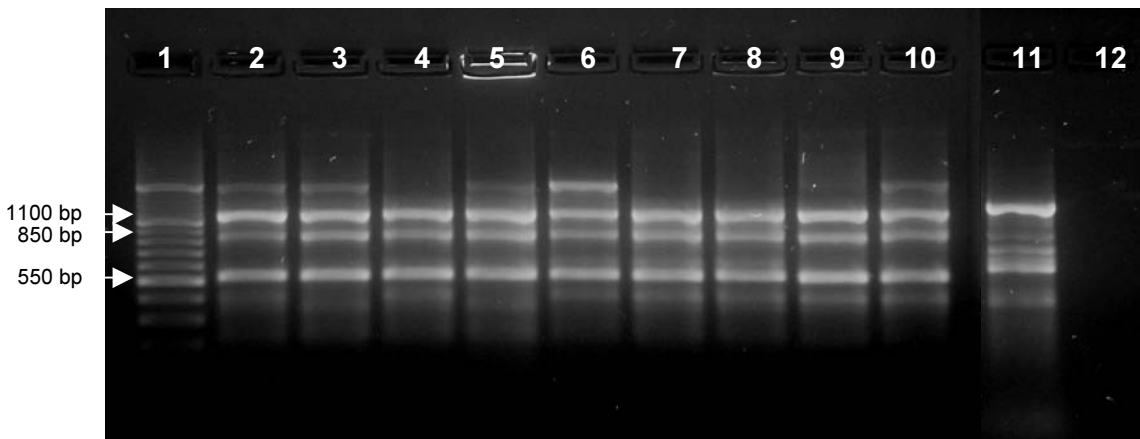


Abb.: 5.20 : Box PCR *A. bonasi*

- | | | | |
|----|----------|-----|--------------------|
| 1. | Standard | 7. | W101/04 |
| 2. | W4/01 | 8. | W103/04 |
| 3. | W34/02 | 9. | W105/04 |
| 4. | W76/03 | 10. | W106/04 |
| 5. | W79/03 | 11. | <i>A. pyogenes</i> |
| 6. | W87/03 | 12. | Negativkontrolle |

5.2.2.7 SDS Page

Der Vergleich der Proteinbandenprofile der neuen *Arcanobacterium* spp. mit sechs weiteren *Arcanobacterium* spp. ergab deutliche Unterschiede (Abb. 5.21).

