

2. Schrifttum

2.1 *Analyse bakterieller Diversität*

Eingehende Analysen komplexer Ökosysteme mit Hilfe klassischer bakteriologischer Methoden sind infolge limitierender Faktoren äußerst eingeschränkt. Die Gesamtzahl der insgesamt vorkommenden Organismen beläuft sich auf ca. 1,4 Millionen Spezies (AMANN, 2000). Dabei kommen unter anderem insgesamt ca. 751.000 verschiedene Insekten- sowie 248.000 verschiedene Pflanzenspezies vor. Im Gegensatz zu diesen Zahlen sind dagegen nur ca. 4.800 verschiedene Bakterienspezies bekannt. Die bisher bekannten Bakterienspezies stellen nur einen Bruchteil der insgesamt vorkommenden Bakterien dar und es wird geschätzt, dass tatsächlich zwischen 300.000 und 1.000.000 verschiedene Bakterienspezies existieren (COLWELL und GRIMES, 2000).

Mit klassischen Kultivierungsmethoden ist es häufig nicht möglich, komplexe mikrobielle Ökosysteme absolut zu erfassen und zu charakterisieren. Ursache hierfür sind häufig unzureichende Kultivierungsmöglichkeiten, da die entsprechenden Nährstoffansprüche für viele Mikroorganismen unbekannt bzw. nicht verfügbar sind (PITCHER und FRY, 2000; DeLONG und PACE, 2001). Da die relativ einfache Morphologie von Mikroorganismen im Vergleich zu Pflanzen oder Tieren für eine ausreichende Charakterisierung nicht ausreicht, werden für die klassischen Typisierungen Reinkulturen benötigt, um physiologische und biochemische Merkmale zu testen (AMANN et al., 1995). Daher sind viele Spezies bis heute noch unbekannt oder konnten mit klassischen bakteriologischen Methoden noch nicht ausreichend charakterisiert werden, um sie in die bakterielle Systematik einzuordnen (VON WINTZINGERODE et al., 1997).

Um das Problem phylogenetischer Zuordnungen zu umgehen wurden daher verschiedene Markermoleküle in phylogenetische Analysen einbezogen. Dabei müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein, damit ein bestimmtes Molekül als phylogenetischer Marker sinnvoll eingesetzt werden kann. Wie WOESE (1987) bereits mit seinen grundlegenden Arbeiten detailliert dargestellt hat, müssen solche molekularen Zeitmesser notwendigerweise folgende Eigenschaften aufweisen:

Damit Mutationen insgesamt nur zufällig stattfinden und multiple Mutationen an einer Stelle ein seltenes Ereignis darstellen, sollte ein phylogenetisches Markermolekül keinem Selektionsdruck ausgesetzt sein. Nur bei fehlendem Selektionsdruck sind auftretende Sequenzmutationen in diesen Molekülen ein zufälliges Ereignis und können somit als evolutionäre Veränderung in einer Abstammungslinie herangezogen werden. Typischerweise

treten solche zufälligen Mutationen eher bei Molekülen auf, die konservierte Funktionen aufweisen.

Des Weiteren sollte ein geeignetes Molekül die komplette Zeitspanne der bakteriellen Evolution abdecken. Dabei ist zu beachten, dass die bakterielle Evolution eine wesentlich längere Zeitspanne umfasst als im Vergleich dazu die der Metazoa. Daher ist zum Beispiel Cytochrom C, welches optimal geeignet ist für die Erfassung und Darstellung der eukaryontischen Evolution, bei Bakterien nur beschränkt einsetzbar.

Auch ist der Informationsgehalt des Markermoleküls von Bedeutung. Dabei ist nicht nur die Größe selbst entscheidend, sondern das Vorkommen von funktionellen Domänen, die untereinander nur „locker“ miteinander in Beziehung stehen. Nur so ist es möglich, dass zufällig auftretende Mutationen in einer Domäne andere Bereiche unbeeinflusst lassen, selbst wenn die auftretenden Veränderungen sehr drastisch sind.

Ribosomale RNA erfüllt diese Voraussetzungen optimal, insbesondere die 16S bzw. 23S RNA. Diese Moleküle sind ubiquitär in allen Bakterien vorhanden, die Funktion der Ribosomen ist konserviert, auftretende Mutationen treten zufällig und konstant auf und der Informationsgehalt ist ausreichend für phylogenetische Analysen (SCHMIDT und RELMAN, 1994).

Ein weiterer praktischer Vorteil für die Verwendung ribosomaler Sequenzdaten zu phylogenetischen Analysen ist das Vorhandensein großer Datenbanken, deren Umfang gerade durch Vereinfachung von Sequenzanalysen in der Vergangenheit sehr stark angestiegen ist (MAIDAK et al., 1997; MAIDAK et al., 2000). Daher konnte auf der Basis ribosomaler Sequenzanalysen ein universeller Stammbaum entwickelt werden, der die 3 Domänen Archea, Bacteria und Eucarya in einem phylogenetischem Zusammenhang darstellt (WOESE et al., 1990).

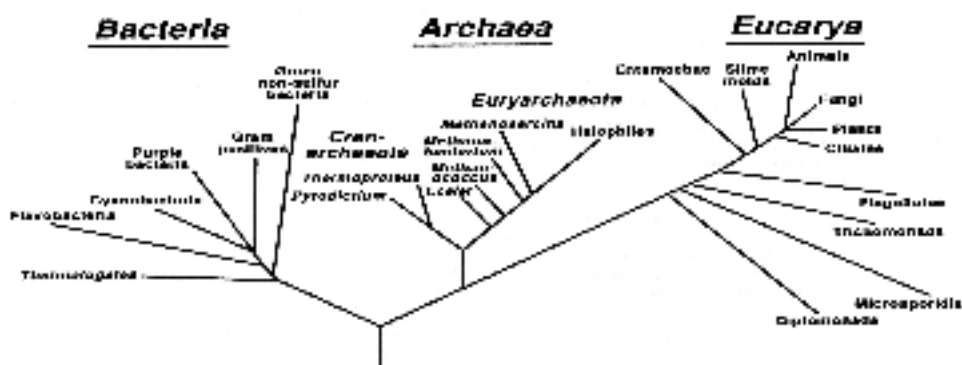


Abbildung 1: universeller phylogenetischer Stammbaum, basierend auf vergleichender 16S rRNA-Sequenzanalyse (nach OLSEN und WOESE, 1993).

Ribosomale RNA bzw. ihre codierende rDNA eignen sich auch deshalb sehr für phylogenetische Analysen, da neben hochkonservierten Bereichen ebenfalls hochvariable Abschnitte vorkommen. Konservierte Abschnitte eignen sich für die Anwendung universeller Sonden um bei Untersuchungen komplexer mikrobieller Ökosysteme möglichst rDNA-Sequenzen aller vorhandenen Spezies, auch solche von bisher nicht-kultivierbaren und daher unbekanntem Vertretern mit einzubeziehen, um somit einen repräsentativen Querschnitt der tatsächlich vorkommenden Keime zu erhalten (MARCHESI et al., 1998).

Auf Basis ihrer rDNA-Sequenzdaten lassen sich somit bis dato unbekannte Keime taxonomisch eingruppiert. Dabei gilt als Richtwert, dass rDNA mit einer Homologie von weniger als 95% zu bekannten Sequenzen in den allermeisten Fällen als neue Spezies betrachtet werden kann, besonders wenn zusätzlich DNA-DNA-Hybridisierungs-Ergebnisse gesamtgenomischer DNA dieses unterstützen (AMANN et al., 1995). Homologien über 70% ergeben sich hierbei bei Vertretern der gleichen Spezies, während sich auf Gensebene Homologien zwischen 20-70% ergeben. Variable Abschnitte der rDNA dagegen bieten die Möglichkeit für die Anwendung gruppenspezifischer oder speziesspezifischer Primer bzw. Oligonukleotidsonden, um Keime spezifisch nachzuweisen (RELMAN, 1993).

Bei Kenntnis der entsprechenden Sequenzabschnitte lassen sich Oligonukleotidsonden konstruieren, die spezifisch für die zu untersuchende Spezies sind. Diese Oligonukleotidsonden können dann im Rahmen von Dot blot-Hybridisierungen oder *in situ*-Hybridisierungen für den Nachweis entsprechender Keime eingesetzt werden (AMANN et al., 1995). Dieser methodische Ansatz eignet sich daher insbesondere für den Nachweis schwer oder sogar nicht-kultivierbarer Spezies in entsprechendem Probenmaterial. So war es zum Beispiel auf Basis der 16/23S rRNA-Analytik möglich, den Nachweis und die pathogene Beteiligung von Mikroorganismen bei bestimmten Krankheitsbildern wie etwa die Beteiligung von *Rochalimaea henselae* an der bazillären Angiomatose aufzuzeigen oder das Vorkommen und die mögliche Beteiligung verschiedener *Treponema*-Spezies bei der Dermatitis digitalis nachzuweisen (RELMAN, 1993; MOTER und GÖBEL, 2000).

Neben ribosomaler RNA wurden für phylogenetische Analysen aber auch andere Markermoleküle verwendet. Vor allem kamen hierbei die Gene von Molekülen mit zentralen Funktionen wie RNA-Polymerasen, Elongationsfaktor Tu (EF-Tu), H⁺-translocating ATPasen sowie Cytochromoxidase C in Betracht (OLSEN und WOESE, 1993). Einerseits bieten Proteine den Vorteil, aus 20 verschiedenen Aminosäuren zu bestehen, was auf den ersten Blick eine Steigerung des Informationsgehaltes zur Folge hat. Andererseits wird der Wert als phylogenetisches Markermolekül dadurch eingeschränkt, dass häufig Austausch von

funktionell ähnlichen Aminosäuren wie zum Beispiel Leucin, Isoleucin und Valin stattfinden, ohne dass hierfür aus evolutionärer Sicht zwingende Gründe vorgelegen hätten (OLSEN und WOESE, 1993).

