

2. Literatur

2.1 Klinik der Dermatitis digitalis

Bei der Beschreibung des klinischen Bildes der DD dominieren lokale Veränderungen im palmaren bzw. plantaren Bereich der Haut proximal des Kronsaumes. Ein sich verschlechternder Allgemeinzustand der Rinder, der sich in Milchrückgang und Gewichtsverlusten äußerte, wurde ebenfalls von einigen Autoren berichtet (REBHUN et al., 1980; NUTTER u. MOFFIT, 1990; NATTERMANN u. JÄCKEL, 1994). REBHUN et al. (1980) stellten Gewichtsverluste bis hin zur Kachexie und erhebliche Leistungseinbußen in der Milchproduktion fest, die zwischen 20 und 50% lagen. GYÖRKÖS et al. (1998) und READ u. WALKER (1998) beobachteten, daß die Erkrankung am häufigsten im ersten Drittel der ersten bis dritten Laktation auftrat.

DD-Läsionen wurden meist an den Hintergliedmaßen von Rindern beobachtet. Zuweilen waren aber auch die Vordergliedmaßen befallen (CHELI u. MORTELLARO, 1974; MORTELLARO et al., 1985; METZNER et al., 1995). Nach Untersuchungen von REBHUN et al. (1980) traten bei 51 Tieren die Veränderungen der DD in 49 Fällen an der Hintergliedmaße und nur in 2 Fällen an den Vordergliedmaßen auf. Betroffen waren einzelne Gliedmaßen, Gliedmaßenpaare oder alle Extremitäten (MORTELLARO et al., 1985; WEAVER, 1991).

Die typischen Hautveränderungen lokalisierten CHELI u. MORTELLARO (1986) im Bereich des Kronsaumes am Übergang von der behaarten zur unbehaarten Haut des Interdigitalspaltes. Dagegen sahen BLOWEY u. SHARP (1988) als häufigste Lokalisation den Übergang von der Haut zum Ballenhorn an. Das gelegentliche Auftreten am lateralen Kronsaum wurde ebenfalls beschrieben (BLOWEY, 1990).

Die Hautläsionen variierten stark in ihrer Form, Ausdehnung und Lokalisation. Ihr Durchmesser schwankte zwischen 0,5-7 cm (REBHUN et al., 1980; MORTELLARO et al., 1985; BLOWEY u. SHARP, 1988; BRENTRUP u. ADAMS, 1990; READ u. WALKER, 1998). Die Ulzera befanden sich entweder im dorsalen Bereich der Klauen, im Interdigitalspalt oder im kaudalen Bereich oberhalb des Koronarsaumbandes (CORNELISSE et al., 1981; DÖPFER, 1994; OELKERS, 1996; SCHMITT, 1997). Im dorsalen Bereich des Kronsaumes waren die Veränderungen

selten anzutreffen (CHELI u. MORTELLARO, 1974; CORNELISSE et al., 1981; WEAVER, 1991; READ u. WALKER, 1998).

DÖPFER (1994) entwickelten in einer epidemiologischen Studie ein Klassifikationssystem auf der Basis des Ausprägungsgrades der Erkrankung und teilten die DD in vier unterschiedliche Stadien (M1-M4) ein.

Die Entzündungsherde der DD wurden als oberflächliche meist exudative, kreisrunde Ulcera mit einem weißen Epithelrand, einem Durchmesser von 1-2 cm und proliferativem Gewebe beschrieben. Das veränderte Gebiet war rot und sehr schmerzhaft (REBHUN et al., 1980; BLOWEY u. SHARP, 1988; BASSET et al., 1990; NATTERMANN u. JÄCKEL, 1994). Nicht selten nahm man bei DD-Läsionen einen typischen, übelriechenden Geruch wahr (MORTELLARO et al., 1985; BLOWEY u. SHARP, 1988; WEAVER, 1992; DÖPFER, 1994; SAUGVAGEAU et al., 1994), dessen Ursache im Zerfall von Keratin liegen könnte (BLOWEY et al., 1994). Die Ulzera waren meist haarlos und am Rand beobachtete man häufig ein Aufstellen der Haare (REBHUN et al., 1980; BLOWEY u. SHARP, 1988; BASSET et al., 1990; NATTERMANN u. JÄCKEL, 1994) (Abb. 1).

