

6. DISKUSSION

6.1 Methodenkritik

6.1.1 Relevanz der Untersuchungen

Der Wisent ist eine bedrohte Tierart (Appendix III (geschützte Tierart) der Berner Konvention zum Schutz der Lebensräume wildlebender Pflanzen und Tiere, bedrohte Art auf der IUCN roten Liste der bedrohten Tierarten) und die Balanoposthitis stellt ein ernst zu nehmendes Problem für die in Białowieża existierende Wisentpopulation dar. Im Spätstadium der Balanoposthitis erkrankte Bullen können durch die entzündlichen und nekrotischen Veränderungen an ihrem Präputium, die auch auf den Penis übergreifen, nicht mehr am Reproduktionsgeschehen teilnehmen. Durch den regelmäßigen Ausfall der an Balanoposthitis erkrankten Bullen (zwischen 5 und 10% pro Jahr) wird das genetische Potential der Białowieża Population vermutlich weiter eingeschränkt. Die Manifestation von genetischen Defekten wird hierdurch unter Umständen begünstigt, was folglich eine Gefahr für den Fortbestand der Population bedeuten kann. Solange nicht abschließend geklärt ist, ob die Balanoposthitis übertragbar oder vererbbar ist, bleibt es ein Risiko, die Tiere in der internationalen Zucht zu verwenden, bzw. Tiere mit anderen Züchtern auszutauschen, um eine höhere genetische Varianz zu erreichen.

Für den polnischen Nationalpark in Białowieża stellt der Wisent als letztes freilebendes Wildrind und größtes Säugetier Europas eine Touristenattraktion und damit einen erheblichen Wirtschaftsfaktor dar. Der Wisent wurde durch den Einfluss des Menschen (vorwiegend direkte Verfolgung) fast ausgerottet. Ein geeignetes Habitat ist für den Wisent in weiten Teilen Polens ausreichend vorhanden und es ist wichtig die Population wieder soweit zu stabilisieren, dass sie in sich und im Verbund mit den anderen dort beheimateten Tierarten, in einem stabilen Gleichgewicht überleben kann. Dazu gehört auch die Kontrolle von Krankheiten, wie der Balanoposthitis. Die Möglichkeit, die Balanoposthitis zu kontrollieren bzw. zu therapieren, setzt die Kenntnis der Krankheitsursache voraus. Nachdem ätiologisch die Möglichkeiten einer Infektion mit Herpesviren und Pestiviren bereits ausgeschlossen werden konnte (Borchers et al., 2002), war es Aufgabe dieser Studie, die mögliche Beteiligung bakterieller Erreger an Krankheitsentstehung und Krankheitsverlauf zu untersuchen.

6.1.2 Probenmaterial/Probengewinnung

Die Wisente leben frei in einem 594 km² großen Areal. Im Sommer ist es aufgrund der dichten Vegetation unmöglich, Zugang zu den Tieren zu bekommen. Die Wisente halten sich dann in kleinen Gruppen tief im Wald auf und verhalten sich extrem scheu. Es besteht keine Möglichkeit Individuen zu beobachten, um kranke Bullen zu identifizieren. Daher ist auch eine Immobilisation bzw. Jagd in dieser Jahreszeit nicht möglich, und man ist auf die Jagdsaison während des Winters angewiesen. Zu dieser Jahreszeit werden die Wisente von der Nationalparkverwaltung zugefüttert und verlieren an den Futterplätzen einen Teil ihrer Scheu vor dem Menschen. Bei einer geschlossenen Schneedecke sammeln sich die Tiere in größeren Gruppen an den Futterplätzen. In diesem Fall ist es möglich, kranke Bullen zu erkennen und zu erlegen. Zusätzlich wird immer ein vorher festgelegter Teil der gesunden Bullen und der weiblichen Tiere geschossen, um die Population auf einem gleichbleibenden Niveau zu halten. Mit dieser Vorgehensweise erhält man zwar Probenmaterial von kranken und gesunden Tieren, jedoch ist eine systematische Beschreibung und Untersuchung der Krankheit nur eingeschränkt möglich.

So kann die Balanoposthitis immer nur an dem Punkt des Krankheitsgeschehens beurteilt werden, an dem die Probenentnahme am toten Tier erfolgt. Der Verlauf der Erkrankung kann leider nicht näher untersucht werden. Das Verfolgen potentieller jahreszeitlicher Schwankungen, sowohl in der Anzahl der erkrankten Bullen, als auch im Ausmaß der pathologischen Veränderungen, ist ausgeschlossen. So gehen wichtige Informationen bezüglich des Krankheitsprozesses vermutlich verloren. Insbesondere wäre es wichtig, Tiere im Anfangsstadium zu untersuchen, um eine klare Aussage über mögliche Ursachen zu erarbeiten. Unter der Annahme, dass im Anfangsstadium der Erkrankung keine makroskopischen Veränderungen zu erkennen sind, ist es vom Zufall abhängig ob man Proben von einem solchen Bullen bekommt.

Das Probensammeln war auch aufgrund der Lage des Nationalparks mit einigen methodischen und logistischen Problemen verbunden. Vor Ort stehen keine Labore und Arbeitsgeräte zur Verfügung, die für die adäquate Probenverarbeitung notwendig gewesen wären. Daher musste die komplette Ausrüstung 900 km mit einem Kleinbus von Berlin nach Białowieża transportiert werden, wodurch der Umfang an Materialien einschränkt wurde.

Es wurden jeweils nur die notwendigen Geräte wie ein Brutschrank, ein Kühlschrank, eine Gefriertruhe, steriles Präparationsbesteck, Tupfer und Medien für die Anzucht der Bakterien mitgenommen. Die vor Ort zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten wurden parallel zu unseren Untersuchungen auch zur Schlachtung und Lagerung der Wisente verwendet,

D I S K U S S I O N

wodurch sich hygienisches Arbeiten und die Vermeidung von Kontaminationen des Probenmaterials schwierig gestaltete. Aus diesem Grund wurden alle Tupfer nach ihrer Entnahme in ein Transportmedium verbracht und später in einem behelfsmäßig eingerichteten Raum auf die entsprechenden Platten ausgestrichen und in dem transportablen Brutschrank bei 37°C aerob und anaerob bebrütet. Trotzdem waren immer wieder Platten unbrauchbar, da sie mit Pilzen oder aeroben Sporenbildnern überwachsen waren.