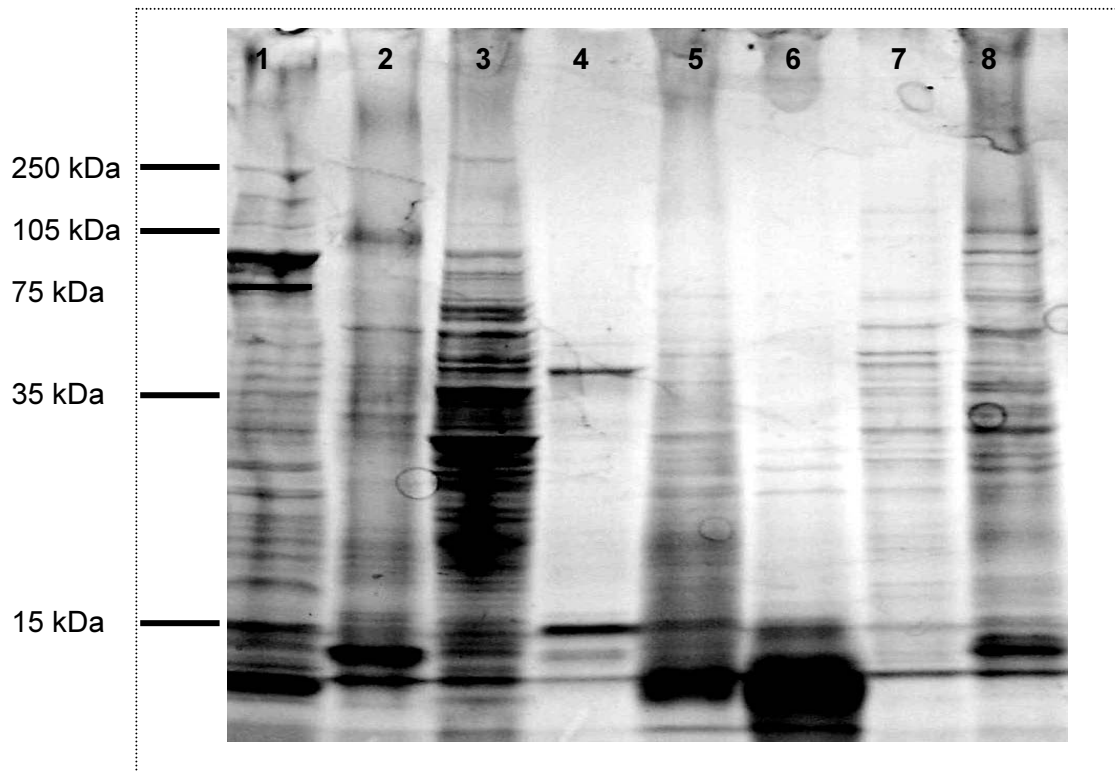


Abb.: 5.21 Proteinanalyse. Elektropherogramm des Gesamtproteinextraktes der Isolate und sechs weiterer *Arcanobacterium* spp.

-
1. *A. bernardiae*
 2. *A. haemolyticum*
 3. *A. hippocolae*
 4. *A. pluranimalium*
 5. *A. phocae*
 6. *A. pyogenes*
 7. *A. bonasi*
 8. *A. bialowiezense*
-

5.2.3 Molekulargenetische Untersuchungen auf Spirochäten

5.2.3.1 Dot Blot Hybridisierung

Gewebe von 12 kranken Bullen wurde mittels eubakterieller PCR und Dot Blot Hybridisierung mit Treponemen-spezifischen Sonden auf das Vorkommen von relevanten *Treponema* spp. untersucht.

Bei allen kranken Bullen konnte in der eubakteriellen PCR ein PCR Produkt gewonnen werden, während die gesunden Kontrolltiere negativ reagierten .

In der Dot Blot Hybridisierung mit Treponema- spezifischen Sonden konnte in keinem Fall ein Signal produziert werden.

5.2.3.2 PCR mit Gattungsspezifischen Primern

Leptospiren

In der Gattungsspezifischen PCR konnte bei keinem der Bullen ein PCR Produkt gewonnen werden.

Brachyspiren

In der Gattungsspezifischen PCR konnte bei keinem der Bullen ein PCR Produkt gewonnen werden.

Borrelien

In der Gattungsspezifischen PCR konnte bei keinem der Bullen ein PCR Produkt gewonnen werden.

E R G E B N I S S E

5.2.4 Untersuchung auf Mykoplasmen

5.2.4.1 männliche Wisente

Eine Anzucht von Mykoplasmen aus den Tupferproben gelang nicht. Vier der kranken Bullen waren in der PCR positiv, die gesunden waren alle negativ. Vierzehn der kranken Bullen hatten Antikörper gegen *M. bovis genitalium*, ebenso fünf der gesunden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.9 dargestellt.

Wisentnummer	Alter	Balanoposthitis Stadium	Serologie	Kultur	PCR
2/01	4 Jahre	III	+	-	-
3/01	4 Jahre	III	+	-	-
4/01	2 Jahre	III	+	-	-
47/02	5 Jahre	III	+	n. u.	n. u.
54/03	9 Monate	III	+	-	+
55/03	3,5 Jahre	III	+	-	-
63/03	4 Jahre	III	+	n. u.	n. u.
77/03	9 Monate	III	+	-	-
79/03	2 Jahre	III	+	-	-
81/03	18 Jahre	III	+	n. u.	n. u.
89/04	2,8 Jahre	III	-	-	-
90/04	5 Monate	III	-	-	-
101/04	10 Jahre	III	-	-	-
103/04	4 Jahre	III	-	-	-
105/04	3 Jahre	III	-	-	-
106/04	3 Jahre	III	-	-	-
6/02	5 Monate	II	+	-	+
10/02	1 Jahr	II	+	-	+
34/02	20 Jahre	II	+	-	-
44/02	18 Jahre	II	-	n. u.	n. u.
46/02	11 Jahre	II	+	n. u.	n. u.
76/03	9 Monate	II	-	-	-
87/03	9 Jahre	II	-	-	-
2/02	8 Monate	I	-	-	-