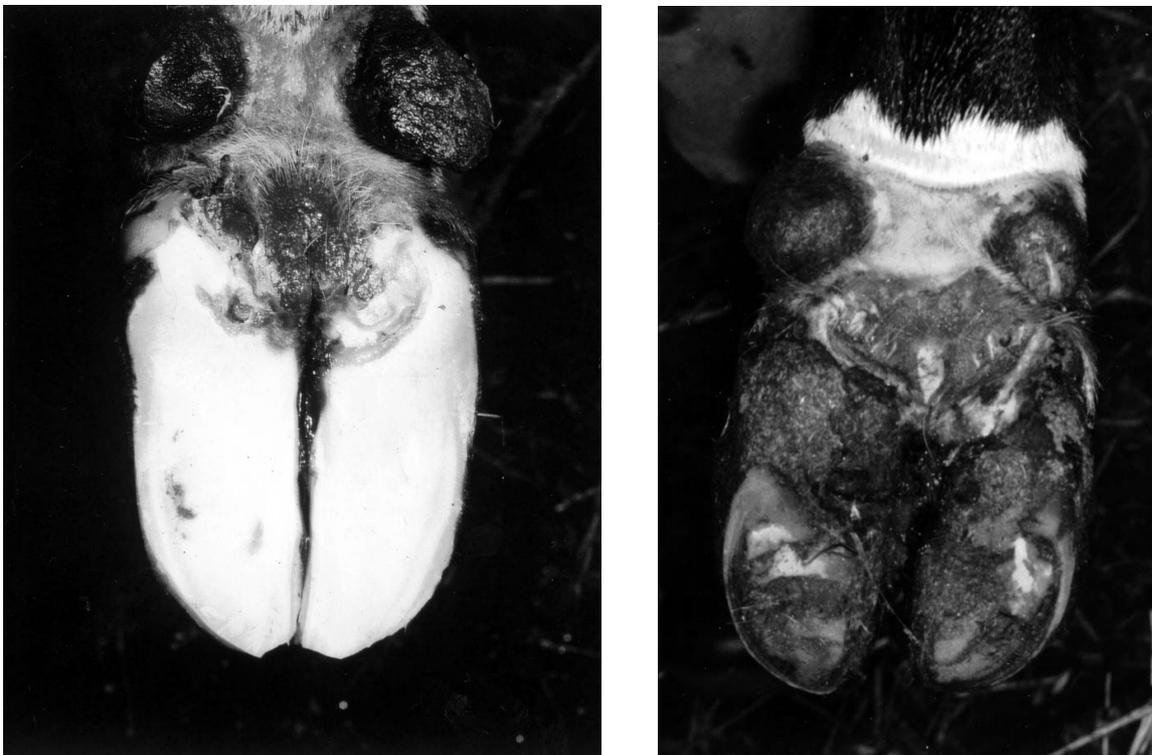


Abb. 1: Klinisches Bild der Dermatitis digitalis des Rindes (akutes Stadium).

Bei den DD-Ulzera handelte es sich meist um einen lokalen Prozeß, der auf den Bereich der Haut begrenzt war. Eine Anschwellung des umgebenen Gewebes war selten zu beobachten (BLOWEY u. SHARP, 1988; READ et al., 1992). In Ausnahmefällen traten ähnlich wie bei interdigitalen Phlegmonen Umfangsvermehrungen auf (CORNELISSE et al., 1981).

Der Ulcusgrund war mit einer Schicht von Zelldetritus und Schmutz bedeckt. Darunter befanden sich oft konkave, rote, granulierende oder glatte Oberflächen (PETERSE et al., 1982; MORTELLARO et al., 1985). SCHRANK u. GRUNER (1989) sowie BRENTRUP u. ADAMS (1990) bezeichneten diese granulierende Oberfläche als „erdbeerartig“. Die DD konnte Wochen und Monate lang bestehen, ohne daß tiefere Gewebeschichten mit einbezogen wurden (MORTELLARO et al., 1985; NATTERMANN u. JÄKEL, 1994).

Das klinische Bild der Läsionen war häufig durch eine hochgradige Lahmheit charakterisiert (CHELI u. MORTELLARO, 1974; BASSET et al., 1990; BLOWEY, 1990), welche sich über Wochen hinziehen konnte, ohne daß Veränderungen der Ulzera an der erkrankten Klaue sichtbar wurden (SCHRANK u. GRUNER, 1989). In den letzten Jahren hat sich das Bild dahingehend verändert, daß trotz Hautläsionen nicht in jedem Fall Lahmheiten auftraten (MORTELLARO et al., 1985; BASSET et al., 1990; SMITS et al., 1992; MORTELLARO, 1994; METZNER et al., 1995).