Die entnommenen Gewebeproben konnten zuerst nur bei -20°C gelagert werden. Optimal wäre eine Lagerung bei -80°C, da diese Temperatur für das Überleben der Bakterien geeigneter ist und so eine Wiederanzucht aus dem Gewebe möglich wird. Bei -20°C besteht die Gefahr der Bildung von Eiskristallen im Gewebe, die subzelluläre Strukturen zerstören können. Auch die DNA der Bakterien kann durch die Bildung von Eiskristallen angegriffen werden, was den direkten Nachweis bestimmter Bakterien im Gewebe mittels DNA Extraktion und spezifischer PCR behindern kann.

Für die Zukunft wäre es deshalb geeigneter, zusätzlich zu der -20°C Gefriertruhe einen Behälter mit Flüssigstickstoff mitzunehmen. In diesem können die Gewebeproben gelagert werden, die für die molekulargenetischen Untersuchungen bestimmt sind.

Da auch Wisente außerhalb des festgelegten Jagdzeitpunkts geschossen wurden, bestand nicht bei allen Tieren die Möglichkeit, Tupfer unmittelbar nach dem Abschuss zu entnehmen. Bei 21 der 44 untersuchten Bullen wurden die Gewebeproben von den polnischen Kollegen entnommen, darunter waren auch Proben von acht an Balanoposthitis erkrankten Bullen. Die Präputialgewebeproben für die Bakteriologie wurden bis zum nächsten Jagdtermin bei -20°C gelagert. In Berlin wurde dann ein Anzuchtversuch aus dem gefrorenen Gewebe durchgeführt. Es gelang im Normalfall die Anzucht von Bakterien, aber sowohl die Menge als auch die Anzahl an Isolaten war vermindert. Insbesondere die Anzucht der neuen *Arcanobacterium* spp. gelang aus dem gefrorenen Material nicht.

Es war auch nicht möglich, einen Behälter mit Flüssigstickstoff vor Ort zu deponieren, da es für die polnischen Kollegen keine Möglichkeit gibt, Flüssigstickstoff nachzufüllen. Aus diesem Grund war es wichtig, zumindest immer zum Zeitpunkt der Jagd, die in den Wintermonaten alle zwei Wochen stattfindet, anwesend zu sein, um eine schnelle Probenverarbeitung sicherzustellen.

6.1.3 Ausgewähltes Gebiet/Zeitraum

Das Untersuchungsgebiet für die vorliegende Arbeit war festgelegt, da die Balanoposthitis nur im Białowieża Nationalpark auftritt. Auch die an Balanoposthitis erkrankten Wisentbullen aus dem Nationalpark Bayrischer Wald und der Bulle aus dem Saint-Eulalie Bison Park in Frankreich waren aus Białowieża importiert worden. Die Balanoposthitis tritt zwar auf beiden Seiten des Nationalparks, also auch im weißrussischen Teil auf, eine Untersuchungserlaubnis konnte jedoch nur für die polnischen Seite erhalten werden. Die weißrussische Seite ist aus politischen Gründen durch einen Zaun von der polnischen getrennt, und die Zusammenarbeit zwischen polnischen und weißrussischen Wissenschaftlern ist erst im Entstehen begriffen.

Der Zeitraum wurde durch die Jagdsaison bestimmt, die sich im Regelfall von Mitte Dezember bis Mitte März erstreckt.

Pro Jagdsaison wurden ca. 30 Tiere geschossen, davon etwas weniger als die Hälfte Bullen. Aus diesem Grund mussten Proben über mehrere Jahre und Jagdsaisons genommen werden, um eine repräsentative Anzahl von Proben zu erhalten.

6.2. Testmethoden/Laborarbeit

Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Beteiligung von Bakterien an der Balanoposthitis zu untersuchen, sowie erstmals die physiologische Genitalflora des männlichen und des weiblichen Wisents zu beschreiben.

Die meisten Bakterien, die bei den weiblichen Wisenten isoliert wurden, gehören zu den grampositiven Kokken (52%) und den coryneformen Bakterien (37%). Überwiegend wurde *Staphylococcus hyicus/chromogenes* angezüchtet. Gramnegative Keime wurden in wesentlich geringerer Menge isoliert als grampositive Kokken und Stäbchen. Bei den gramnegativen Keimen war *Escherichia coli* die am häufigsten isolierte Spezies.

Da bislang keine Studien zur Genitalflora des weiblichen Wisents existieren wurden zum Vergleich Daten von weiblichen Rindern herangezogen. Die physiologische Genitalflora des weiblichen Rindes setzt sich hauptsächlich aus aeroben, fakultativ anaeroben und obligat anaeroben Bakterien zusammen. In der Hauptsache findet man, wie bei den Wisentkühen, Staphylokokken und Streptokokken, weiterhin Laktobazillen und coliforme Keime in geringer Menge (Balassu et al., 1992; Hafez, 1993; Otero et al., 2000). Die bakterielle Flora ist somit vergleichbar mit Ergebnissen, die in ähnlichen Untersuchungen an Büffeln (Balassu et al., 1992) und Rindern (Otero et al., 2000) ermittelt wurden.

D I S K U S S I O N

Über die Normalflora bei Wisentbullen war zu Beginn dieser Studie ebenfalls nichts bekannt. Erst nach der bakteriologischen Untersuchung mehrerer gesunder sowie kranker Wisente war es möglich, die ermittelten Ergebnisse gegenüberzustellen und zu beurteilen.