Auch ist bekannt, dass Proteinsequenzen stark von den Umweltbedingungen beeinflusst werden, in denen bestimmte Keime ansässig sind. Dementsprechend besitzen zum Beispiel thermophile Bakterien generell einen deutlich höheren G/C-Gehalt als andere Keime, der sich folglich auch in Protein-kodierenden Sequenzen widerspiegelt. Dieser Umstand kann Probleme bei phylogenetischen Analysen bereiten (OLSEN und WOESE, 1993). Weiterhin bieten Proteinsequenzen einen geringeren Informationsgehalt (bits) als die 16S oder 23S rRNA-Sequenzen. Im Vergleich mit den Markermolekülen EF-Tu und der ATPase β -Untereinheit besitzt die 16S rRNA einen mindestens 30% bzw. 20% höheren Informationsgehalt, während beim Vergleich mit der 23S rRNA dieser Informationsgehalt sogar mindestens doppelt so hoch ist (LUDWIG et al., 1998). So können phylogenetische Zusammenhänge mit Hilfe von 16S rRNA-Analysen detaillierter dargestellt werden und decken sich prinzipiell mit Ergebnissen, die auf Sequenzanalysen des Elongationsfaktors EF-Tu sowie der ATPase β -Untereinheit beruhen (LUDWIG et al., 1993).

Eine weitere sinnvolle Ergänzung zur Verwendung von 16/23S rRNA stellen die Ergebnisse von GUPTA (2001) dar, der in den bakteriellen Hauptgruppen nachweisen konnte, dass die Einführung konservierter Insertionen oder Deletionen, sog. „Indels“, in bestimmten Proteinsequenzen in einer bestimmten zeitlichen Reihenfolge stattfand. So kann mit Hilfe dieser Indels aufgezeigt werden, wann sich im Laufe der Evolution eine Hauptgruppe innerhalb der Domain Bacteria von den übrigen abgespalten hat und die einzelnen Hauptgruppen können klar voneinander unterschieden werden. Somit ergänzt und stützt dieser Ansatz den rRNA-Ansatz insofern, als dass es mit dem rRNA-Ansatz sowohl Schwierigkeiten bereitet, die Hauptgruppen klar voneinander zu unterscheiden, als auch die zeitliche Reihenfolge der Abspaltung während der Evolution aufzuzeigen (GUPTA und GRIFFITHS, 2002). Für eine Identifizierung und phylogenetische Einordnung einzelner Spezies eignet sich dieser Ansatz allerdings nicht, da das Vorkommen von Indels hierfür nicht diskriminativ genug ist.

Zur Generierung ribosomaler Sequenzdaten gibt es verschiedene Methoden. Die reverse Transkription von rRNA ist zwar eine effektive Methode, hat jedoch den Nachteil, dass relativ große rRNA-Ausgangsmengen benötigt werden, und dies ist bei geringen Mengen von Probenmaterial oft limitierend. Bei der Klonierung von 16S rRNA-Genen ist man ebenfalls auf ausreichende DNA-Mengen angewiesen, zudem bedeutet das Screening der genomischen

Bibliothek bei dieser Vorgehensweise einen hohen zeitlichen Aufwand (SCHMIDT und RELMAN, 1994). Eine einfache, jedoch selektive Möglichkeit, ist dagegen die gezielte Amplifikation von 16S rRNA-Genen mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) unter Verwendung entsprechender 16S rDNA-Primer (HUGENHOLTZ und PACE, 1996).

Neben den aufgezeigten Vorteilen des so genannten „rRNA-approach“ sind bei der Analyse komplexer mikrobieller Habitate auch einige Einschränkungen zu beachten. Diese Einschränkungen sind einerseits mit der Anwendung der PCR assoziiert und werden auch als so genannte „PCR-Bias“ bezeichnet, andererseits sind diese Einschränkungen die Folge bestimmter Merkmale der ribosomalen RNA selbst (Hugenholtz et al., 1998). Häufig besteht das initiale Problem darin, DNA aus problematischem Probenmaterial wie Kot oder Bodenproben so aufzureinigen, dass Inhibitoren ausreichend entfernt werden und somit die anschließende PCR nicht inhibieren bzw. in ihrer Qualität beeinträchtigen können (TEBBE und VAHJEN, 1993). Um inhibitorische Effekte zu minimieren, ist daher häufig der Zusatz von bovinem Serumalbumin oder T4 Gen 32-Protein anzuraten (KREADER, 1996).

Bekannt ist zudem, dass es zu einer ungleichmäßigen Amplifikation verschiedener rDNA-Templates in einer PCR in Abhängigkeit der Primer-DNA-Hybridisierungsbedingungen kommen kann, so dass möglicherweise 16S rDNA-Sequenzen von vorhandenen Spezies nicht oder unzureichend koamplifiziert werden und so in weitergehenden Analysen unberücksichtigt bleiben (REYSENBACH et al., 1992; SUZUKI und GIOVANNONI, 1996). Ebenso spielt die Menge der eingesetzten Template-DNA eine Rolle. Untersuchungen von CHANDLER et al. (1997) ergaben, dass es für geringe Template-Konzentrationen nicht möglich war, ein repräsentatives RFLP-Muster nach zusätzlicher Verdünnung der Template-Konzentration zu reproduzieren. Gerade bei Sequenzanalysen von Klonsequenzen ist zu bedenken, dass verschiedene Spezies eine unterschiedliche Anzahl von *rrn*-Genen besitzen können, welche untereinander selbst hinsichtlich der Sequenz gewisse Mikroheterogenitäten aufweisen. Durch Klonierungsschritte werden diese Operone separiert und im Anschluss einzeln sequenzanalysiert, so dass nicht unterschieden werden kann, ob annähernd homologe Sequenzen vom gleichen Stamm herrühren oder ob diese von nah verwandten Spezies stammen (AMANN et al., 1996). Dabei variieren die Unterschiede zwischen einigen Zehntelprozenten bis hin zu ca. 5 %, etwa bei Archaeobakterium *Haloarcula marismortui* (DRYDEN und KAPLAN, 1990; MYLVAGANAM und DENNIS, 1992).

Weiterhin konnte FARRELLY et al. (1995) zeigen, dass es unter dem Einfluss unterschiedlicher Genomgrößen und unterschiedlicher Anzahl von *rrn*-Genen zu verschiedenen Endkonzentrationen der koamplifizierten 16S rDNA-Produkte der jeweiligen Spezies kommt.

Im Zusammenhang mit Analysen von Klonsequenzen ist auch zu beachten, dass es in Abhängigkeit verschiedener Amplifizierungsbedingungen wie Zyklenanzahl, Elongationszeit etc. durch in vitro-Rekombinationen zur Bildung so genannter chimärer Sequenzen während der PCR-Amplifikation kommen kann (WANG und WANG, 1996; WANG und WANG, 1997). Dieses Phänomen spielt insbesondere dann eine Rolle, wenn komplexe mikrobielle Habitate untersucht werden und dementsprechend eine Vielzahl verschiedener rRNA-Gene vorliegt. Um solche chimären Sequenzen zu identifizieren und von anschließenden Analysen auszuschließen, hat es sich bewährt, entsprechende Softwareprogramme wie CHECK-CHIMERA zu benutzen (LARSEN et al., 1993).

Einen weiteren Einfluss auf die Analyse diverser mikrobieller Habitate wurde von BONNET et al. (2002) untersucht. Beim Anlegen von rDNA-Bibliotheken aus Faecesbakterien konnte ein Einfluss durch die Anzahl der PCR-Zyklen beobachtet werden. So zeigte eine 16S rRNA-Genbibliothek nach nur 10 Zyklen eine höhere Diversität als nach 25-Zyklen.

Bei Verwendung der Taq-Polymerase wiederum ist zu bedenken, dass dieses Enzym keine „proof-reading“-Funktion besitzt, so dass es während der Polymerisation zum Einbau falscher Basen in unterschiedlichen Häufigkeiten von $1:1 \times 10^{-3}$ bis zu $1:2 \times 10^{-4}$ in Abhängigkeit der PCR-Bedingungen kommen kann (ECKERT und KUNKEL, 1991). Insgesamt spielt der mögliche Einbau falscher Basen aber keine wesentliche Rolle, da es maximal zu 0,3% Sequenzdivergenz kommen kann, was auf eine phylogenetische Zuordnung keinen Effekt hat (VON WINTZINGERODE et al., 1997).

Trotz dieser Einschränkungen ist die vergleichende ribosomale Sequenzanalyse die Methode der Wahl bei der phylogenetischen Analyse komplexer bakterieller Habitate, gerade im Zusammenhang mit unbekanntem oder schwer kultivierbarem Keimen, oder bei der taxonomischen Einordnung neu kultivierter oder bereits bekannter Spezies. Folglich wird und wurde von vielen Autoren bevorzugt sowohl das 16S rRNA-Gen als auch das 23S rRNA-Gen bzw. die 16S/23S-Interspacerregion zur Analyse herangezogen, wenn eine ausreichende Unterscheidung auf Basis der 16S rDNA nicht möglich war (GIOVANNONI et al., 1990; OLSEN, 1990; GÜRTLER und STANISICH, 1996; LESER et al., 1997; GARCIA-MARTINEZ et al., 1999; BARCELLOS et al., 2000).

2.2 Genus *Treponema*

Treponemen sind gramnegative Bakterien und werden taxonomisch der Ordnung *Spirochaetales* zugeordnet. Diese Ordnung beinhaltet die Familien *Spirochaetaceae*, *Brachyspiraceae* und *Leptospiraceae*. Innerhalb der *Spirochaetaceae* wiederum finden sich die jeweiligen Spezies der Gattungen *Borrelia*, *Brevinema*, *Cristispira*, *Spirochaeta*, *Spironema* und *Treponema*, während die *Brachyspiraceae* lediglich das Genus *Brachyspira* und die *Leptospiraceae* die Genera *Leptospira* und *Leptonema* beinhalten (PASTER und DEWHIRST, 2000).

Spirochaeten wird ein monophyletischer Ursprung zugesprochen, und es wird vermutet, dass sie sich schon sehr frühzeitig von den übrigen Bakterien abgespalten haben. 16S rRNA-Sequenzanalysen haben belegt, dass Spirochaeten individuelle „base-signatures“ aufweisen, die nur bei Vertretern dieser Ordnung gefunden werden. Die Genera *Treponema*, *Spirochaeta* und *Leptospira* besitzen am 5'-Ende des 16S rRNA-Moleküls zusätzlich eine 20 bis 30 Basen lange hoch variable Verlängerung, die nur innerhalb dieser drei Genera vorkommt (PASTER et al., 1991).