2.2 Vorkommen und allgemeine Charakterisierung von Bakterien der Gattung *Treponema*

Treponemen gehören zur Familie der *Spirochaetaceae*, die sich nach Bergey's Manuel of Determinative Bacteriology 1994 (HOLT et al., 1994) in acht Gattungen einteilen lassen: *Spirochaeta*, *Treponema*, *Borrelia*, *Brachyspira*, *Cristispira*, *Leptonema*, *Serpulina* und *Leptospira*. Die Diversität der Spirochätenhabitats spiegelt sich in ihrem weiten Spektrum der phänotypischen Variabilität wieder (JOHNSON, 1976; 1977; HOLT, 1978). Die meisten Spirochäten sind apathogen oder mutualistische Symbionten. Einige sind für Mensch und Tier pathogen. Aus veterinärmedizinischer Sicht sind die Gattungen *Borrelia*, *Leptospira*, *Serpulina*, *Treponema* (SMIBERT, 1986) sowie *Brachyspira* (OCHIAI et al., 1997) als Krankheitserreger von Bedeutung.

Treponemen wurden beim Menschen in oralen Kavitäten, im Magen-Darm-Trakt und im Genitalbereich gefunden (ROSEBURY, 1962; HANSON u. CANNEFAX, 1964; BOWDEN u. HARDIE, 1971). Bei Rindern, Schafen und Ziegen waren Treponemen im Pansen und im Intestinum anzutreffen, während sie bei Schweinen nur im Darmtrakt vorkamen (BRYANT, 1952; HARRIS et al., 1972; SMIBERT u. CLATERBAUGH, 1972). Auch im Magen-Darm-Trakt von Hunden waren Treponemen zu finden (LEACH et al., 1973). Im Rinderpansen wurden physiologisch verschiedene Spirochätenmorphotypen gefunden, die wahrscheinlich einen großen Anteil an der Verdauung des Pflanzenmaterials bei Wiederkäuern besaßen (PASTER u. CANALE-PAROLA, 1982). So wurde z. B. *Treponema (T.) bryantii* aus Pansensaft isoliert. STANTON u. CANALE-PAROLA (1980) stellten Interaktionen zwischen dieser Spirochätenart und der zytolytischen Spezies *Bacteroides succinogenes* fest.

Pathogenetisch wichtige Treponemen sind *Treponema (T.) pallidum*, der Erreger der Syphilis, *T. pallidum subsp. pertenue*, Erreger der Frambösie und *T. carateum*, der Erreger der Pinta beim Menschen. Keiner dieser pathogenen Treponemen konnte *in vitro* bisher angezchtet werden. Die Vermehrung erfolgte ausschließlich in Labortieren. Eine mögliche Assoziation zwischen Treponemen, die bei Parodontal- und Magendarm-Erkrankungen beim Menschen, beim Hund und anderen Tieren vorkommen, steht zur Diskussion.

Treponemen sind helikal gewundene, gramnegative, bewegliche Bakterien. Ihr Wachstum kann anaerob oder mikroaerophil sein. Sie besitzen eine Länge von 5-20 µm und einen Durchmesser von nur 0,1-0,4 µm (HOLT et al., 1994). Die Vermehrung erfolgt durch Querteilung (BURGDORFER et al., 1982). Die Beweglichkeit beruht nicht auf Geißeln, sondern auf dem Vorhandensein von kontraktilen Fibrillen oder Fibrillenbündeln (Endoflagellen), die den Zytoplasmazyylinder spiralig umschlingen (BROMLEY u. CHARON, 1979; PASTER u. CANALE-PAROLA, 1980). Die Bewegung der Treponemen entsteht durch Verbiegung, Streckung und Rotation. Im Flüssigmedium bewegen sie sich rotierend und translatierend, in halbfesten bzw. festen Medien dagegen schlängelnd. Die Spiralen können gleichmäßig bzw. ungleichmäßig gewunden sein (JOHNSON, 1986; SMIBERT, 1986).