Zum Vergleich wurden auch Wisente aus deutschen Gehegen untersucht. Vergleicht man die Ergebnisse der gesunden Wisente aus Białowieża mit Ergebnissen von Tieren aus Deutschland, so fallen keine wesentlichen Unterschiede auf. Wie bei den weiblichen Tieren dominieren jeweils die grampositiven Kokken und Stäbchen. Bei den kranken Bullen konnte eine größere Anzahl verschiedener Bakterienspezies isoliert werden. Dominierend waren hier Vertreter der Gattung *Arcanobacterium*. Mittels herkömmlicher Methoden war es nicht immer möglich, die Isolate bis auf Speziesebene eindeutig zu charakterisieren. Die Bakterien wurden dann einer bestimmten Gattung zugeordnet. Existierten mehrere Isolate eines nicht identifizierbaren Bakteriums, wurde die 16S rDNA mittels eubakterieller PCR amplifiziert und im Anschluss sequenziert. Auf diese Weise wurden manche Isolate auf Speziesebene zu 99% identifiziert.

Für die klassische Diagnostik wurden verschiedene Medien und Wachstumsbedingungen gewählt, um die Anzucht möglichst vieler der vorhandenen Bakterienspezies zu gewährleisten. Zum Nachweis schwer anzüchtbarer Bakterien, in diesem Fall den Spirochäten, wurde für die Gattungen *Leptospira*, *Brachyspira* und *Borrelia* eine spezifische PCR mit aus dem Präputialgewebe extrahierter DNA durchgeführt. Mittels einer eubakteriellen PCR amplifizierte DNA aus Präputialgewebe, wurde darüber hinaus, mit für die Gattung *Treponema* spezifischen Sonden, in einer Dot Blot Hybridisierung, auf das Vorhandensein spirochätaler DNA untersucht. Zusätzlich wurde eruiert, welche Bakterien im Zusammenhang mit Balanoposthitiden und ähnlichen Erkrankungen stehen könnten. In der Literatur beschriebene Bakterien waren Spezies der Gattungen *Corynebacterium*, *Fusobacterium*, *Arcanobacterium*, *Mycoplasma* und Spirochäten. Ein Teil der Diagnostik wurde demnach gezielt auf diese Erreger ausgerichtet. Es war möglich, den Nachweis über alle erwähnten Bakteriengattungen zu erbringen. Eine Anzucht gelang allerdings nur bei den Corynebakterien und den Arcanobakterien. Fusobakterien und Spirochäten sind in der Anzucht sehr anspruchsvoll und konnten lediglich histologisch nachgewiesen werden. Da auch Mykoplasmen extrem schwer anzuzüchten sind, wurde parallel Wisentserum auf Antikörper gegen Mykoplasmen untersucht. Auch hier gelang der Nachweis seropositiver Reagenten.

Weiterhin wurden Bakterien isoliert, die in der Hauptsache zu den grampositiven Kokken zu zählen sind (Staphylokokken und Streptokokken). Eine Spezies, die bei einer Vielzahl der kranken Bullen isoliert wurde, konnte weder mittels herkömmlicher Testmethoden noch

mittels 16S rDNA Sequenzierung identifiziert werden. Über phylogenetische Berechnungen war es möglich, dieses Bakterium in die Gattung *Arcanobacterium* einzuordnen und innerhalb dieser Gattung als neue Art zu beschreiben. Auf den spezifischen Nachweis und die Bedeutung dieser und aller weiteren genannten Bakteriengruppen soll in den folgenden Kapiteln im Detail eingegangen werden.

6.2.1. Corynebakterien

Im Zusammenhang mit der Balanoposthitis beim Wisenten erscheinen folgende Spezies als möglicherweise relevant: *Corynebacterium (C.) renale* complex und *C. bovis*. Diese Keime werden im Zusammenhang mit Balanoposthitis bzw. hyperkeratotischer Dermatitis erwähnt: *C. bovis* wurde im Zusammenhang mit hyperkeratotischer Dermatitis bei Labormäusen beschrieben (Duga et al., 1998).

Im Verlauf dieser Arbeit wurde *C. bovis* nicht isoliert (siehe Kapitel 5.2.1.1). Dagegen wurden Erreger des *C. renale*-Komplexes bei 10 der kranken Bullen isoliert. Die Isolierung erfolgte nicht in Reinkultur. Auch bei den gesunden Wisentbullen und -kühen wurden regelmäßig Erreger des *C. renale*- Komplexes gefunden. Auf Speziesebene wurde *C. renale* mittels des api[®]CORYNE Systems identifiziert. Die Anzahl der Kolonien war bei allen Tieren max. + bis ++, was vermutlich der physiologischen Besiedelung im Genitaltrakt entspricht. Man kann dennoch die Möglichkeit nicht ausschließen, dass *C. renale* am Geschehen der Balanoposthitis beteiligt ist. Insbesondere in späteren Stadien der Krankheit, wenn nekrotisches Material die Präputialöffnung verschließt, steigt durch Ansammlung von Urin der Harnstoffgehalt in der Präputialhöhle. *C. renale* bildet das Enzym Urease, das Harnstoff in Ammoniak und Kohlendioxid spaltet. Ammoniak ist gewebereizend und begünstigt die Entzündungsprozesse (<http://www.vetmed.unibe.ch/vbi>, 2005 A).

6.2.2 Mykoplasmen

Verschiedene Genitalerkrankungen werden mit Spezies der Gattung *Mycoplasma* in Zusammenhang gebracht. Pathogene und apathogene Mykoplasmenarten sind in der Natur weit verbreitet und die Übertragung erfolgt vielfach aerogen oder durch den Urogenitaltrakt. Häufig werden Mischinfektionen mit anderen bakteriellen Erregern beobachtet (Rosengarten et al., 2001).