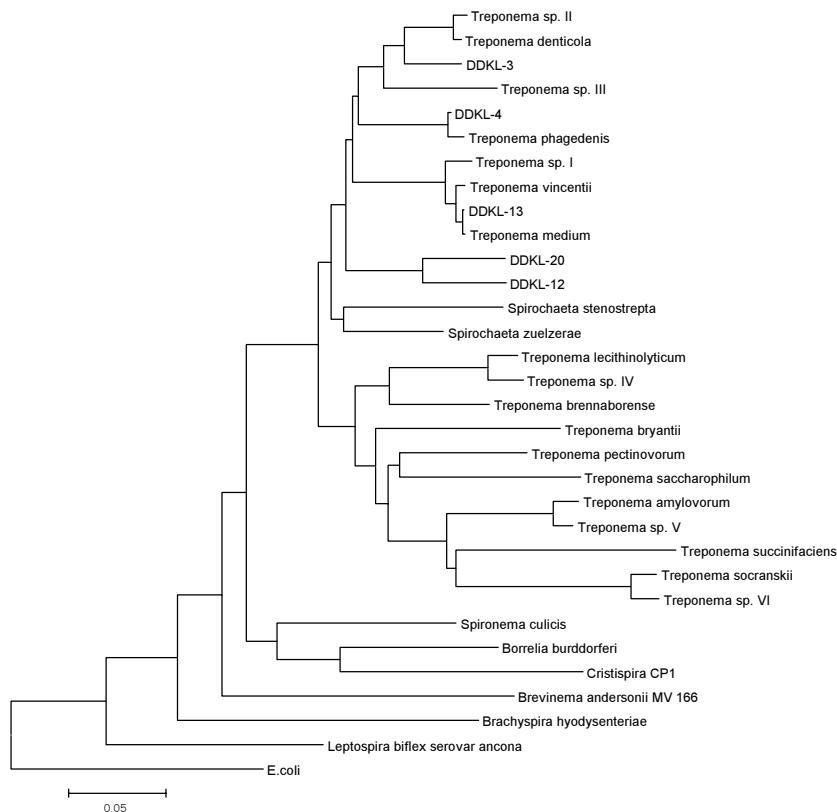


Abbildung 2: Darstellung der phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse ausgewählter Spirochätenspezies, basierend auf 16S rRNA-Sequenzanalyse.

Die phylogenetische Sonderstellung von Treponemen spiegelt sich ebenfalls in ihren einzigartigen phänotypischen Merkmalen wieder (PASTER und DEWHIRST, 2000). Typischerweise besitzen alle Mitglieder der *Spirochaetales* eine helikal gewundene Zellform, wobei jedes Genus in Abhängigkeit der Kultivierungsbedingungen eine charakteristische Anzahl von Windungen aufweisen soll (HOLT, 1978; SMIBERT, 1986).

Spirochaeten besitzen zudem einen im Vergleich zu anderen gramnegativen bzw. grampositiven Bakterien unterschiedlichen Zellaufbau. Als zentrales Element ist der Protoplasmazyylinder zu nennen, welcher Zytoplasma und Zellkern beinhaltet und von der Zytoplasmamembran umgeben ist. Diese Membran ist überzogen mit periplasmatischen Flagellen, wobei die Anzahl der Flagellen je nach Genus sowie Spezies spezifisch variiert. Die Flagellen inserieren jeweils an den beiden Polen der Zelle und sind für die Motilität der Spirochaeten verantwortlich (SELLWOOD, 1997). Sie sind wiederum umgeben von einer äußeren Scheide, die einen trilaminären Aufbau besitzt und den äußeren Abschluss der Zelle darstellt. Die genaue Funktion dieser äußeren Scheide ist nicht bekannt, sie ist jedoch für die Lebensfähigkeit der Bakterien notwendig. Es wird vermutet, dass eine Beschädigung der äußeren Membran den Austritt von lebensnotwendigen Bestandteilen bewirkt (JOHNSON, 1986).

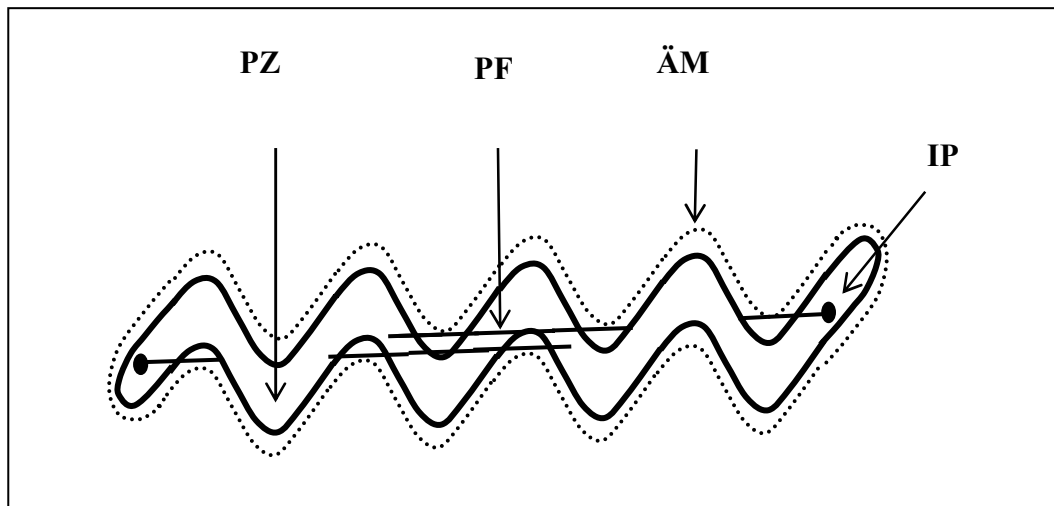


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Ultrastruktur von Spirochäten. PF=periplasmatische Flagellen, PZ=Protoplasmazyylinder, ÄM=äußere Membran, IP=Insertionsstelle der periplasmatischen Flagellen.

Bei Spirochaeten wird auch die Ausbildung so genannter „spherical bzw. multicellular bodies“ beobachtet. Diese Rundformen wurden bereits von HAMPP et al. (1948) sowie SOBERNHEIM und LOEWENTHAL (1930) bei oralen Spirochäten bzw. *Treponema pallidum*-Stämmen beschrieben. Bei der Ausbildung dieser morphologischen Sonderformen verlieren Treponemen ihre individuelle äußere Scheide sowie ihre periplasmatischen Flagellen und kapseln sich in einer normalen Zellmembran ein (WOLF et al., 1993).

Untersuchungen von DE CICCIO et al. (1999) an *Treponema denticola* ergaben, dass Umwelteinflüsse wie Sauerstoffangebot, Inkubationstemperatur, Nährstoffangebot und die Anreicherung von Stoffwechselprodukten die Ausbildung dieser Rundformen stark beeinflussen, so dass dieser Vorgang möglicherweise als Reaktion auf Umweltstress zu sehen ist und Treponemen die Möglichkeit bietet, diesen Stress zu überdauern.

Zur Zeit sind ca. 200 Spirochätenspezies bekannt, von denen ein Großteil bislang nicht kultivierbar ist (PASTER und DEWHIRST, 2000). So beinhaltet auch das Genus *Treponema* kultivierbare und nicht-kultivierbare Vertreter. Treponemen sind obligate Anaerobier und haben hohe Ansprüche an die Kultivierungsmethoden, so dass die Anzucht generell schwierig verläuft.

Vertreter wie *Treponema denticola*, *Treponema vincentii* oder *Treponema phagedenis* benötigen den Zusatz von Serum als Quelle für langkettige Fettsäuren im Kulturmedium. Andere Vertreter wiederum benötigen statt Serum eine Mischung der kurzkettigen flüchtigen Fettsäuren, wie Essigsäure, Propionsäure, Isobutyrat, n-Butyrat, Isovaleriansäure und n-Valeriansäure. Diese flüchtigen Fettsäuren können durch autoklavierten oder künstlich hergestellten Pansensaft zugesetzt werden (SMIBERT, 1986). CALDWELL et al. (1966) beschrieb weiterhin die Zugabe von einem Gemisch aus flüchtigen Fettsäuren zum Medium.

WYSS (1992) hingegen beschrieb das chemisch definierte Medium OMIZ-W1, welches sich unter anderem zur Kultivierung von *T. denticola*, *T. pectinovorum*, *T. socranskii* und *T. vincentii* eignete. Durch weitere Modifikationen in der Zusammensetzung entstand schließlich das Medium OMIZ-Pat, welches zur Isolierung und Kultivierung weiterer bis dato auch unbekannter *Treponema*-Spezies angewendet wurde (WYSS et al., 1996; WYSS et al., 1997; SCHRANK et al., 1999; WYSS et al., 1999). Die Verwendung verschiedener kommerzieller Medien wie „Oral Treponeme Enrichment broth“ (OTE) oder FAB-Medium (fastidious anaerobe broth) mit einem Zusatz von 25% fetalem Kälberserum führten ebenfalls zur Isolierung von *Treponema*-Spezies (DEMIRKAN et al., 1999; COLLIGHAN et al., 2000). So gelang es COLLIGHAN et al. (2000) von Schafen mit Hilfe von FAB-Medium unter Zusatz von 25 % fetalem Kälberserum Treponemen anzuzüchten.

Ein weiteres Problem bei der Isolierung von Spirochäten ist die Gewinnung von Reinkulturen. Zur Isolierung von *Treponema*-Spezies aus Mischkulturen sind zwei Methoden beschrieben, welche die Motilität von Treponemen ausnützen. Bei der ersten Methode handelt es sich um die so genannte Well-Plate-Methode, von der wiederum mehrere Varianten etabliert wurden (ROSEBURY und FOLEY, 1942; ROSEBURY et al., 1951; HAMPP, 1957; HANSON und CANNEFAX, 1964; HANSON, 1970). Allen Varianten beruhen prinzipiell auf dem Ausbringen eines Inokulums einer Bakteriensuspension in die Vertiefung einer Agarplatte, so dass vorhandene Treponemen aufgrund ihrer Motilität in den umgebenen Agar diffundieren können und sich somit von der restlichen Bakterienflora trennen lassen.

Bei der zweiten, der so genannten Membranfilter-Methode, nutzt man die Fähigkeit von Treponemen aus, aktiv durch die Poren eines Filters zu wandern, während die meisten anderen Bakterien hierzu nicht in der Lage sind (LOESCHE und SOCRANSKY, 1962; HARDY et al., 1964; BLAKE, 1968; SOCRANSKY et al., 1969; BOWDEN und HARDIE, 1971; TAYLOR und ALEXANDER, 1971; HUNTER und ROSS, 1972; SMIBERT und CLAUTERBAUGH, 1972).

Weiterhin finden bei der Isolierung von Treponemen Selektivmedien Anwendung, denen Antiinfektiva zugefügt werden. Hier finden insbesondere Rifampicin bzw. Phosphomycin Verwendung, da Treponemen gegenüber diesen Stoffen eine natürliche Resistenz aufweisen (STANTON und CANALE-PAROLA, 1979).