Die Treponemen sind durch eine äußere Hülle, die den Protoplasmazyylinder umschließt, gekennzeichnet. Der Protoplasmazyylinder besteht aus einer Peptidoglykanschicht, der Zytoplasmamembran und dem eingeschlossenen Inhalt (Abb. 2). Als Zellorganellen sind meistens nur Ribosomen zu erkennen. Die Endoflagellen befinden sich im periplasmatischen Raum zwischen Außenhülle und Protoplasmazyylinder und inserieren subterminal an jedem Ende des Zylinders (Abb.3). Die Enden überlappen oftmals die Mitte und enden frei (SMIBERT, 1986). Der Insertionsapparat der Endoflagellen ähnelt dem der grampositiven Bakterien (BHARIER et al., 1971; HOVIND-HOUGEN, 1972).

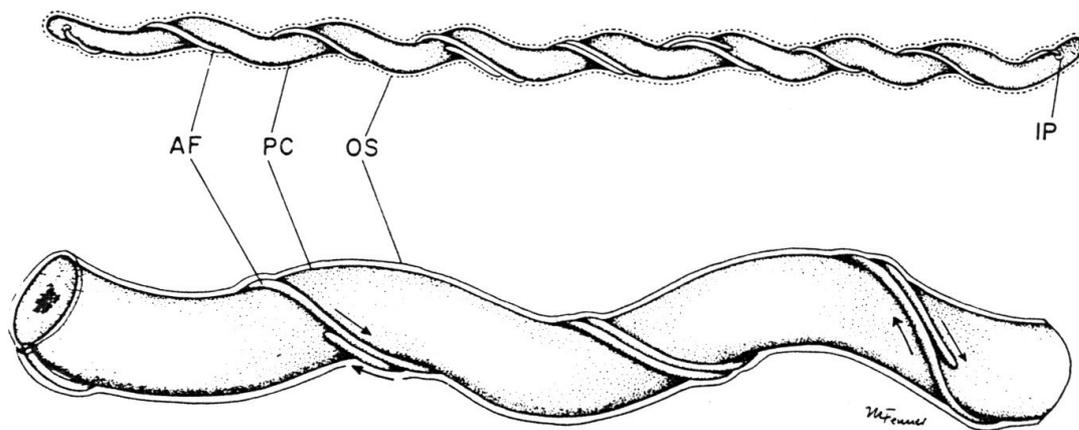


Abb. 2: Anatomischer Aufbau von Spirochäten mit den wichtigsten morphologischen Charakteristika (nach HOLT, 1978).

AF = Axialfibrillen (Endoflagellen); PC = Protoplasmazyylinder; OS = Äußere Membran; IP = Insertionspore der Axialfibrille (Endoflagelle)

Die Treponemen lassen sich nach folgenden Kriterien einordnen. Ihr G + C-Gehalt variiert von 36-66 mol % (JOHNSON, 1986). Bei der Unterscheidung und Einteilung spielen das Habitat und die Morphologie eine Rolle. Wichtig ist hierbei auch die Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika. Das Wachstum wird in unterschiedlichen Antibiotikakonzentrationen im Broth-Medium getestet (ABRAMSON u. SMIBERT, 1971).

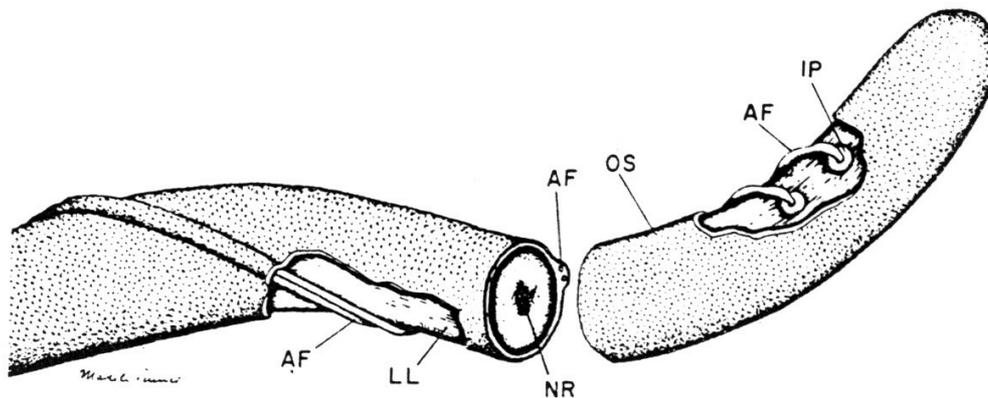


Abb. 3: Darstellung einer typischen Spirochäte. Die Endoflagellen befinden sich zwischen der Außenhülle und dem Protoplasmazyylinder und inserieren in der Insertionspore (nach HOLT, 1978).