In vorangegangenen Untersuchungen wurden Serumproben von Wisenten mittels Western Blot Analyse (Brank et al., 1999) auf Antikörper gegen *M. bovis* und *M. bovis genitalium*

untersucht. Die Proben stammten von 50 Bullen mit Balanoposthitis und 48 gesunden Bullen, sowie von 49 gesunden weiblichen Wisenten. Das Resultat dieser Analyse ergab eine signifikant höhere Anzahl an *M. bovis genitalium* seropositiven Reagenten in der Gruppe der kranken Bullen (Thiede et al., 2002). Diese Untersuchungen wurden in der vorliegenden Studie fortgesetzt und die Ergebnisse bestätigten die der vorangegangenen Untersuchungen: Von den 25 an Balanoposthitis erkrankten Bullen waren im Western Blot 14 positiv. Von den 19 gesunden Bullen waren hingegen nur fünf positiv. Unter den 53 weiblichen Tieren befanden sich 17 seropositive Reagenten. Zusätzlich zu der Serologie wurden auch Anzuchtversuche unternommen, sowie eine *M. bovis genitalium* spezifische PCR durchgeführt. Eine Anzucht aus Tupfermaterial ist nicht gelungen. Mit der spezifischen PCR konnte bei vier kranken Bullen ein positives Ergebnis erzielt werden. Die gesunden Bullen und die weiblichen Tiere waren in der PCR negativ (Siehe Kapitel 5.2.4).

Aus den serologischen Ergebnissen geht hervor, dass *M. bovis* keine Rolle in der Entstehung der Balanoposthitis spielt, aber einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Balanoposthitis und der Antikörperbildung gegen *M. bovis genitalium* gibt ($p=0.049$). Aufgrund dieser Ergebnisse bleibt es schwierig, eine Aussage hinsichtlich einer ätiologischen Beteiligung der Mykoplasmen an der Balanoposthitis zu treffen. Bei experimentellen intrapräputialen *M. bovis genitalium* Infektionen wurde nachgewiesen, dass die systemische Antikörper-Reaktion eher uneinheitlich ist (Erno, 1972; Kreusel et al., 1989). Dies war auch in diesen Untersuchungen der Fall. Eine klare Aussage hinsichtlich der Beteiligung von Mykoplasmen lässt sich aus den gegenwärtigen Ergebnissen nicht treffen. Eine Beteiligung ist aber möglich und sollte durch weiterführende Studien abgeklärt werden. Wichtig wäre es in Zukunft, die Mykoplasmen im Präputialgewebe nachzuweisen, was z.B. mittels einer immunhistochemischen Untersuchung erreicht werden könnte.

6.2.3 Spirochäten

Histologisch konnten in dieser Arbeit Spirochäten nachgewiesen werden, was die Frage aufwarf, um welche Gattung es sich handelt. Innerhalb der Familie *Spirochetaceae* sind die Gattungen *Treponema*, *Brachyspira*, *Borrelia* und *Leptospira* von medizinischer Bedeutung. Treponemen wurden außerdem bei Erkrankungen isoliert, die der Balanoposthitis histologisch ähneln, wie der *Dermatitis digitalis* (DD) des Rindes (Moter et al., 1998; Schrank, 2000) und der CODD (contagious ovine digital dermatitis) beim Schaf (Naylor et al., 1998; Demirkan et al., 2001) und erscheinen im Zusammenhang mit der Balanoposthitis am wahrscheinlichsten.

D I S K U S S I O N

Um zu überprüfen, ob Treponemen an der Balanoposthitis beteiligt sein könnten, wurde DNA aus dem Gewebe kranker und gesunder Bullen isoliert und mittels einer eubakteriellen PCR untersucht. Ein positives PCR Resultat wurde bei allen kranken Bullen erzielt, was nicht weiter überraschend ist, da in jedem Fall Bakterien im Präputialgewebe der Bullen vorhanden sind. Das gewonnene PCR Produkt wurde dann mit 12 verschiedenen *Treponema* spezifischen Sonden hybridisiert. In der Hybridisierung reagierten die 12 getesteten *Treponema*-Sonden bei allen Proben negativ. Die Hybridisierung der Proben mittels einer gattungsspezifischen *Treponema* Sonde war ebenfalls negativ, was den Schluss zulässt, dass die im nekrotischen Präputialgewebe der Wisentbullen vorhandenen Spirochäten nicht zur Gattung *Treponema* gehören. Zur Kontrolle wurden jeweils Positiv- und Negativ-Kontrollen mitgeführt, woraus sich schließen lässt, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit keine der untersuchten *Treponema* spp. an der Balanoposthitis beteiligt ist.

Um abzuklären, ob es sich bei der isolierten DNA um DNA einer anderen Spirochätengattung handelt, wurden weitere PCRs mit gattungsspezifischen Primern durchgeführt. Für alle drei veterinärmedizinisch wichtigen Gattungen (*Brachyspira*, *Borrelia* und *Leptospira*) wurden negative Ergebnisse erzielt. Bei detaillierter Betrachtung dieser Bakterien und der bekannten Krankheitssyndrome ist eine Beteiligung an der Balanoposthitis eher undenkbar. So umfasst das Genus *Brachyspira* die schweinepathogenen Arten *Brachyspira* (*B.*) *hyodysenteriae* und *B. pilosicoli* (Schweinedysenterie, Spirochätendiarrhoe) (Hampson, 2004; Jensen, 2004), sowie die aviär-enteropathogenen *B. alvinipuli* (Stanton, 1998). Im Schweinedickdarm kommen weitere *Brachyspira*-Arten wie *B. murdochii*, *B. innocens* und *B. intermedia* regelmäßig vor. Die beiden letztgenannten Arten wurden in ursächlichen Zusammenhang mit dem Krankheitsbild der porcinen Spirochaetencolitis gebracht (Verspohl, 2001). Ein ätiologischer Zusammenhang mit der Balanoposthitis erscheint unwahrscheinlich.

Auch bei den Borrelien sind die wichtigsten pathogenen Arten für Krankheiten verantwortlich, die sich nicht mit der Symptomatik der Balanoposthitis vergleichen lassen. Es existiert zudem eine polnische Studie, die sich mit der Prävalenz von Antikörpern gegen *Borrelia* (*B.*) *burgdorferi* sensu lato beschäftigt. Daraus geht hervor, dass nur in 2,5% der untersuchten Tiere seropositive Reagenten gefunden wurden (Sinski et al., 1996). In der Regel zeigt sich die Borreliose bei Rindern durch Gewichtsverlust, geschwollene Gelenke und intermittierende Lahmheit (Parker, 1992). Ein Zusammenhang mit nekrotischen Veränderungen ist unbekannt, und eine Beteiligung an der Balanoposthitis der Wisente wird aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ausgeschlossen.