2.3 Vorkommen von Treponemen

Spirochäten kommen im Intestinaltrakt von Mensch und Tieren vor (STANTON, 1997). Die vermutlich früheste Beschreibung von Spirochaeten stammt von van Leeuwenhoek, der über mikroskopische Tierchen aus einer Durchfallprobe und aus einer Zahnprobe berichtete, die ihren Zelleib kurvenähnlich verbogen, um vorwärts zu gelangen (DOBELL, 1932). Neben dem Vorkommen von apathogenen Vertretern in natürlichen Habitaten wie dem Magen-Darm-Trakt sind Treponemen auch als Krankheitserreger vor allem bei der Syphilis des Menschen, als Miterreger der Dermatitis digitalis des Rindes, als mitbeteiligte Parodontalerreger bei Mensch und Tier und als Auslöser der Kaninchensyphilis beteiligt (STANTON und CANALE-PAROLA, 1980; PASTER und CANALE-PAROLA, 1982).

2.3.1 Natürliche Habitate

2.3.1.1 Pansen

Der Pansen bildet neben einer Vielzahl von Protozoen und anderer Mikroorganismen ebenfalls für Treponemen ein natürliches Habitat. Durch ihre biochemischen Stoffwechsellleistungen und Wechselwirkungen mit anderen cellolytischen Mikroorganismen sind sie an der Degradation von pflanzlichen Polysacchariden beteiligt (STANTON, 1997). In Untersuchungen von STANTON und CANALE-PAROLA (1979) über das Vorkommen von Spirochäten im Pansensaft konnten sie bis zu $0,1 \times 10^8$ Spirochaeten zählen. Es konnten mehrere Stämme isoliert werden, die in 7 verschiedene Morphotypen eingeteilt wurden. Grundlage dieser Einteilung waren die Zellgröße und die Anzahl der Windungen.

Auch konnten im Pansensaft Spirochäten verschiedener Größe beobachtet werden. So konnten bei Kultivierungsversuchen von ZIOLECKI (1979) zehn verschiedene Stämme so genannter großer Treponemen mit einer Länge von 12-25 μm isoliert werden. Die einzelnen Stämme wiesen geringe Unterschiede hinsichtlich ihrer Wachstums- und Fermentationsraten sowie ihrer Kultivierungsansprüche auf. Allen gemeinsam war der Abbau von Kohlenhydraten zu Acetat und Formiat. Obwohl diese Stämme als dominierende Stoffwechsellleistung pektinolytische Fähigkeiten aufwiesen, scheinen diese beschriebenen Treponemen im Pansenstoffwechsel keine sehr große Rolle zu spielen.

Auch konnten weitere pektinolytische Spirochäten aus dem Pansen isoliert und charakterisiert werden (ZIOLECKI und WOJCIECHOWICS, 1980). Sie unterschieden sich vor allem hinsichtlich ihrer Größe, wobei die Länge 5 – 11 μm und der Durchmesser etwa 0,4 μm betrug, weshalb sie als „kleine“ Spirochäten bezeichnet wurden. Sie wiesen jedoch ebenfalls die typische Ultrastruktur von Spirochäten auf. Hauptabbauprodukte von Pektin waren ebenfalls Acetat und Formiat. Eine exakte Spezieszuordnung dieser Isolate wurde allerdings nicht vorgenommen.

STANTON und CANALE-PAROLA (1980) charakterisierten den Stamm RUS-1, eine saccharolytische Spirochäte aus dem Pansen, die mit anderen cellolytischen Bakterien assoziiert war, und klassifizierten diesen Stamm als Typstamm der neuen Spezies *Treponema bryantii*. *Treponema bryantii* selbst konnte keine Cellulose verwerten, aber in Co-Kultur mit anderen cellolytischen Bakterien wie *Bacteroides succinogenes* wurde deren cellolytische Aktivität verstärkt (STANTON und CANALE-PAROLA, 1980; KUDO et al., 1987). Weiterhin verwertete diese Spirochäte Zucker, der als Abbauprodukte von Cellulose

freigesetzt wurde. Glukose wurde zu Succinat, Acetat und Format fermentiert. Morphologisch wies *Treponema bryantii* die typische Ultrastruktur von Spirochäten auf.

Es konnten auch solche Spirochäten in Pansensaft nachgewiesen werden, die beim Abbau von pflanzlichen Polymeren wie Xylan, Pectin und Arabinogalactan sowie von deren Hydrolyseprodukten im Pansen eine Rolle spielen (PASTER und CANALE-PAROLA, 1982). Dabei wurde in Folge *Treponema saccharophilum* als zweite im Pansen vorkommende *Treponema*-Spezies neben *Treponema bryantii* erstmalig isoliert und charakterisiert (PASTER und CANALE-PAROLA, 1985).

Auch TRKOV et al. (2001) gelang die Isolierung einer bis dato unbekanntes *Treponema*-Spezies aus dem Pansen. Die neue Spezies unterschied sich von den beiden bis zu diesem Zeitpunkt im Pansen bekannten und taxonomisch validierten Spezies *Treponema bryantii* und *Treponema saccharophilum* dadurch, dass sie nicht in der Lage war, Lactose und D-Mannose zu fermentieren (STANTON und CANALE-PAROLA, 1980; PASTER und CANALE-PAROLA, 1985). Beim Vergleich von Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismen des 16S rRNA-Gens unterschied sich das neue Isolat ebenfalls von *T. bryantii* bzw. *T. saccharophilum*. Allerdings ist die Klassifizierung noch nicht abgeschlossen.

TAJIMA et al. (1999) konnte in Untersuchungen zur bakteriellen Diversität im Pansen mit Hilfe von 16S rDNA-Genbanken lediglich einen von 84 Klonen identifizieren, der eine 98%ige Verwandtschaft zu *Treponema bryantii* aufwies. Vergleichende 16S rRNA-Analysen von Pansenbakterien in Untersuchungen von WHITFORD et al. (1998) konnten dagegen keinen einzigen zum Genus *Treponema* gehörenden Klon aufzeigen. Die Ergebnisse dieser unterschiedlichen Untersuchungen deuten darauf, dass *Treponema bryantii* und auch *Treponema saccharophilum* möglicherweise nicht abundant im Pansen vorkommt, oder dass aber andererseits der Keimzahlgehalt im Pansensaft für einen steten und sicheren Nachweis nicht immer ausreicht.

2.3.1.2 Gastrointestinaltrakt verschiedener Spezies

Neben den beim Rind vorkommenden Treponemen ist bei einem gesunden Schwein die Spezies *Treponema succinifaciens* beschrieben und charakterisiert worden (CWYK und CANALE-PAROLA, 1979). Diese Spezies wies ebenfalls die typische Ultrastruktur auf. Als Besonderheit wurde ihre hohe Fortbewegungsgeschwindigkeit genannt, die 15 µm/s bzw. 54 mm/h betrug. Dieser Stamm baute Glukose vor allem zu Acetat, Format, Succinat und Lactat ab.

Die Untersuchungen belegen, dass Spirochäten physiologische Bewohner des Gastrointestinaltraktes von Säugetieren sind. Treponemen wurden jedoch in großer Anzahl auch im

Darmtrakt von Termiten nachgewiesen und beschrieben. Sie liegen entweder frei im Darminhalt vor oder finden sich als Endosymbionten innerhalb von Flagellaten oder haften außen an deren Oberfläche an (CLEVELAND und GRIMSTONE, 1964; BREZNAK, 1984). So konnte BERCHTHOLD et al. (1994) eine nicht kultivierbare Spirochäte aus dem Darm der australischen Termiten *Mastotermes darwiniensis* (Froggatt) anhand ihrer 16S rRNA-Sequenz als dem Genus *Treponema* zugehörig identifizieren. Der entsprechende rDNA-Klon MDS1 hatte mit 90,7 % die größte Ähnlichkeit zu *Treponema* sp. Stamm H1, sowie mit 89,8 % zu *Spirochaeta stenostrepta*. *Spirochaeta stenostrepta* ist zwar zusammen mit *Spirochaeta caldaria* sowie *Spirochaeta zuelzeri* innerhalb des Genus *Spirochaeta* eingruppiert, hat jedoch tatsächlich wie die genannten Vertreter eine größere Verwandtschaft zu Stämmen des Genus *Treponema* (PASTER et al., 1991). In der gleichen Termitenspezies konnten schließlich anhand ihrer 16S rRNA-Sequenz noch weitere *Treponema* spp. identifiziert werden (BERCHTHOLD und KÖNIG, 1996).

Untersuchungen zur Diversität von Spirochäten im Darm der afrikanischen Termiten *Nasutitermes lujae* (Wasmann) ergaben unter anderem den Klon NL1 (PASTER et al., 1996). 16S rRNA-Sequenzanalysen zeigten zu Vertretern des Genus *Treponema* durchschnittlich einen 85%-igen Verwandtschaftsgrad. Klon NL1 hatte mit 88% zu *Spirochaeta caldaria* sowie mit 87% zu *Spirochaeta stenostrepta* bzw. Klon MSD1 die größte Ähnlichkeit. OHKUMA und KUDO (1996) konnten weitere 16S rRNA-Klone nachweisen, die dem Genus *Treponema* zuzuordnen waren. In Untersuchungen an der niederen Termiten *Reticulitermes speratus* wurden anhand von 16S rRNA-Analysen insgesamt 10 Klone identifiziert, die spirochätale Sequenzen enthielten (OHKUMA und KUDO, 1996). Die Klonsequenzen konnten in zwei *Treponema*-Cluster unterteilt werden. Ein Cluster enthielt Klon-Sequenzen, welche die größte Ähnlichkeit mit *Treponema pectinovorum* und *Treponema bryantii* hatten, während der andere Cluster diejenigen Klonsequenzen beinhaltete, die mit *Spirochaeta stenostrepta* die größte Übereinstimmung zeigten. Weitere phylogenetische Untersuchungen der intestinalen Mikroflora bei der niederen Termiten *Cryptotermes domesticus* von OHKUMA und KUDO (1998) ergaben drei Klon-Sequenzen, die ebenfalls dem Genus *Treponema* zuzuordnen sind.