AF = Axialfibrille (Endoflagelle); OS = Außenhülle; IP = Insertionspore;
LL = Lipoproteinschicht; NR = Nuklearregion

Die Treponemen werden nach ihrer Fähigkeit eingeteilt, ob sie Kohlenhydrate (z. B. *T. phagedenis*) oder Aminosäuren (z.B. *T. denticola* und *T. vincentii*) fermentieren (SMIBERT, 1986). Kultivierbare, anaerobe Treponemen sind Katalase und Oxidase negativ. Für ihr Wachstum benötigen einige Teponemen langkettige Fettsäuren, andere dagegen kurzkettige, flüchtige Fettsäuren. Verschiedene Treponemen (z. B. *T. denticola*, *T. vincentii*, *T. oralis* und *T. phagedenis*) benötigen zum Wachstum inaktiviertes Serum in einer Endkonzentration von 2-10% (SMIBERT, 1986).

Neben der spiraligen Form der Treponemen treten unter ungünstigen Umwelt- und Kulturbedingungen, besonders in älteren Kulturen, Treponemen als Rundformen und Übergangsformen auf (HOLT et al., 1994). Rundformen wurden bei *T. denticola* als Ruheformen beschrieben und diskutiert (WOLF et al., 1993; WOLF u. WECKE, 1994). Derartige Rundformen wurden u. a. an Polytetrafluoroethylenmembranen bei der Untersuchung von Zahntaschenmaterial neben spiraligen Formen gefunden (WECKE et al., 1995).

2.3 Isolierung von *Treponema*-Spezies

Die Isolierung von Treponemen ist problematisch. Die meisten Treponemen lassen sich schwer oder gar nicht kultivieren. Ursache ist das geringe Wissen über die vielfältigen Ansprüche dieser Bakterien an das Wachstumsmedium.

Treponemen kommen physiologisch im Pansen vor, da offensichtlich viele essentielle Bestandteile dort vorhanden sind. Pansensaft enthält z. B. Essigsäure, Propionsäure, Isobutanylsäure, N-Butylsäure, Isovaleriansäure, N-Valeriansäure und wird daher autoklaviert häufig in einer Konzentration von 30-50% den künstlichen Medien zugegeben. In definierten künstlich-hergestellten Medien wurden die o. g. Fettsäuren direkt zugesetzt (CALDWELL u. BRYANT, 1966).

Es gibt drei prinzipielle Isolationsmethoden für Treponemen.

1. Die Treponemen bewegen sich bei der Well-Plate-Methode durch den Agar hindurch von den anderen Bakterien weg (ROSEBURY u. FOLEY, 1942; HAMPP, 1957; HANSON u. CANNEFAX, 1964; HANSON, 1970).
2. Die Isolierung sehr dünner Treponemen (0,22-0,3 μm) ist möglich bei der Membran-Filter-Methode. Die Spiralen bewegen sich hierbei durch einen Filter hindurch (LOESCHE u. SOCRANSKY, 1962; HARDY et al., 1964; BLAKE, 1968; SOCRANSKY et al., 1969; BOWDEN u. HARDIE, 1971; TAYLOR u. ALEXANDER, 1971; HUNTER u. ROSS, 1972; SMIBERT u. CLATERBAUGH, 1972).
3. Die Trennung der Bakterien erfolgt unter Verwendung von Selektivnährmedien. Diesen Medien sind Antibiotika zugesetzt. Das Verfahren eignet sich besonders für die Isolierung größerer Treponemen (SONGER et al., 1976; LEE u. PHILLIPS, 1978; STANTON u. CANALE-PAROLA, 1979). Antibiotika, wie z. B. Polymyxin B-Sulfat (LEE u. PHILLIPS, 1978), Fosfomycin und Rifampicin (LESCHINE u. CANALE-PAROLA, 1980) fanden bei dieser Methode Verwendung.

In den letzten Jahren sind Medien unterschiedlicher Zusammensetzung für die Isolierung von Treponemen entwickelt worden, von denen einige im Anschluß erwähnt werden.