Auch eine mögliche Rolle von Leptospiren an der Ätiopathogenese der Balanoposthitis ist nicht wahrscheinlich. Eine Leptospiren - Infektion verläuft beim Rind meistens klinisch inapparent. Es können jedoch auch Aborte in der zweiten Trächtigkeitshälfte auftreten oder lebensschwache Kälber geboren werden. Gelegentlich tritt eine Mastitis auf (Slee, 1983; Ellis, 1985). Im Rahmen einer serologischen Untersuchung wurden in Polen bereits Studien zu dem Vorhandensein von Antikörpern gegen *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae*, *hebdomadis*, *bataviae* und *valbuzzi* durchgeführt. Die gemessenen Antikörpertiter wurden als zu niedrig eingestuft, um für eine Infektion zu sprechen (Kita et al., 1991). Abschließend kann mit großer Wahrscheinlichkeit gesagt werden, dass von den tiermedizinisch relevanten Spirochätengattungen keine eine ätiologische Beteiligung an der Balanoposthitis hat. Allerdings ist aufgrund der hohen Diversität dieser Bakterien-Familie nicht auszuschließen, dass es sich bei den histologisch detektierten Spirochäten um eine bislang unbekannte Art handelt. Aufgrund der Tatsache, dass die Spirochäten nur in den späten Stadien der Krankheit nachgewiesen wurden, haben sie vermutlich keine Relevanz in der Pathogenese der Erkrankung. Sie scheinen eher eine Rolle als sekundäre Erreger zu spielen.

6.2.4 Fusobakterien

In vorangegangenen Untersuchungen wurde bereits die Beteiligung von *Fusobacterium necrophorum* an der Balanoposthitis nachgewiesen (Jakob et al., 2000). In späten Stadien der Balanoposthitis ist die Krankheit durch nekrotische Prozesse geprägt, welche in ähnlicher Form auch bei der Moderhinke des Schafes (Egerton, 1969) der *Dermatitis digitalis* des Rindes (Schrank, 2000) sowie der nekrotischen Posthitis bei Mastrindern (Jensen und Mackey, 1971) zu finden sind. Fusobakterien wurden auch in dieser Studie bei allen Bullen im Stadium III der Erkrankung histologisch und im Grampräparat nachgewiesen. Es gelang allerdings nicht, *F. necrophorum* anzuzüchten.

Die histologischen Befunde innerhalb dieser Studie (siehe Kapitel 5.1.2) unterstützen die Ergebnisse der Studie von Jakob et al. (2000). Die primäre Beteiligung von Fusobakterien bei der Balanoposthitis kann als unwahrscheinlich betrachtet werden, zumal ein Nachweis nur aus stark nekrotisch verändertem Gewebe möglich war. Es ist davon auszugehen, dass andere Faktoren eine Vorschädigung des Gewebes bewirken und so das Eindringen von *F. necrophorum* in das Gewebe begünstigen. Denkbar wären: toxische Pflanzen, Insekten, Verletzungen und andere Mikroorganismen. In diesem Zusammenhang soll im folgenden besonders auf Bakterien eingegangen werden, die solche Schäden bewirken können. In

Frage kommen hierfür eine Vielzahl an Bakterienspezies, insbesondere solche, für die ein Synergismus mit *F. necrophorum* bereits beschrieben wurde. Ein solcher Synergismus ist nachgewiesen für *A. pyogenes* (Kaczmarowski, 2003) und *Dichelobacter (D.) nodosus* (Roberts, 2000). Aber auch Staphylokokken und Corynebakterien, insbesondere Erreger des *C. renale* Komplexes, sind in der Lage, das Gewebe zu schädigen (Brook et al., 1966; Bostedt, 1996; Sato, 1994 und 1999).

6.2.5 Arcanobakterien

Arcanobacterium spp. wurden bei 17 der 25 kranken Bullen isoliert. Von diese Isolaten wurden vier als *A. pyogenes* identifiziert und 13 Isolate gehörten zwei bislang unbekanntem *Arcanobacterium* spp. an. Obwohl auch andere *Arcanobacterium*- oder *Actinomyces* spp. im Zusammenhang mit Urogenitalerkrankungen oder purulenten Infektionen beschrieben sind (siehe Kapitel 2.2.3.5) wurden sie in dieser Studie nicht isoliert und eine Beteiligung am Prozess der Balanoposthitis kann somit ausgeschlossen werden.

6.2.5.1 *Arcanobacterium pyogenes*

Die in der Tiermedizin relevanteste Spezies der Arcanobakterien ist *A. pyogenes*. Dieses Bakterium wurde von kranken Bullen in allen Krankheitsstadien, aber insgesamt nur selten (n=6), isoliert (siehe Kapitel 5.2.1.1). Die Menge an Bakterien variierte je nach Krankheitsstadium. Bei zwei Bullen mit großen Ansammlungen von purulentem Sekret in der Präputialhöhle wurde *A. pyogenes* massenhaft (++++) isoliert. Bei den anderen Tieren im Bereich von + - ++. Es ist also zu vermuten, dass *A. pyogenes* in Einzelfällen das Entstehen einer eitrigen Infektion in der Präputialhöhle unterstützt. Identifiziert wurde *A. pyogenes* anhand der fehlenden Katalase Aktivität und der Eigenschaft, Serolyse auf Löffler-Serumagar zu bewirken. Zur Bestätigung wurden diese Bakterien zusätzlich mittels des apiCoryne Systems untersucht.