Auch andere Untersuchungen zur Diversität von Treponemen im Darminhalt weiterer Termiten-Spezies (*Reticulitermes flavipes*, *Coptotermes formosanus* sowie *Zootermopsis angusticollis*), zeigten, dass in der Darmflora eine sehr große Diversität verschiedenster, bis dato unbekannter *Treponema*-Spezies herrscht (LILBURN et al., 1999). So konnten in *R. flavipes* wenigstens 21, in *Coptotermes formosanus* 3 und in *Zootermopsis angusticollis* 1

neuer Phylotyp anhand ihrer 16S DNA-Sequenzen identifiziert werden. Interessanterweise sind die bei Termiten vorkommenden Treponemen bislang völlig unbekannt und stellen zusätzlich zu den bekannten Treponemen eine Vielzahl neuer *Treponema*-Spezies dar. Zusammen mit den Sequenzdaten der vorangegangenen Untersuchungen an den Termiten *Reticulitermes speratus*, *Mastotermes darwiniensis*, *Cryptotermes domesticus* und *Nasutitermes lujae* zeigt sich, dass keine dieser Sequenzen eine größere Homologie als 91% mit einer bis dahin bekannten *Treponema*-Spezies aufwies und in zwei Cluster aufgeteilt werden konnten (LILBURN et al., 1999).

Das erste Cluster beinhaltet neben den sog. *Treponema phagedenis*- und *Treponema bryantii*-Subgruppen den oralen Phylotypen und den DD-Phylotypen nur eine geringe Anzahl von 16S rDNA-Sequenzen, die aus Untersuchungen an Termiten stammen (PASTER et al., 1991; CHOI et al., 1994; CHOI et al., 1997). Der zweite, so genannte „termite-cluster“, beinhaltet die große Mehrzahl der Phylotypen, die im Darminhalt von Termiten zu finden sind. Hierzu gehören auch die beiden zum Genus *Treponema* gehörenden Spezies *Spirochaeta caldaria* und *Spirochaeta stenostrepta*. Alle diese Untersuchungen belegen, dass die Diversität der Treponemen wesentlich größer ist, als es die derzeitige Anzahl von Spezies belegen und verdeutlichen die große Aussagekraft kulturunabhängiger Nachweisverfahren.

Die Diversität von Treponemen in Termiten spiegelte sich auch in Untersuchungen an der Termiten *Zootermopsis angusticollis* wieder. Dabei konnten die beiden *Treponema*-Stämme ZAS-1 und ZAS-2 mit Hilfe von Anreicherungsmedien als Reinkultur isoliert werden (LILBURN et al., 1999). Beide Stämme haben untereinander eine Sequenzähnlichkeit von 98% und die größte Ähnlichkeit zu kultivierbaren Vertretern bestand auch bei diesen beiden Stämmen zu *Spirochaeta caldaria* und *Spirochaeta stenostrepta* mit 92 bis 93%. Zudem waren beide Stämme in der Lage, Acetat aus CO₂ und H₂ zu bilden, eine bis dahin bei den Spirochäten unbekannte Stoffwechselleistung. Bei einem weiteren Isolat, ZAS-9, konnte dessen Bedeutung für die Termiten bei der Stickstoff-Fixierung gezeigt werden (LILBURN et al., 2001).

Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass *Treponema*-Spezies eine substantielle Rolle bei der Nährstoffversorgung von Termiten spielen (LEADBETTER et al., 1999). Weitere phylogenetische 16S rRNA-Analysen der Darmflora an den beiden höheren Termiten *Pericapritermes nitobei* und *Nasutitermes takasagoensis* und an den beiden niederen Termiten *Glyptotermes fuscus* und *Hodotermopsis sjoestedti* ergaben anhand der 16S rDNA-Sequenzen 30 neue Phylotypen, die dem Genus *Treponema* zuzuordnen sind (OHKUMA et al., 1999).

Zusammen mit den bis dahin bekannten 16S rRNA-Sequenzen aus Untersuchungen von *M. darwininiensis*, *N. lujae*, *R. speratus*, *C. domesticus* und *Z. angusticollis* konnten insgesamt 53 treponemale Klone phylogenetisch analysiert und diese Sequenzen in 2 diskrete Cluster eingeteilt werden, ähnlich der Eingruppierung von LILBURN et al (1999) Cluster I beinhaltet mit 45 Sequenzen zusammen mit *Spirochaeta stenostrepta* und *Spirochaeta caldaria* den Großteil dieser 16S RNA-Sequenzen. Zudem enthält Cluster I alle Sequenzen, die bei den höheren Termiten gefunden wurden. Die übrigen 8 Sequenzen entfallen in Cluster II, der phylogenetisch die größte Verwandtschaft zur *Treponema bryantii*-Subgruppe besitzt (OHKUMA et al., 1999).

Diese Untersuchungen zur Diversität von Treponemen im Darminhalt von Termiten ergaben eine Vielzahl bis dahin unbekannter *Treponema*-Spezies, ohne dass allerdings bei niederen Termiten unterschieden werden konnte, ob diese Spezies in der flüssigen Phase des Darminhaltes oder auf der Oberfläche von ebenfalls ansässigen cellolytischen Darmprotozoen zu finden sind. Niedere Termiten unterscheiden sich von höheren Termiten durch das Vorhandensein dieser Darmprotozoen, welche auf ihrer Oberfläche bis zu mehreren tausend Spirochäten beherbergen können. Dieses Phänomen, übrigens als „motility symbiosis“ bezeichnet wird, stellt also eine Form der Symbiose dar (CLEVELAND und GRIMSTONE, 1964).

IIDA et al. (2000) gelang es diese ectosymbiontischen Spirochäten weitergehend phylogenetisch zu analysieren. Sequenzen, die von oxymonadischen Protisten gewonnen werden konnten, konnten überwiegend den o.g. Cluster I 16S rRNA-Sequenzen zugeordnet werden. Die übrigen Klon-Sequenzen gehörten phylogenetisch zu denen des Cluster II und bildeten dort zusammen wiederum 2 Subcluster, bezeichnet als „Termite treponema cluster IIA und IIB“.

Tab. 1 vermittelt einen Überblick über die Diversität verschiedenster *Treponema*-Phylotypen bei Termiten, welche nur kulturunabhängig auf Basis der vergleichenden 16S rRNA-Sequenzanalyse identifiziert werden konnten. Hierbei wird deutlich, dass der Intestinaltrakt von Termiten eine herausragende Bedeutung für das Vorkommen einer Vielzahl bisher unbekannter *Treponema*-spp. besitzt und unterstreicht die Bedeutung kulturunabhängiger Untersuchungsverfahren.

Tabelle 1: Übersicht termitenspezifischer Phylotypen des Genus *Treponema*, (modifiziert nach LILBURN et al., 1999).

Termitenspezies	Klon-Prefix	Phylotypen	Referenz
<i>Reticulitermes flaviceps</i>	RFS	RFS9, RFS3, RFS12, RFS82 RFS11, RFS7, RFS8, RFS8, RFS102a, RFS41, RFS52a, RFS85p, RFS88, RFS99, RFS1a, RFS6a, RFS14p, RFS15, RFS49p, RFS59a, RFS60, RFS64a, RFS68p, RFS81a, RFS81b, RFS84 RFS94	LILBURN et al. (1999)
<i>Coptotermes formosanus</i>	CFS	CFS4p, CFS6, CFS124, CFS5p, CFS7p, CFS156p, CFS121, CFS2p, CFS3p, CFS110p, CFS113p, CFS118p, CFS122p, CFS143p, CFS145p, CFS149p, CFS 155p, CFS163p, CFS167p, CFS170p, CFS178p, CFS188p, CFS195p, CFS199p	LILBURN et al. (1999)
<i>Zootermopsis angusticollis</i>	ZAS	ZAS1, ZAS89	LILBURN et al. (1999)
<i>Reticulitermes speratus</i> +	UN		OHKUMA und KUDO (1996)
<i>Reticulitermes flaviceps</i>	RFS	UN21=RFS3, UN 2=RFS9, UN100=RFS12, UN90=RFS99	LILBURN et al. (1999)
<i>Pericapritermes nitobei</i>		Pn Pn69, Pn37, Pn19, Pn16, Pn58, Pn64, Pn11, Pn56	OHKUMA et al. (1999)
<i>Nasutitermes takasagoensis</i>	Nt	Nt63, Nt59, Nt25, Nt17, Nt12, Nt1, Nt36, Nt2, Nt43	"
<i>Glyptotermes fuscus</i>	Gf	Gf50, Gf35, Gf28, Gf30, Gf22, Gf24	OHKUMA et al. (1999)
<i>Hodotermopsis sjoestedti</i>	Hs	Hs71, Hs22, Hs27, Hs26, Hs32, Hs23, Hs33	"
<i>Cryptotermes domesticus</i>	Cd	Cd3, Cd46, Cd48	OHKUMA und KUDO (1998)

Tabelle 1 Fortsetzung.

Termitenspezies	Klon-Prefix	Phylotypen	Referenz
<i>Reticulitermes speratus</i>	UN	UN1, UN96, UN114	OHKUMA und KUDO (1996)
<i>Nasutitermes lujae</i>		NL NL1	PASTER et al. (1996)
<i>Mastotermes darwiniensis</i>	MDS	MDS1, MDSsp5-9, MDSsp5-18, MDSsp40-2, MDSsp40-7, MDSsp40-8, MDSsp40-11, MDSsp40-12, MDSmpsp15	BERCHTOLD et al. (1994) BERCHTOLD und KÖNIG (1996)

2.3.2 Pathogene *Treponema*-Spezies

2.3.2.1 *Treponema pallidum*

Neben dem überwiegend physiologischem Vorkommen von Treponemen im Verdauungstrakt verschiedener Spezies sind diese Bakterien auch bei krankhaften Veränderungen in großer Zahl und in hoher Diversität zu finden.

Die Bedeutung solcher Infektionskrankheiten ist v.a. beim Menschen gut bekannt. Die Treponematosen des Menschen werden eingeteilt in die Syphilis, eine venerische Erkrankung, und in die endemische Treponematosen. Die endemischen Treponematosen verursachen die Frambösie, die endemische, nicht-venerische Syphilis und die Pinta. Von den endemischen Treponematosen sind vor allem Kinder unter 15 Jahren betroffen (ANTAL et al., 2002).

Lange bekannt ist *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* als ätiologisches Agens der Syphilis. Eine chronische Infektionskrankheit, die sowohl durch Geschlechtskontakt als auch infolge von Bluttransfusionen, Verletzungen und über die Plazenta übertragen werden kann [<http://www.gesundheit.de/roche/>]. Im Gegensatz zu den endemischen Treponematosen können hierbei praktische alle Organsysteme in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium befallen werden. Übertragen werden die endemischen Treponematosen durch direkten Hautkontakt in der Kindheit.