- Das modifizierte Huntoon's Hormone Broth (FITZGERALD u. HAMPP, 1952), die Medien von BLAKE (1968) und BOWDEN u. HARDIE (1971) für die Isolierung von oralen Treponemen wurden in der Membranfiltermethode, die von

- SOCRANSKY et al. (1969) weiterentwickelt wurde, eingesetzt. Bei diesen Medien wurden Porenfilter mit einer Größe von 0,22 µm verwendet.
- Das Selektivmedium von LEE u. PHILLIPS (1978) basiert auf der Grundlage des Blutagars Nr. 2 (Oxoid), supplementiert mit lysiertem Pferdeblut und Polymyxin B-Sulfat für die Isolierung von Treponemen der Intestinalmukosa von Mäusen und Ratten.
 - Subkulturen von isolierten Treponemen müssen kloniert werden, da nur auf diese Weise eine Reinkultur erhalten werden kann. HARDY et al. (1963) haben 3 verschiedene Medien für die Klonierung von *T. denticola*, *T. refringens*, *T. phagedenis* sowie *T. vincentii* entwickelt. Jedes dieser Medien besitzt einen 10%igen Anteil an Kaninchen- oder Kälberserum. Der Agar wird in einer Konzentration von 0,7% eingesetzt. Die Kolonien wachsen innerhalb von 6-14 Tagen.
 - Die Isolierung von oralen Treponemen wird von CHAN et al. (1993) im NOS-Medium unter Verwendung von kleinen 50 ml Kulturflaschen mit 0,7% Agar und einer Supplementierung von 4 µg/ml Rifampicin beschrieben.
 - WYSS (1992) hat ein chemisch definiertes Medium für die Anzucht von oralen Treponemen und von *Porphyromonas gingivalis* entwickelt, die in periodontalen Läsionen des Menschen auftreten. Durch die vielen verschiedenen Inhaltsstoffe sollen optimale Wachstumsbedingungen für Treponemen geschaffen werden.

Die Lagerung der Kulturen erfolgt als Glycerinkultur bei –80 °C oder in flüssigem Stickstoff. Bei der Anzucht aus der Gefrierkultur muß diese auf Raumtemperatur erwärmt werden. Anschließend werden ca. 0,5 ml in frisches Medium überimpft und für 3-6 Tage bei 37 °C anaerob inkubiert (SMIBERT, 1986).

2.4 Molekularbiologische Methoden zum Nachweis von Treponemen aus Mischkulturen

Die Analyse komplexer, natürlicher Ökosysteme kann mit traditionellen mikrobiologischen Methoden durchgeführt werden. Dazu gehören die Anzucht, sowie die morphologische und enzymatische Charakterisierung der Bakterien. Hierbei tritt jedoch das Problem auf, daß ein großer Teil der Bakterien nicht kultivierbar ist, da *in vivo*-Kulturbedingungen nicht nachvollzogen werden können

(BULL et al., 1992). Schätzungsweise sind nur 12% aller Bakterien kultivierbar, im aquatischen Biotopen sind es nur 0,01-10% der Gesamtpopulation (FERGUSON et al., 1984; WAYNE et al., 1987; OLSEN, 1990). Auch die Kultivierung aller bislang nachgewiesenen Spirochäten ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht möglich.

Populationsanalysen, Diagnostik und Epidemiologie von Infektionen, die durch schwer- oder unkultivierbare Bakterien hervorgerufen werden, sind erst durch den Einsatz molekulargenetischer Verfahren möglich. Zum jetzigen Zeitpunkt existieren verschiedene Methoden, die eingesetzt werden können. So z. B. die Antigen/Antikörper-Reaktion zum Nachweis spezifischer Antigene (KASPAR u. TARTRERA, 1990), der Nachweis von Stoffwechsellleistungen der Organismen mittels entsprechender Markergene (z.B. Lux-Gene für Biolumineszenz oder XylE-Gen für Catechol-2,3-Dioxygenase; MORGAN et al., 1989; RATTRAY et al., 1990; STEWART, 1990) und der Einsatz von Nukleinsäuren als Sonden zur diagnostischen Hybridisierung. Allerdings erfordert dies Sequenzinformationen über das zu untersuchende Bakterium. Als Markergene für phylogenetische Analysen eignet sich ribosomale RNA (rRNA).

Bakterien besitzen funktionsgleiche rRNAs, die nahezu gleiche Sekundär- und Tertiärstrukturen aufweisen. In jeder Bakterienzelle befindet sich eine hohe Kopienzahl der rRNA (10^3 bis 10^4). Phylogenetisch gibt es bei allen Organismen konservierte und variable Regionen, die durch gruppen- oder speziesspezifische Sequenzbereiche charakterisiert sind (GÖBEL et al., 1984, 1987; GUTELL et al., 1994).