Von allen an Balanoposthitis erkrankten Bullen, bei denen die Probennahme kurz nach dem Abschluss erfolgte, wurden zwei bislang unbekanntem *Arcanobacterium* spp. isoliert, deren nächster Verwandter *A. pyogenes* ist (siehe Kapitel 5.2.2). Diese Bakterien wurden nur von kranken Bullen isoliert und konnten weder bei gesunden Bullen noch bei weiblichen Tieren nachgewiesen werden. Auf diese Bakterien wird in Kapitel 6.2.6 noch näher eingegangen. Aufgrund der Verwandtschaft zu *A. pyogenes* besteht die Möglichkeit, dass diese Spezies ähnliche Virulenzfaktoren besitzen und ihnen somit eine mögliche Rolle im Geschehen der

Balanoposthitis zugesprochen werden kann. *A. pyogenes* besitzt eine Reihe von Virulenzfaktoren, die es ihm ermöglichen, an der Zellwand anzuhaften und die Zelle zu zerstören und ist außerdem bei einer Reihe purulenter und nekrotischer Infektionen im Synergismus mit anderen Bakterien beschrieben: *A. pyogenes* produziert verschiedene DNAsen (Lämmler, 1990) und Proteasen (Schaufuss und Lämmler, 1989; Takeuchi, 1995), sowie zwei Neuraminidasen (Schaufuss und Lämmler, 1989). Außerdem produziert es ein haemolytisches Exotoxin Pyolysin (PLO) (Ding, 1996; Billington, 1997), welches bis heute am genauesten untersucht ist. Es gehört zu den Cholesterin bindenden Zytolysinen. Diese sind in der Lage an Membranen eukaryotischer Zellen zu binden und dort oligomere Poren zu bilden (Billington, 2000). Es wirkt zytolytisch auf die Erythrozyten verschiedener Säugetierspezies (Funk, 1996), verursacht außerdem Nekrosen der Haut und erwies sich im Experiment bei intravenöser Applikation als tödlich für Labormäuse (Lovell, 1944). PLO hat einen zytotoxischen Effekt auf polymorphkernige Leukozyten (Ding, 1996). Es wird vermutet, dass PLO neben diesen Effekten auch die Expression verschiedener Cytokine steigert (König, 1994; Ruiz, 1998) und außerdem in der Lage ist, die Komplementkaskade zu aktivieren (Paton, 1984). Bei fortgesetzter Aktivierung der Komplementkaskade kann es zu chronischen Entzündungen und bleibenden Gewebeläsionen kommen (www.mucos.cz). PLO wird *in vivo* exprimiert. Bei Untersuchungen von Serum natürlich infizierter und experimentell infizierter Tieren wurden Antikörper gegen PLO nachgewiesen, d.h. dass im Körper eine Immunreaktion ausgelöst wird (Lovell, 1944; Matthews, 1963). Durch Inaktivieren des codierenden Gens für PLO wurde im Tierversuch getestet, ob PLO eine Rolle für die Pathogenität von *A. pyogenes* spielt. Dabei wurde bei den *A. pyogenes* Mutanten ohne PLO codierendes Gen eine deutliche Reduktion der Infektiosität von *A. pyogenes* nachgewiesen (Jost et al., 1999).

Ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor ist die Neuramidase. Diese unterstützt die Anhaftung von *A. pyogenes* an Hautzellen. Dies ist eine der wichtigsten Voraussetzung dafür, dass Bakterien sich auf der Hautoberfläche ansiedeln können, was bei pathogenen Bakterien eine Infektion zur Folge hat (Esmay et al., 2003).

6.2.5.2 *A. bonasi* und *A. bialowiezense* zwei neue *Arcanobacterium* spp.

Im Rahmen der bakteriologischen Untersuchungen der Präputialtupferproben wurden von 13 Wisentbullen Bakterien isoliert, welche der morphologischen Beschreibung von *A. pyogenes* entsprachen. Diese Bakterien bildeten feine, glasige, stecknadelkopfgroße runde Kolonien

D I S K U S S I O N

mit mehr oder weniger stark ausgeprägter vollständiger Hämolyse. Mikroskopisch stellten sich pleomorphe grampositive zum Teil auch gramlabile, ca. 1µm lange Stäbchen dar.

Auf Basis der biochemischen Profile und der durch BOX-PCR ermittelten genetischen Fingerabdrücke konnten die 13 Isolate in zwei Gruppen von einmal neun und einmal vier Isolaten eingeordnet werden. Ein Stamm wurde aus jeder Gruppe als Typstamm gewählt.

Eine vergleichende 16S rDNA Analyse ordnete diese Isolate mit den Labornummern W3/01 und W106/04 eindeutig in die Gattung *Arcanobacterium* ein. Die höchste Ähnlichkeit bestand zu *A. pyogenes* (96,1% und 96,4%) und *A. bernardiae* (95,5% und 95,8%). Untereinander waren die Isolate zu 97,2% identisch.

Der Stamm W3/01 und der Stamm W106/04 zeigten aber keine Serolyse auf Löffler Agar und unterschieden sich auch in den enzymatischen Reaktionen von *A. pyogenes*. Die Enzymaktivitäten wurden mit den Systemen api[®]ZYM und api[®]CORYNE getestet. Dabei wurden im api[®]CORYNE zwei verschiedene Enzymprofile ermittelt. Alle Isolate besaßen die Enzymaktivitäten β-Glucuronidase, alle Isolate von Stamm 2 besaßen außerdem die Enzymaktivitäten Pyrolydonyl Arylamidase beide Enzyme besitzt auch *A. pyogenes*. Die weiteren enzymatischen Aktivitäten sind Esterase und Esterase Lipase. In diesen Reaktionen unterscheiden sich die Stämme W3/01 und W106/04 von den Reaktionen von *A. pyogenes*. Außerdem zeigte *A. pyogenes* eine zusätzliche Enzymaktivität (β-Galactosidase) die bei Stamm W3/01 und W106/04 nicht auftritt.

Das Isolat mit der Stammbezeichnung W3/01 wurde unter der Speziesbezeichnung *Arcanobacterium bialowiezense* bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) hinterlegt. Das Isolat mit der Stammnummer W106/04 wurde unter der Speziesbezeichnung *Arcanobacterium bonasi* bei der DSMZ (Braunschweig) hinterlegt.