Der Erreger der Frambösie ist *T. pallidum* ssp. *pertenue*. Die Erkrankung kommt vor allem in Regenwaldgebieten mit hoher Feuchtigkeit vor und betrifft die ländliche Bevölkerung. Voraussetzung für die Frambösie sind offensichtlich diese klimatischen Bedingungen. Das Krankheitsbild ist v.a. durch Veränderungen an Haut, Schleimhäuten und Knochen gekennzeichnet.

T. pallidum ssp. *endemicum* ist der Erreger der endemischen Syphilis, auch als „Bejel“ bezeichnet. Der Erreger kommt in trockenen und heißen als auch in gemäßigten Klimazonen in Nordeuropa, auf dem Balkan, in Russland, in der Mongolei, im Nahen Osten, dem östlichen Mittelmeerraum, Südafrika und unter den Nomaden Nordafrikas vor. Dieses Krankheitsbild äußert sich in typischen Läsionen der Haut, der Schleimhäute, vor allem an Mund und Lippen. Wie bei der Frambösie sind auch die Knochen betroffen, und zwar die langen Röhren- und Handknochen, an denen sich eine Periostitis ausbilden kann.

Die Pinta, eine in Mittelamerika beheimatete Erkrankung, wird durch die Spezies *Treponema carateum* hervorgerufen und manifestiert sich hierbei ausschließlich an der Haut. Der genaue Übertragungsweg ist nicht bekannt, aber es wird vermutet, dass die Ansteckung über direkten Hautkontakt geschieht (ANTAL et al., 2002).

Derzeit lassen sich endemische Treponematosen von der venerealen Syphilis nur mit Hilfe epidemiologischer Charakteristika und der klinischen Manifestationen unterscheiden. Morphologisch, immunologisch und serologisch lassen sich diese Krankheiten nicht voneinander differenzieren. Unterschiede von einer Base im *tpF1*-Gen (NOORDHOEK et al., 1989) können zur Differenzierung zwischen *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* und *Treponema pallidum* ssp. *pertenue* genutzt werden. Durch Austausch eines Basenpaares in der 5'-Region des *tp15* Genes lassen sich *Pallidum*-Stämme von Nicht-*Pallidum*-Stämmen mit Hilfe einer Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus - Analyse unterscheiden (CENTURION-LARA et al., 1998). Auch zeigen *Pallidum*-Stämme und Nicht-*Pallidum*-Stämme genetische Unterschiede im *gpd* und im *tp92*-Gen (CAMERON et al., 1999; CAMERON et al., 2000).

2.3.2.2 *Treponema paraluisuniculi*

8 Jahre nach der Entdeckung von *Treponema pallidum* berichtete BAYON (1913) über das Vorkommen von Treponemen bei einer Penisläsion eines Kaninchens. NOGUCHI (1922) schlug als Bezeichnung *Treponema cuniculi* vor und später wurde diese Spezies als *Treponema paraluisuniculi* bezeichnet, welche beim Kaninchen Läsionen hervorruft, die meist auf Vulva oder Präputialhaut begrenzt bleiben (CUNLIFFE-BEAMER und FOX, 1981).

Nicht nur bei Kaninchen (*Lepus* sp.) wurde über das Vorkommen von Treponemen berichtet, sondern auch bei Hasen (*Oryctolagus* sp.) wurden diese Bakterien schon früh vermutet (BOLLINGER, 1874). So konnten HORVATH et al. (1980) bei Hasen serologisch Treponemen nachweisen und vermuteten, dass ebenfalls *Treponema paraluisuniculi* oder ein

nahe verwandter Vertreter als Erreger in Frage kommen könnte. LUMEIJ (1994) berichtete über *Treponema*-Infektionen bei Hasen in den Niederlanden und bezeichnete diese Vertreter als *Treponema paraluislepori*, in Analogie zu *Treponema paraluisuniculi*, da eine natürliche Infektion der Hasen mit diesem Erreger vermutet wurde und es nicht klar war, ob dieser Erreger identisch mit *Treponema paraluisuniculi* war oder es sich um einen speziesspezifischen Erreger der Hasen handelte. Tatsächlich ist in der derzeit gültigen „List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature“ nur *Treponema paraluisuniculi* als eigene Spezies aufgeführt [<http://www.bacterio.cict.fr/t/treponema.html>].

2.3.2.3 Orale *Treponema* spp.

Neben den beschriebenen Treponematosen spielen Treponemen auch eine große Rolle bei Erkrankungen der Mundhöhle. Wie im Darm kommen sie in diesem Habitat ebenfalls in großer Diversität vor. Spirochäten in Plaquematerial von Patienten mit akuter nekrotisierender ulzerativer Gingivitis und chronischer adulter Periodontitis können bis zu 50 % der Gesamtflora ausmachen (ARMITAGE et al., 1982). Fast alle bisher vorkommenden oralen Spirochäten gehören dem Genus *Treponema* an (PASTER et al., 1998; CHAN und MCLAUGHLIN, 2000).

RIVIÈRE et al. (1991) berichtete über „pathogen-related oral spirochetes“ (PROS). PROS sind unbekannte orale Spirochäten, die in Form und Größe anderen kultivierbaren oralen Spirochäten sowie *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* ähneln und mit monoklonalen Antikörpern gegen *Treponema pallidum* ssp. und *Treponema pertenuis* kreuzreagieren. Diese PROS konnten in Plaquematerial (RIVIÈRE et al., 1991) sowie auch in Gewebeproben von Patienten mit akuter nekrotisierender ulzerativer Gingivitis anhand von kreuzreagierenden Antikörper nachgewiesen werden. Aufgrund einer phylogenetischen Analyse von „pathogen-related oral spirochetes“ schlussfolgerten CHOI et al. (1996), dass PROS eine heterogene Treponemen-Gruppe darstellen, die sich verwandtschaftlich um *Treponema vincentii* clustert. CHOI et al (1994) konnte aus Plaquematerial von einem Patienten mit schwerer destruktiver Periodontitis insgesamt 74 Klone mit Hilfe der 16S rRNA-Analyse identifizieren, die spirochätale Sequenzen enthielten. Ausgehend von einer über 98%igen Ähnlichkeit konnten diese 74 Klone in 23 verschiedene Cluster eingeteilt werden. Ein Cluster war verwandt mit dem Genus *Leptospira*, während die übrigen 22 Cluster alle dem Genus *Treponema* zugeordnet werden konnten. Bei einer Sequenzähnlichkeit von 92% konnten diese 22 neuen Spezies in die 7 verschiedenen Phylotypen TRE I-VII zusammengefasst werden, für welche entsprechende gruppenspezifische Oligonukleotidsonden konstruiert wurden. Mit Hilfe der

16S rRNA-Analyse konnten somit annähernd 20 neue, bis dato nicht-kultivierbare orale *Treponema*-Spezies identifiziert werden.

Weitere Untersuchungen von MOTER et al. (1998) bei Patienten mit rasch fortschreitender Periodontitis (RPP) zum Vorkommen der genannten Phylotypgruppen mittels kulturunabhängiger Methoden zeigten ebenfalls eine starke Diversität oraler Treponemen. Mittels 16S rRNA-Oligonukleotidsonden, spezifisch für die Phylotypgruppen I-VII sowie spezies-spezifischer DNA-Sonden für *T. vincentii*, *T. denticola*, *T. maltophilum*, *T. socranskii* und *T. pectinovorum* konnten alle Phylotypgruppen (TRE I-VII) in unterschiedlicher Häufigkeit nachgewiesen werden. Beim direkten Vergleich der Nachweishäufigkeit von TRE I mit der spezies-spezifischen Sonde TVIN für *T. vincentii* als kultivierbarem Vertreter dieser Phylotypgruppe zeigte sich, dass TRE I in über 80% der Proben nachweisbar war, während TVIN nur in ca. 9% der Proben positive Ergebnisse brachte. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei der Phylotypgruppe TRE II und der Spezies *T. denticola* als repräsentativem Vertreter dieser Phylotypgruppe bzw. bei der Gruppe TRE IV und *T. maltophilum*. Es wird deutlich, dass kultivierbare Erreger nur einen Bruchteil der genannten Gruppen ausmachen.

Die enorme Diversität oraler Treponemen wurde auch durch DEWHIRST et al. (2000) belegt. Von 11 verschiedenen Patienten mit unterschiedlichen periodontalen Erkrankungen wurden insgesamt 542 Klone sequenzanalysiert, die anhand ihrer 16S rDNA-Sequenzen bei einer Sequenzhomologie in 57 Cluster unterteilt wurden. Fasst man die Untersuchungen von DEWHIRST et al. (2000) und CHOI et al. (1994) zur Diversität von Treponemen zusammen, so existieren mindestens 57 verschiedene *Treponema*-Spezies in Zahntaschen von Menschen mit periodontalen Erkrankungen, von denen nur ein geringer Anteil kultivierbar ist.

Die Diversität oraler Treponemen spiegelt sich nicht nur in dem Auffinden immer repräsentativer neuer Klonsequenzen wider, sondern auch in der Kultivierung und Charakterisierung immer neuer *Treponema*-Spezies. So konnten in der Vergangenheit bereits folgende *Treponema*-Spezies isoliert und identifiziert werden: *Treponema denticola* (CHAN et al., 1993), *Treponema pectinovorum* (SMIBERT und BURMEISTER, 1983), *Treponema socranskii* inklusive seiner 3 Subspezies (SMIBERT et al., 1984) sowie *Treponema vincentii* (SMIBERT, 1984).

Zusätzlich konnten in der letzten Zeit durch verbesserte Methoden in der Kultivierung weitere Spezies aus der menschlichen Mundhöhle identifiziert werden. So konnte WYSS et al. (1996) die neue Spezies *Treponema maltophilum* unter Verwendung des Limit-dilution-Verfahrens und dem Einsatz von OMIZ-Pat-Mediums identifizieren und charakterisieren (WYSS, 1992). *Treponema medium* wurde aus subgingivalem Plaque adulter Patienten angezüchtet und

typisiert. Weitere bis dahin unbekannte *Treponema*-Spezies, die aus Läsionen der Mundhöhle humaner Patienten erstmals kultiviert und charakterisiert werden konnten, waren die Spezies *Treponema amylovorum*, *Treponema parvum* sowie *Treponema lecithinolyticum* (WYSS et al., 1997; WYSS et al., 1999; WYSS et al., 2001).