Es gibt verschiedene Wege, um nichtkultivierbare Mikroorganismen zu identifizieren. Die Methode ist davon abhängig, ob es sich um einen einzelnen oder um eine Population von Erregern handelt. Im folgenden werden vier Möglichkeiten aufgeführt.

- (1) Analyse von natürlichen Bakterienpopulationen mit der direkten Sequenzanalyse von rRNA-Molekülen (PACE et al., 1986)
- (2) Erstellung einer cDNA Bank nach reverser Transkription der Gesamt-RNA (WARD et al., 1990)
- (3) *In vitro*-Amplifikation revers transkribierter Gesamt-RNA oder direkte Amplifikation von rRNA-Genen ausgehend von der Gesamt-DNA (GIOVANNONI et al., 1990; WEISBURG et al., 1991; CHOI et al., 1994)

(4) Konstruktion einer Genbank aus Gesamt-DNA und Identifizierung rekombinanter Klone, die rRNA-Gene enthalten (de LONG et al., 1989; SCHMIDT et al., 1991).

Durch die Entwicklung der vergleichenden 16S rRNA-Sequenzanalyse ist eine Eingliederung der Prokaryonten in ein System natürlicher Verwandtschaften möglich geworden. Das Vorhandensein variabler und konservierter Bereiche eröffnet die Möglichkeit der Entwicklung von komplementären Oligonukleotiden, die als artspezifische Sonden oder Primer zur Amplifikation oder Sequenzanalyse eingesetzt werden können (WEISBURG et al., 1991). Die Oligonukleotidsonden wurden u. a. zum spezifischen Nachweis von Mikroorganismen in klinischen Materialien und in Umweltproben eingesetzt. Die vergleichende rRNA-Sequenzanalyse bildet die Grundlage einer taxonomischen Einordnung.

Eine auf der vergleichenden 16S rRNA-Sequenzanalyse beruhende Phylogenie der Spirochäten wurde erstmals von PASTER et al. (1991) vorgestellt. Durch die Untersuchung von subgingivalem Plaquematerial wurde die mikrobielle Diversität der Spirochäten bei fortschreitender Parodontitis des Menschen dargestellt. Die Auswertung ergab, daß sich 53 unterschiedliche spirochätenspezifische Klone, mit einer Sequenzidentität von 98% in 23 phylogenetische Cluster einteilen ließen. Diese Cluster wurden in acht große taxonomische Gruppen unterteilt. Dabei gingen CHOI et al. (1994) von einer 92%igen Sequenzidentität aus. In daraufhin durchgeführten epidemiologischen Untersuchungen zeigte sich, daß die Mehrzahl der in Patientenmaterial auftretenden Treponemen nicht kultivierbar sind (MOTER et al., 1998).

Mittels der *In situ*-Hybridisierung ist es durch den Einsatz 16S rRNA gerichteter Oligonukleotidsonden möglich, z. B. Spirochäten in Gewebeschnitten und Ausstrichen klinischer Materialien darzustellen. Dieses Verfahren ist besonders gut geeignet für die Detektion und Identifizierung von Bakterien in ihrer natürlichen Umgebung. Kultivierbare und bisher nichtkultivierbare Mikroorganismen können auf diesem Wege sichtbar gemacht werden. Ihre Lokalisation im Gewebe, ihre Anzahl und Morphologie lassen sich bestimmen (de LONG, 1989; AMANN et al., 1991).