Insgesamt wurde *A. bialowiezense* vier mal isoliert, *A. bonasi* neun mal. Somit wurde bei 13 von 25 kranken Bullen eine der neuen *Arcanobacterium* spp. isoliert. Mit der spezifischen PCR konnten diese *Arcanobacterium* spp. noch bei sieben weiteren erkrankten Bullen im Gewebe nachgewiesen werden. Es war allerdings nicht möglich mittels der spezifischen PCR zwischen den beiden neuen *Arcanobacterium* spp. zu unterscheiden. Von beiden Spezies wurden Reinkulturen in die PCR eingesetzt und bei beiden wurde ein gleich großes PCR Produkt gewonnen. Alle eingesetzten Kontrollen, auch *A. pyogenes* und *A. bernardiae*, ergaben in dieser PCR kein positives Ergebnis.

Bei zwei der fünf an Balanoposthitis erkrankten Bullen, die weder in der Kultur noch in der PCR positiv waren, war kein geeignetes Gewebe für eine DNS Extraktion vorhanden.

Damit wurde entweder *A. bialowiezense* oder *A. bonasi* bei 20 von 23 kranken Bullen (=87%) nachgewiesen. Unter den PCR positiven Tieren befand sich auch ein Bulle im Stadium I der Krankheit. Die Untersuchung von Bullen im Anfangsstadium der Balanoposthitis ist besonders wichtig, um die primäre Ursache der Balanoposthitis abzuklären. Obwohl *A. bialowiezense* und *A. bonasi* bei 87% der kranken Bullen nachgewiesen wurden, aber weder bei gesunden Bullen noch bei den weiblichen Tieren gefunden wurden, ist es aufgrund der bisher vorliegenden Ergebnisse noch nicht möglich, ihnen eine ätiologische Bedeutung zuzusprechen. Aufgrund der Verwandtschaft zu *A. pyogenes* ist es denkbar, dass die beiden Isolate auch ähnliche Virulenzfaktoren besitzen und somit am Krankheitsgeschehen der Balanoposthitis beteiligt sein können. Um dies abzuklären, sind noch eine Reihe weiterführender Forschungsarbeiten erforderlich.

6.3 Potentielle Pathogenese der Balanoposthitis beim Wisent

Gegenwärtig ist es nur möglich, eine Hypothese über den Verlauf der Krankheit aufzustellen und diese als Basis für die weiteren Untersuchungen zu verwenden. Ein möglicher Ablauf der Pathogenese der Balanoposthitis ist in Abb. 6.1 dargestellt.

Demnach kommt es möglicherweise durch prädisponierende Faktoren zu einer Vorschädigung des Gewebes mit der anschließenden Ausbildung einer fokalen Hyperkeratose. Diese Vorschädigungen können z. B. durch kleine Verletzungen, Insektenbisse oder -stiche aber auch durch Pflanzentoxine entstehen (Sasseville, 1999; www.eczema.dermis.net). Möglicherweise liegt auch ein genetischer Defekt zugrunde, der in der geringen genetischen Variabilität der Wisente begründet ist und zu einer Störung der lokalen Immunabwehr führt (Lünser et al., 2005). Ein solcher Defekt hätte zur Folge, dass Krankheitserreger leichter in die Haut einwandern und sich dort vermehren können.

Die Vorschädigung des Gewebes könnte es *Fusobacterium* spp. ermöglichen, in die Präputialhaut einzudringen und sich in den tiefen Gewebeschichten zu vermehren. Da in vorangegangenen Untersuchungen bereits die Beteiligung von *F. necrophorum* an der Balanoposthitis nachgewiesen wurde (Jakob et al., 2000) ist es wahrscheinlich, dass Fusobakterien für die nekrotischen Veränderungen mitverantwortlich sind. Ein Synergismus von *A. pyogenes* und *F. necrophorum* ist experimentell bewiesen worden (Kaczmarowski, 2003). *A. pyogenes* ist in der vorliegenden Studie aber nur selten isoliert worden und es stellt sich die Frage, ob es einen ähnlichen Synergismus zwischen Fusobakterien und den beiden neuen Spezies *A. bonasi* und *A. bialowiezense* gibt, was bedeuten würde, dass das Zusammenwirken dieser Bakterien die Nekrosen am Präputium verursachen könnte. Durch

D I S K U S S I O N

Ansammlung von nekrotischem Gewebe in der Präputialhöhle und um die Präputialöffnung herum kann Urin schlecht oder gar nicht abfließen, was zu einem Anstieg der Harnstoffkonzentration in der Präputialhöhle führt. Urease bildende Bakterien wie *C. renale* spalten Harnstoff zu Ammoniak und CO₂. Ammoniak ist gewebetoxisch und bewirkt weitere Zellschäden und Nekrosen (Brook et al., 1966; Bostedt, 1996).