2.3.2.4 Dermatitis digitalis (DD) assoziierte Treponema-spp.

Die Dermatitis digitalis ist eine lokale chronische Infektionskrankheit, die meist an der Hinterklaue oberhalb des Interdigitalspaltes auftritt. Seitdem die Erkrankung erstmals von CHELI und MORTELLARO (1974) beschrieben wurde, erlangte sie weltweit zunehmende Bedeutung in der intensiven Rinderhaltung. Inzwischen liegen Berichte über die DD aus mehreren europäischen Ländern, aus Japan und aus Nordamerika vor (REBHUHN et al., 1980; BLOWEY und SHARP, 1988; GOURREAU et al., 1992; KIMURA et al., 1993). Für diese entzündliche Veränderung im Bereich der Klaue wurden neben dem Begriff Dermatitis digitalis eine Reihe weiterer Bezeichnungen verwendet, wie interdigitale Papillomatose, papillomatöse digitale Dermatitis sowie verrukröse Dermatitis (WALKER et al., 1995). Untersuchungen zur Prävalenz wurden jedoch kaum publiziert. In Norddeutschland ergaben Untersuchungen eine durchschnittliche Prävalenz von 12,5 %. (METZNER et al., 1995).

Die typischen Veränderungen zeigen sich in der Fesselbeuge der Klaue am Übergang der behaarten zur unbehaarten Haut als umschriebene Hautulzerationen. Diese sind häufig mit einem gelb-grauen und schmierigen Belag bedeckt, unter welchem eine rauhe, stark gerötete Oberfläche („Erdbeeren-ähnlich“) zum Vorschein kommt, hervorgerufen durch ein stark durchblutetes Granulationsgewebe. Weitergehende Verlaufsformen breiten sich vom Kronsaum in Richtung Klauenhorn aus und führen zur Unterminierung der Hornauflage, einem Vorgang, der im schlimmsten Fall zur Exungulation führen kann (KÜHN, 1996). Histologisch zeigt sich eine akute suppurative Entzündung der Epidermis mit oberflächlicher Nekrose und Hyperkeratose (REBHUHN et al., 1980). Neben Mikroabszessen liegt eine Infiltration neutrophiler Granulozyten und mononukleärer Zellen vor (BASSETT et al., 1990). Klinisch wird die DD in 4 verschiedene Stadien eingeteilt (DÖPFER, 1994). Stufe 1 ist eine sehr frühe Veränderung mit einer umschriebenen granulomatösen Veränderung, Stufe 2 stellt die klassische ulzerative Veränderung dar, während Stufe 3 die klassische Veränderung in der Abheilungsphase beinhaltet. Stufe 4 ist eine Veränderung der Haut in Form hyperkeratotischer und proliferativer Prozesse. Die DD hat für die betroffenen Betriebe große wirtschaftliche Einbußen zur Folge. Die erkrankten Tiere zeigen eine starke Lahmheit und häufig ein gestörtes Allgemeinbefinden. Die wirtschaftlichen Verluste kommen durch einem

Rückgang der Milchleistung, eine Reduzierung der Körpergewichtszunahmen, Fertilitätsstörungen und nicht zuletzt durch die anfallenden Behandlungskosten zustande (NUTER und MOFFIT, 1990).

Die Ursache dieser Erkrankung war lange Zeit unbekannt, aber der wirksame Einsatz von Antiinfektiva wie Oxytetracyclin oder Clindamycin wiesen auf eine bakterielle Ursache hin, obwohl Infektionsversuche mit einem Homogenisat per injectionem erfolglos blieben (REBHURN et al., 1980; BASSETT et al., 1990; READ et al., 1992). Diese Infektionsversuche erfolgten aber jeweils nur an einem Tier, so dass nur eine sehr eingeschränkte Aussage über die infektiöse Ätiologie getroffen werden konnte. Im Zusammenhang mit der DD werden folgende anaerobe Erreger in der bakteriologischen Diagnostik regelmäßig nachgewiesen (NATTERMANN et al., 1998): *Porphyromonas (P.) levii*, *Fusobacterium (F) necrophorum*, nicht-pigmentierte gramnegative sporenlöse Anaerobier, *Prevotella (P.) denticola*, *P. oralis*, *P. bivia*, mikroaerophile gramnegative Stäbchen, anaerobe grampositive Kokken, *F. nucleatum*, sowie *P. intermedia*. Neben diesen anaeroben Vertretern wurden als weitere Pathogene *Treponema*-Spezies vermutet und in Probenmaterialien von erkrankten Kühen nachgewiesen (GRUND et al., 1995).

BLOWEY und SHARP (1988) konnten in Gram-Färbungen von oberflächlichen Geschabseln Spirochäten-ähnliche Bakterien feststellen und später anhand von Warthin-Silber-Färbungen an denselben Biopäten auch in tieferen Gewebsschichten (BLOWEY et al., 1994). Diese Ergebnisse wurden später auch von READ et al. (1992) bestätigt, die große Mengen von Spirochaeten histologisch im Stratum spinosum sowie Stratum papillare zeigen konnten. Auch elektronenmikroskopische Untersuchungen von GRUND et al. (1995) an DD-verändertem Gewebe belegten ein massives Vorkommen von Spirochäten-ähnlichen Bakterien, die mit den Gewebeläsionen assoziiert waren. Die Art der Beweglichkeit, die Anordnung periplasmatischer Geißelpaare, der Cytoplasmamembran-assoziierte Fibrillenmantel, der unregelmäßige Windungsgrad und die Sauerstoffintoleranz sprachen für eine Zugehörigkeit zum Genus *Treponema*. WALKER et al. (1995) gelang die Anzucht von 7 Isolaten aus DD-Material sowie 1 Isolat aus Dermatitis interdigitalis-Material, die anhand der Morphologie, dem Enzymmuster und mit Hilfe von Immunoblot-Ergebnissen dem Genus *Treponema* zugeordnet werden konnten. Eine genaue taxonomische Eingruppierung dieser Isolate blieb aufgrund fehlender 16S rRNA-Analyse aus.

In der Folgezeit ergaben weitergehende Untersuchungen, dass offensichtlich ein Zusammenhang zwischen dem Spirochäten-Morphotyp und der Lokalisation im veränderten Gewebe besteht. DÖPFER et al. (1997) erkannten drei verschiedene spirochätale Morphotypen (S1-

S3). In der klinischen Stufe 1 der Erkrankung dominierten im Stratum basale zunächst Spirochäten vom Typ S2 mit einer langen, schlanken Zellmorphologie, einer geringen Anzahl von Windungen und einer mittleren Vitalität. Daneben kamen in Nachbarschaft zu degenerierten Epithelzellen kurze dicke Spirochäten vom Typ S3 vor, die degenerierte Bakterienzellen darstellten. Kurze dicke, sehr vitale Spirochäten mit vielen Windungen vom Typ S1 penetrierten das Gewebe bis zum Stratum spinosum in Stufe 2 und überwogen in Anzahl deutlich die Typ S2-Spirochäten. Hingegen kamen in Stufe 4 Typ S3-Formen in Haufen vor, während S1 und S2-Typen das Stratum basale erreichten. Diese Beschreibungen müssen jedoch sehr zurückhaltend interpretiert werden, da die Morphologie von Spirochäten in Abhängigkeit vom Umgebungsstress stark schwankt. Aus diesen Gründen war die Anwendung molekularer, kulturunabhängiger Techniken zwingend notwendig. So entwickelte z.B. RIJPKEMA et al. (1997) eine Polymerase-Kettenreaktion zum Nachweis von 16S rDNA-Teilfragmenten. Die Analysen an DD-verändertem Material zeigten die größte Ähnlichkeit zu *Treponema denticola*. Auch COLLIGHAN und WOODWARD (1997) bestätigten das Vorkommen von *Treponema denticola*-verwandten Treponemen bei DD-erkrankten Kühen in Großbritannien. Eine unter Verwendung der fast vollständigen 16S rDNA (ca. 1.500 bp) generierte Genbank belegte, dass die meisten Sequenzen zu 98% mit *Treponema denticola* verwandt waren.

Nachfolgende Untersuchungen zur Diversität DD-assoziiertes Treponemen machten jedoch deutlich, dass neben *T. denticola* und *T. denticola*-ähnlichen Treponemen noch eine Vielzahl von Treponemen-Gruppen in DD-Läsionen vorkommen. CHOI et al. (1997) wies in DNA-Pools aus lediglich 4 DD-Bioptaten bei 20 zufällig ausgesuchten 16S rRNA-Klonen 5 verschiedene Phylotypen nach. Der Phylotyp DDKL-4 war zu 99,4% identisch mit *Treponema phagedenis*, einem apathogenen humanen Vertreter. Phylotyp DDKL-3 und DDKL-13 wiederum zeigten eine hohe Verwandtschaft mit oralen Treponemen. So war DDKL-3 mit 9 Klonen am stärksten vertreten und hatte mit *Treponema denticola* eine 95%ige Verwandtschaft. Allerdings belegten Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierungen an Geschabseln dieser Biopate, dass *T. denticola*-ähnliche Treponemen tatsächlich den größten Anteil der Treponemen ausmachten. DDKL-13 dagegen war mit *Treponema vincentii* zu 98% ähnlich. Die Phylotypen DDKL-12 und DDKL-20 zeigten kaum nennenswerte Verwandtschaftsgrade zu bekannten Treponemen, lediglich zu oralen Treponemen der Gruppe IV (CHOI et al., 1994).

Diese Daten waren Anlass, das Vorkommen von Spirochäten in DD-Proben näher zu untersuchen. DEMIRKAN et al. (1998) untersuchten insgesamt 85 erkrankte Kühe, wobei mit

einer Silberfärbung an 19 Biopaten immer ein massives Vorkommen von Spirochaeten in der Epidermis nachgewiesen werden konnte. Immunhistochemische Untersuchungen an 10 Biopaten mit einem polyklonalen Antikörper gegen *Borrelia burgdorferi* zeigten ebenso wie mit monoklonalen Antikörpern gegen *Treponema denticola* und *Treponema vincentii* spiralförmige Mikroorganismen, die vor allem in der Epidermis lokalisiert waren. Unter Verwendung einer Polymerase-Kettenreaktion mit spezifischen Primern gegen *Treponema denticola* und ähnlich-verwandten *Treponema* spp. wiederum reagierten 70 von insgesamt 85 Proben positiv (RIJPKEMA et al., 1997). Mit Hilfe einer immunomagnetischen Separation unter Verwendung von polyklonalen anti-*T. denticola*- und anti-*T. vincentii*-Antikörpern gelang die Isolierung einer Treponeme, die vorläufig als *T. denticola* eingeordnet wurde (DEMIRKAN et al., 1998).