2.5 Bedeutung der Spirochäten bei der Dermatitis digitalis

Seit Beginn der achtziger Jahre wurden Spirochäten von einigen Autoren in vielen Ländern Europas (PETERSE et al., 1982; BLOWEY u. SHARP, 1988; MORTELLARO et al., 1994; SCAVIA et al., 1994; ZEMLIC, 1994; GRUND et al., 1995), in den USA (READ et al., 1992; WEAVER, 1992; WALKER et al., 1995), in Japan (KIMURA et al., 1992) und in Kanada (HANNA et al., 1994; SAUVAGEAU et al., 1994; BORGMANN et al., 1996) im Zusammenhang mit der DD diskutiert. Die ätiologische Bedeutung der Spirochäten ist jedoch noch weitgehend ungeklärt (READ et al., 1992; MORTELLARO, 1994; WALKER et al., 1995) und ihre Relevanz deshalb umstritten (WEAVER, 1994). BORGMANN et al. (1996) sprachen von einer ursächlichen Bedeutung, da die spiralförmigen Bakterien in einer großen Anzahl nachgewiesen wurden. READ et al. (1992) hielten die nachgewiesenen Spirochäten für mögliche Erreger der papillomatösen DD (PDD), da das Erscheinungsbild der beim Menschen auftretenden Erkrankung der Frambösie dem der DD sehr ähnlich ist. Die Frambösie wird durch *T. pallidum subsp. pertenue* verursacht (SMIBERT, 1986). Nach Untersuchungen von BLOWEY et al. (1994) ist von einer keratolytischen Aktivität invasiver Spirochäten auszugehen. Eine durch Keratinabbau befindliche Schleimschicht auf der Oberfläche der DD-Ulcera spricht ebenso für einen ursächlichen Zusammenhang der Spirochäten mit dieser Erkrankung (BLOWEY et al., 1992; READ et al., 1992).

Mikroskopische Untersuchungen von Klauenbiopтата von an DD erkrankten Rindern ergaben, daß in 2/3 der untersuchten Proben neben anderen Morphotypen spiralförmige Bakterien sichtbar waren (NATTERMANN et al., 1996). READ et al. (1992), Mc LENNAN u. Mc KENZIE (1996) sowie DÖPFER et al. (1997) wiesen eine große Anzahl verschiedener Spirochätenmorphotypen in veränderten Klauenbiopтата mittels Silberfärbung (nach den Techniken von Warthin und Starry (Mc LENNAN u. Mc KENZIE, 1996) bzw. Bosma/Steiner (DÖPFER et al., 1997) nach. Elektronenmikroskopisch wurde ebenfalls das Vorhandensein spiralförmiger Bakterien und anderer Morphotypen in Klauenbiopstatmaterialien untersucht. Die spirochätenartigen Keime befanden sich an faserigem Material von Keratozyten, in fortgeschrittenen Stadien auch in Vakuolen im Interzellularbereich (GRUND et al., 1995).

BLOWEY et al. (1994) wiesen zwei Formen von Spirochäten im degenerierenden Epithel nach. Bei frühen, akuten Läsionen traten längere, filamentöse, spiralige Formen auf. In chronischen Läsionen kamen dagegen kürzere, dickere, halbrunde Spirochäten vor.

WALKER et al. isolierten 1995 erstmals Spirochäten aus Läsionen der PDD. Aufgrund von morphologischen und antigenen Eigenschaften sowie der enzymatischen Aktivität ordneten WALKER et al. (1995) die Isolate der Gattung *Treponema* zu.

Der Einsatz molekulargenetischer Verfahren ist eine Möglichkeit die Spirochäten weiter zu untersuchen, sie zu klassifizieren und ihre Diversität zu beschreiben, da die Anzüchtung der Spirochäten schwierig ist. Unter Verwendung spezifischer PCR-Primer wurden von einigen Autoren aus DD-Bioptaten 16S rDNA-Partialsequenzen von Treponemen amplifiziert. Diese Teilstücke der 16S rDNA ähnelten Treponemensequenzen, die bei Parodontalerkrankungen des Menschen auftraten (COLLIGHAN u. WOODWARD, 1997; RIJPKEMA et al., 1997; DEMIRKAN et al., 1998). DEMIRKAN et al. (1998) stellte durch den Einsatz von polyklonalen Antiseren gegen *Borrelia burgdorferi*, *T. denticola* und *T. vincentii* unter Verwendung von immunzytochemischen Färbetechniken Spirochäten an Gewebeschnitten fest. Die 16S rRNA-Hybridisierung ist im Vergleich zu den immunzytochemischen Färbetechniken spezifischer und sensitiver.

CHOI et al. (1997) ordneten unter Verwendung molekulargenetischer Analysen bei der Untersuchung der DD mittels 16S rRNA-Sequenzanalyse 5 Spirochäten-Phylotypen der Gattung *Treponema* zu. Zwei dieser Phylotypen wiesen eine enge Verwandtschaft mit den Treponemen auf, die bei der Parodontitis des Menschen gefunden wurden. Die Homologie zu *T. vincentii* betrug 98% und die zu *T. denticola* 95%. Eine Sequenz besaß eine Identität von 99,4% zu *T. phagedenis*, einer apathogenen *Treponema*-Spezies (CHOI et al., 1997).