E R G E B N I S S E

4/02	5 Monate	I	-	-	-
1/02	18 Jahre	gesund	-	n. u.	n. u.
7/02	5 Monate	gesund	+	-	-
18/02	7 Monate	gesund	+	n. u.	n. u.
28/02	8 Monate	gesund	-	n. u.	n. u.
37/02	13 Jahre	gesund	+	-	-
45/02	14 Jahre	gesund	+	n. u.	n. u.
48/02	8 Jahre	gesund	-	n. u.	n. u.
53/03	7 Monate	gesund	-	-	-
58/03	9 Jahre	gesund	-	n. u.	n. u.
60/03	8 Monate	gesund	-	n. u.	n. u.
70/03	4 Monate	gesund	-	n. u.	n. u.
73/03	8 Jahre	gesund	-	n. u.	n. u.
74/03	1,5 Jahre	gesund	+	-	+
75/03	18 Jahre	gesund	-	-	-
78/03	7 Monate	gesund	-	-	-
84/03	5 Monate	gesund	-	n. u.	n. u.
90/04	2,6 Jahre	gesund	-	-	-
94/04	7 Monate	gesund	-	n. u.	n. u.
99/04	6 Monate	gesund	-	n. u.	n. u.

Tab. 5.9 Ergebnisse der Untersuchungen auf *Mycoplasma bovis* bei den Wisentbullen

E R G E B N I S S E

5.2.4.2 weibliche Wisente

Eine Anzucht von Mykoplasmen aus dem Tupfermaterial gelang nicht. Alle Wisentkühe waren negativ in der PCR. Siebzehn Kühe wurden positiv auf Antikörper gegen *M. bovis genitalium* getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.10 dargestellt

Wisentnummer	Alter	Serologie
1/01	24 Jahre	-
3/02	1,5 Jahre	+
5/02	5 Monate	-
8/02	5 Monate	-
9/02	6 Monate	-
11/02	8 Monate	+
12/02	5 Monate	+
13/02	9 Monate	+
14/02	4 Jahre	+
15/02	3 Jahre	+
16/02	18 Jahre	-
17/02	6 Monate	-
19/02	8 Monate	-
20/02	7 Monate	-
21/02	1,5 Jahre	+
22/02	4 Monate	-
23/02	8 Monate	-
24/02	8 Jahre	-
25/02	5 Jahre	+
26/02	8 Monate	-
27/02	8 Monate	+
29/02	9 Monate	+
30/02	8 Monate	-
31/02	nicht bekannt	-
32/02	5 Monate	-
33/02	1,5 Jahre	-
35/02	19 Jahre	-
36/02	5 Monate	-
38/02	2 Jahre	-
39/02	5 Monate	+
40/02	8 Monate	-
41/02	9 Monate	+

E R G E B N I S S E

42/02	16 Jahre	-
43/02	8 Jahre	-
49/02	25 Jahre	+
50/03	nicht bekannt	+
51/03	nicht bekannt	-
52/03	nicht bekannt	-
56/03	nicht bekannt	-
57/03	nicht bekannt	-
59/03	16 Jahre	-
61/03	7 Monate	-
62/02	12 Jahre	+
64/03	8 Monate	-
65/03	4 Jahre	-
66/03	3,5 Monate	-
67/03	7 Monate	+
68/03	8,5 Jahre	-
69/03	4,5 Jahre	-
71/03	7,5 Jahre	+
72/03	4,5 Monate	-
80/03	7,5 Jahre	-
82/03	2 Jahre	+

Tab. 5.10: Ergebnisse der Untersuchungen auf *Mycoplasma bovis* bei den Wisentkühen