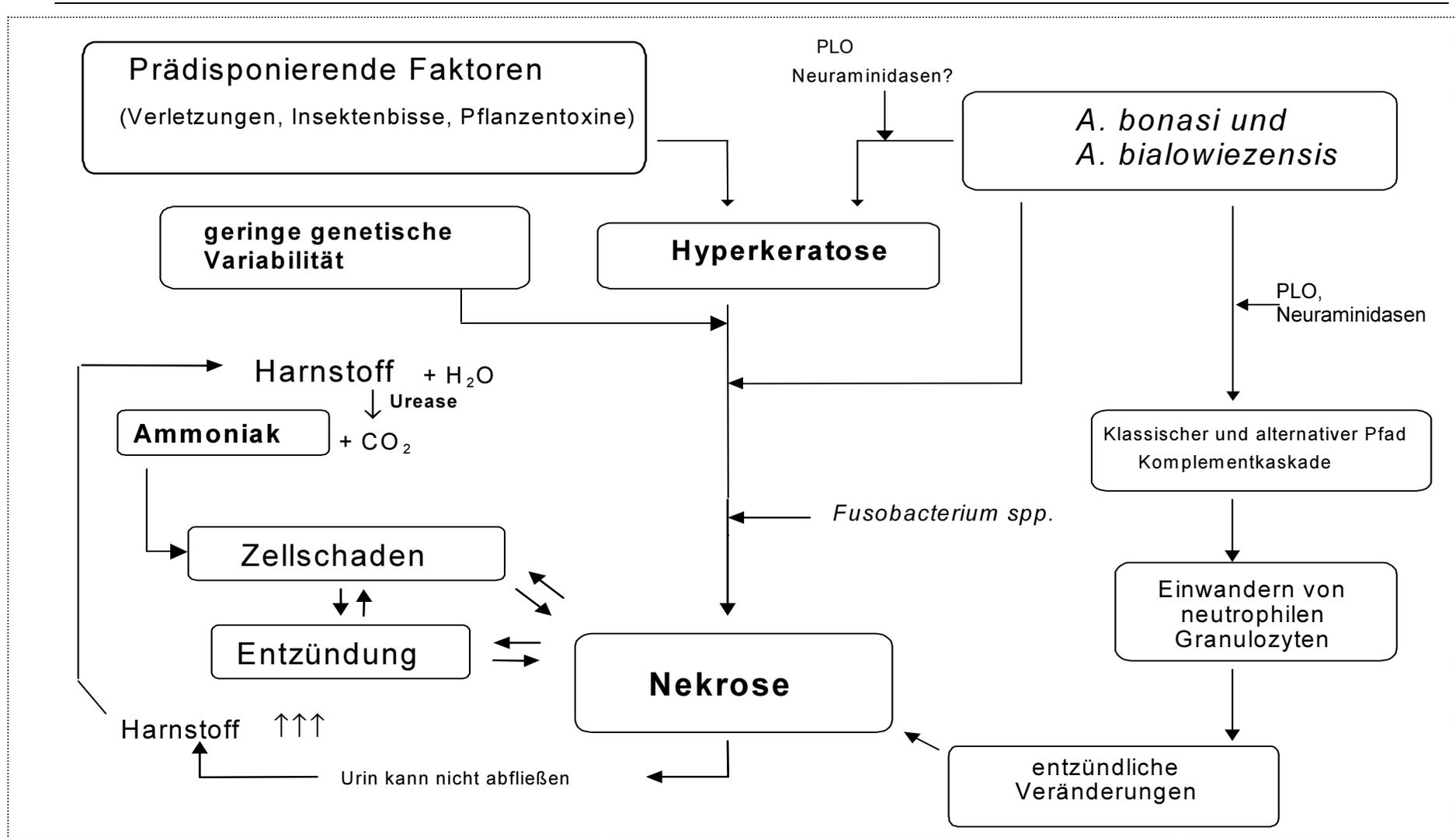
Es besteht auch die Möglichkeit, dass die beiden *Arcanobacterium* spp. als Primärerreger in Frage kommen und keine Vorschädigung des Gewebes nötig ist. Beide Spezies zeigen eine hohe Verwandtschaft zu *A. pyogenes* und besitzen infolgedessen wahrscheinlich ähnliche Virulenzfaktoren (siehe Kapitel 6.2.5.1). Durch Neuraminidasen würde die Anhaftung der Arcanobakterien an Hautzellen unterstützt, wodurch sie in der Lage wären die Haut zu besiedeln (Esmay et al., 2003). PLO wirkt zytolytisch auf Membranen tierischer Zellen und kann die Komplementkaskade aktivieren (Paton, 1984; Billington, 2000), was bei einer überschiessenden Reaktion zu Entzündungsreaktionen und Nekrosen führen kann (www.mucos.cz). Das nekrotische Gewebe sammelt sich dann ebenfalls in der Präputialhöhle und an der Präputialöffnung an und behindert so den Abfluss von Urin. Auch hier könnte ein Einwandern von *Fusobacterium* spp. die Nekrosen verstärken. Da es möglich war, einen der Erreger mittels PCR bei einem Bullen in Stadium I der Erkrankung nachzuweisen, ist nicht auszuschließen, dass die Arcanobakterien primär an der Balanoposthitis beteiligt sind. Um dies sicher sagen zu können, müssen Untersuchungen an weiteren Bullen in diesem frühen Krankheitsstadium folgen. Die Anzucht von großen Mengen (+++) der Arcanobakterien gelang nur bei Bullen im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung, die deutliche Nekrosen aufwiesen. Demzufolge könnte man argumentieren, dass sich die Arcanobakterien nur dann vermehren können, wenn schon beschädigtes Gewebe ein leichtes Anhaften und Eindringen der Keime ermöglicht. Wie diese Bakterien auf den Wisent übertragen werden ist gegenwärtig unklar. Bei den weiblichen Wisenten konnten sie nicht nachgewiesen werden, so dass eine venerische Infektion wahrscheinlich nicht stattfindet. Da *A. pyogenes* bei der Sommermastitis des Rindes von Fliegen übertragen wird (Hillerton, 1985 und 1990), wäre dies ein denkbarer Übertragungsweg für *A. bonasi* und *A. bialowiezense*. Mit Hilfe der in dieser Studie entwickelten spezifischen PCR können nun auch Studien an im Nationalpark Białowieża gesammelten Insekten, die als Überträger fungieren könnten, durchgeführt werden.

Die aufgeführten Hypothesen zur Ätiologie und Pathogenese der Balanoposthitis beim Wisent müssen durch weiterführende *in vitro* Studien bestätigt oder ausgeschlossen werden. Diesbezüglich sollte die Interaktion der neuen *Arcanobacterium* spp. mit Hautzellen *in vitro* im Vordergrund stehen. Des weiteren gilt zu prüfen, ob eine Vorinkubation der Hautzellen mit

D I S K U S S I O N

F. necrophorum oder eine Co-Kultivierung von *F. necrophorum* und den neuen *Arcanobacterium* spp. mit Hautzellen *in vitro* die Interaktion mit den Zellen beeinflusst (synergistische Effekte). Darüber hinaus ist die Charakterisierung der Virulenzfaktoren von beiden neuen *Arcanobacterium* spp. von Bedeutung für das Verständnis ihrer möglichen pathogenen Eigenschaften.

DISKUSSION



105

Abb. 6.1: mögliche Pathogenese der Balanoposthitis beim Wisentbullen