Auch SCHRANK et al. (1999) gelang die Isolierung einer bis dato unbekanntes *Treponema*-Spezies aus DD-Biopaten. Morphologisch ähnlich dem Isolat 1-9185MED besitzt *Treponema brennaborensis* 2 Endflagellen, unterscheidet sich aber deutlich hinsichtlich des Enzymmusters von diesem Isolat, genauso wie von jenen 7 Isolaten, die aus PDD-Proben angezüchtet werden konnten (WALKER et al., 1995). *Treponema brennaborensis* weist phylogenetisch die größte Verwandtschaft zu der Phylotypgruppe TRE IV auf und besitzt eine 89,5%-ige Homologie der 16S rDNA zu *Treponema maltophilum*. Die Isolierung einer neuartigen *Treponema*-Spezies, die sich deutlich von den bis daher bekannten Spezies und Isolaten unterschied, ist ein weiterer Beleg für die relativ große Diversität von Treponemen bei der DD und zeigt, dass die gesamte Diversität noch nicht komplett erfasst ist, zumal auch in der von CHOI et al. (1997) angelegten 16S rDNA-Genbank von DD-Biopaten keine *Treponema brennaborensis*-ähnlichen Klonsequenzen vorhanden waren.

Weiterhin gelang SCHRANK (2000) in DD-Biopaten mittels DNA-DNA-Hybridisierung an einer generierten 16S rDNA-Genbank der Nachweis der Phylotypen DDKL-4 und DDKL-12. Unter Verwendung gruppenspezifischer Sonden konnte zudem der Nachweis der Phylotypen TRE II sowie TRE IV erbracht werden.

Einen entscheidenden Beitrag zur Visualisierung dieser hohen Treponemen-Diversität in DD-erkranktem Gewebe leistete MOTER et al. (1998) durch die Anwendung Phylotypspezifischer Oligonukleotidsonden in der Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH). Unter Verwendung der *Treponema*-spezifischen Sonden TRE I, II, IV und DDK 4 konnte die Verteilung der verschiedenen Gruppen innerhalb des Gewebes nachgewiesen werden, womit die rein morphologischen Beobachtungen von DÖPFER et al. (1997) prinzipiell bestätigt wurden. Während *Treponema denticola* als Vertreter der Gruppe TRE II als mitverantwortlich

für Periodontitiden gilt, konnten mittels FISH TRE II-Treponemen nur in oberflächlichen Epidermisschichten und im Detritus detektiert werden. Dies spricht gegen eine ursächliche Beteiligung dieser Treponemen an der Pathogenese der DD. In tieferen Gewebeschichten konnten dagegen die Gruppen TRE I, IV, und DDKL-4 detektiert werden, was für eine stärkere Beteiligung der entsprechenden Bakterien spricht (MOTER et al., 1998).

Neben dem Vorkommen von Treponemen bei Rindern mit DD konnten Treponemen auch beim Schaf isoliert und charakterisiert werden, die an einer schwer verlaufenden Form der Moderhinke (severe virulent ovine foot rot, SVFOR) erkrankt waren. Bei diesen Tieren gelang die Anzucht des ansonsten ätiologisch relevanten Keimes *Dichelobacter nodosus* nicht, jedoch war eine große Anzahl von Spirochaeten mikroskopisch sichtbar (NAYLOR et al., 1998; DEMIRKAN et al., 2001). NAYLOR et al. (1998) gelang sogar die Isolierung einer Spirochäte bei einem an SVFOR erkranktem Schaf. Dieses Isolat wies die höchste Ähnlichkeit (99%) zum humanen Klon *Treponema* sp. I:B:C7 auf (COLLIGHAN et al., 2000). Nach der Phylotypgruppierung nach CHOI et al. (1994) ist dieser Klon der Phylotypgruppe TRE I zugehörig sowie dem DD-assoziierten Phylotyp DDKL-13. Auch DEMIRKAN et al. (2001) berichtete über ein neues *Treponema*-Isolat bei SVFOR. Dieses Isolat hatte eine 98%ige Ähnlichkeit zum bovinen Isolat 1-185MED, während seine 16S rDNA-Sequenz nur zu 90,5% mit dem ovinen Isolat von NAYLOR et al. (1998) übereinstimmte, und es zudem auch morphologisch und biochemisch deutlich unterscheidbar war (WALKER et al., 1995). So konnten also bis dato 2 verschiedene *Treponema*-Isolate beim Schaf isoliert werden, deren pathogene Rolle im Rahmen der SVFOR noch abgeklärt werden muss.

Ein weiteres Habitat von Treponemen beim Tier ist in Analogie zum Vorkommen beim Menschen die Mundhöhle von Hund und Katze, wo Spirochaeten insbesondere im Zusammenhang mit Entzündungen der Gingiva bzw. des Periodontiums in großer Anzahl vorkommen. Bei Hunden mit Gingivitiden sind Spirochäten mit einer Prävalenz von bis zu 67% zu beobachten (KRASSE und BRILL, 1960). Bei Untersuchungen von subgingivalem Plaque-material konnten Spirochäten zusammen mit fusiformen Bakterien in 52% der Fälle aufgezeigt werden. Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten SOAMES und DAVIS (1974) die Verteilungen von Spirochäten in Probenmaterial aus Zahntaschen bei einem Beagle aufzeigen. Im Bereich der Oberfläche waren vor allem filamentöse Bakterien zu finden, im Anschluss daran apikal eine schmale Zone gramnegativer filamentöser Keime, unter der Spirochäten zusammen mit gramnegativen Bakterien vorlagen. Das Vorkommen von Spirochäten in der Maulhöhle ist abhängig von der Lokalisation und dem Vorliegen von

Gingivitiden oder Periodontitiden (SVANBERG et al., 1982). Generell können Spirochäten in supragingivalem Plaquematerial unabhängig vom Krankheitsstatus sowie im subgingivalen Plaque nachgewiesen werden, wo deren Anzahl sich beim Vorliegen von Periodontitiden stark erhöhen kann.

Deshalb wird ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Spirochäten und Entzündungen im Bereich der Maulhöhle angenommen (HENNET und HARVEY, 1991). Diese Annahme wird auch durch Beobachtungen von MIKX und VANCAMPEN (1982) gestützt, die als offensichtlichen Unterschied zwischen Hunden mit nekrotisierender ulzerativer Gingivitis (NUG) und NUG-freien Hunden das Fehlen von Spirochäten bei den gesunden Hunden ausmachten. Eine nähere Unterscheidung zwischen den bei Hunden im Plaquematerial vorkommenden Spirochäten konnte RIVIERE et al. (1996) machen, der mittels spezifischer monoklonaler Antikörper erstmalig *Treponema denticola*, *Treponema socranskii* und „pathogen-related oral spirochetes“ (PROS) in Plaquematerial von Hunden nachweisen konnte. Die Nachweisrate der genannten Treponemen war dabei signifikant höher bei Hunden mit periodontalen Taschen als bei solchen mit einem gesundem periodontalen Status.

Weitere Untersuchungen an Plaquematerial von Hunden und Katzen zeigten, dass viele Bakterien, die beim Menschen mit periodontalen Erkrankungen assoziiert sind, bei diesen Tieren ebenfalls vorkommen. Mittels kultureller Verfahren wurden verschiedene *Treponema*-Spezies isoliert, und deren Spezieszugehörigkeit später mit PCR vorläufig bestimmt. In Plaquematerial von Hunden wurde *T. denticola*, *T. socranskii*, *T. vincentii*, *T. maltophilum*, *T. medium* und *T. pectinovorum* detektiert, der Nachweis von *T. amylovorum* dagegen verlief negativ. Bei Katzen kamen *T. socranskii* und *T. maltophilum* vor, der Nachweis von *T. denticola*, *T. vincentii*, *T. medium* oder *T. amylovorum* verlief negativ (VALDEZ et al., 2000). Generell ist zu beachten, dass nicht alle vorkommenden und anerkannten Spezies entsprechend den gültigen Nomenklaturregeln beschrieben und publiziert wurden. In unten aufgeführter Tabelle sind daher nur diejenigen kultivierbaren *Treponema* spp. aufgelistet, die entsprechend den gültigen Nomenklaturregeln publiziert wurden und von daher sowohl in der jeweils gültigen Fassung der „List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature“ aufgeführt sind (<http://www.bacterio.cict.fr/t/treponema.html>), als auch im Taxonomiebrowser des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) vermerkt sind (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=157>).

Demzufolge liegt zum Beispiel für die anerkannte Spezies *Treponema vincentii* eigentlich keine gültige Speziesbeschreibung vor, auch wenn dieser Vertreter als eigene Spezies in vielen Publikationen aufgeführt und anerkannt ist (CHAN und MCLAUGHLIN, 2000).

Tabelle 2: Auswahl gültig publizierter kultivierbarer oraler und beim Tier vorkommender *Treponema*-spp. (Stand Juni 2003)

Habitat der Erstisolierung	Bedeutung als Pathogen	Spezies
Mundhöhle	periodontale	<i>T. medium</i>
- Mensch	Erkrankungen	<i>T. denticola</i>
		<i>T. lecithinolyticum</i>
		<i>T. maltophilum</i>
		<i>T. amylovorum</i>
		<i>T. parvum</i>
		<i>T. pectinovorum</i>
		<i>T. socranskii</i>
Klaue	Dermatitis digitalis	<i>T. brennaborensis</i>
- Rind		
Urogenitaltrakt		
- Kaninchen	Kaninchensyphilis	<i>T. paraluisuniculi</i>
Magen-Darm-Trakt		
- Schwein	keine	<i>T. succinifaciens</i>
- Rind	keine	<i>T. bryantii</i>
		<i>T. saccharophilum</i>

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass die Spezies *Treponema* eine enorm ausgeprägte Diversität besitzt, die nur mit Hilfe kulturunabhängiger Analyseverfahren erfasst werden kann, da kultivierbare Vertreter nur einen geringen Anteil dieser Gattung darstellen. Diese Diversität spiegelt sich nicht nur im Vorkommen verschiedenster Phylotypen in ihren natürlichen Habitaten wieder, sondern auch im Vorkommen unterschiedlichster Vertreter im Rahmen von pathogenen Prozessen. So ist sicherlich davon auszugehen, dass die Speziesvielfalt und Bedeutung dieser Gattung noch nicht abzuschätzen ist.