

## 4. Diskussion

Trotz therapeutischer und prophylaktischer Maßnahmen sind die wirtschaftlichen Verluste, wie Milchrückgang und vermindertes Schlachtgewicht, die durch die Dermatitis digitalis (DD) hervorgerufen werden, beträchtlich. Die Ätiologie dieser Erkrankung ist bis heute nicht geklärt. Viele Autoren sehen die Ursache in einem infektiösen Geschehen bzw. als multifaktorielle Erkrankung (BLOWEY u. SHARP, 1988; MORTELLARO, 1994; MORTELLARO et al., 1994; ZEMLJIC, 1994; NATTERMANN et al., 1998). Die DD ist durch Antibiotika, Desinfektionsmittel und austrocknende Mittel beeinflussbar (REBHUN et al., 1980; SCHRANK u. GRUNER, 1989; BLOWEY, 1990; WEAVER u. COURT, 1993). Ebenso führte der Einsatz bestandsspezifischer Impfstoffe unter Verwendung anaerober Bakterien teilweise zum Erfolg (NATTERMANN u. JÄCKEL, 1994; KÜHN, 1996; METZNER et al., 1996; OELKERS, 1996; SCHMITT, 1997; NATTERMANN et al., 1998). Bei der Einstellung gesunder Rinder in einen erkrankten Bestand trat unmittelbar danach bei den zugestellten Tieren die DD auf (BLOWEY u. SHARP, 1988; BLOWEY, 1990; NUTTER u. MOFFIT, 1990; BLOWEY et al., 1992; GOURREAU et al., 1992; READ et al., 1992; WEAVER, 1992). Diese Beobachtungen deuten auf eine infektiöse Ursache hin.

Eine ätiologische Analyse ist allein unter Nutzung mikroskopischer Untersuchungen nicht möglich. Die kulturelle Anzucht von Bakterien aus Mischpopulationen ermöglicht die phäno- und genotypischen Charakterisierung, wenngleich oft eine Verzerrung der natürlichen, mikrobiellen Population dargestellt wird. Häufig gibt es bei Mischinfektionen, wie z. B. der Parodontitis, eine Diskrepanz zwischen der Anzahl der kultivierbaren und den in der Gramfärbung darstellbaren Bakterien. Dieses Mißverhältnis ist auch bei der DD zu beobachten. NATTERMANN et al. (1996) isolierten aus Klauenbioptaten anaerobe Bakterien, wie *Porphyromonas levii*, *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella denticola*, *Prevotella oralis*, *Prevotella bivia* sowie BLOWEY u. SHARP (1988) *Bacteroides* spp.. Im mikroskopischen Bild dagegen wurden neben anaeroben Bakterien in 2/3 der untersuchten Proben eine große Anzahl von Spirochäten gesehen (NATTERMANN et al., 1996), die bisher nur in Ausnahmefällen kulturell nachweisbar waren (WALKER et al., 1997). Die nachgewiesenen Spirochäten

variieren morphologisch in Länge, Durchmesser und Anzahl der jeweiligen Endflagellen (DONE et al., 1993; READ et al., 1992; WEAVER u. COURT, 1993; GRUND et al., 1995).

Für die Identifizierung von Bakterien durch die traditionelle Mikrobiologie müssen diese in Reinkulturen vorliegen. Anhand des morphologischen Aufbaus und der Biochemie ist dann eine taxonomische Einordnung möglich. Die phylogenetisch verbindliche und eindeutige Klassifikation nichtkultivierbarer Bakterien ist jedoch nur durch die Anwendung anderer, kulturunabhängiger Methoden denkbar.

Wiederum stellt sich das Problem, daß die Ätiologie einer Infektion jedoch nicht allein durch die genotypische Charakterisierung der Erreger feststellbar ist. Die gleichzeitige Kultivierung ist somit wichtig, um neue Isolate phänotypisch beschreiben und ihre Virulenzfaktoren analysieren zu können.

#### **4.1 *T. brennaborensis*, eine neue *Treponema* sp.**

Die ätiologische Relevanz der Treponemen bei der DD ist bisher nicht bekannt. Das häufige Auftreten von Spirochäten im mikroskopischen Bild (PETERSE et al., 1982; MORTELLARO et al., 1985; BLOWEY u. SHARP, 1988; KIMURA et al., 1992; READ u. WALKER, 1992; WEAVER, 1992; DONE et al., 1993; BLOWEY et al., 1994; HANNA et al., 1994; MORTELLARO, 1994; SAUVAGEAU et al., 1994; SCAVIA et al., 1994; ZEMLJIK, 1994; GRUND et al., 1995; WALKER et al., 1995; BORGMANN et al., 1996; NATTERMANN et al., 1996; CHOI et al., 1997; DÖPFER et al., 1997) bei an DD erkrankten Rindern, suggeriert jedoch eine mögliche Rolle in der Ätiopathogenese dieser Erkrankung. Eine erfolgreiche Reproduktion der DD unter Verwendung von isolierten *Treponema* spp. und anaeroben Bakterien würde Aufschluß über die Ätiologie dieser Erkrankung geben. Ebenso wäre der Einsatz isolierter Treponemen in der Anwendung bestandsspezifischer Impfstoffe vielleicht eine Möglichkeit, um einen vollständigen Impfschutz bei Rindern zu erzielen.

Da nicht alle Wachstumsbedingungen für eine Anzucht von Treponemen bekannt sind, ist ihre Isolierung schwierig. Es gibt eine Vielzahl von Möglichkeiten und Varianten für die Kultivierung, wie z. B. von HANSON u. CANNEFAX 1964, LOESCHE u. SOCRANSKY 1962 und STANTON u. CANALE-PAROLA 1979

beschrieben. 1995 gelangen WALKER et al. erstmals die Kultivierung von zwei unterschiedlichen Spirochätengruppen von der papillomatösen und interdigitalen DD. Aufgrund von phänotypischen Merkmalen wurden sie der Gattung *Treponema* zugeordnet.

Aus diesen Gründen wurde bei allen in dieser Studie vorliegenden Bioptatproben ein Kultivierungsversuch unternommen. Wie die 16S rDNA-Sequenzanalyse von CHOI et al. (1997) zeigte, besteht eine phylogenetische Ähnlichkeit zu jenen Treponemen, die an der Parodontitis des Menschen beteiligt sind. Aufgrund dieser Tatsache wurde für den Kultivierungsversuch ein Medium verwendet, welches für die Anzucht von oralen Treponemen und *Porphyromonas gingivalis* von WYSS 1992 entwickelt wurde. Dieses Medium ist ein künstlich hergestelltes Komplexmedium, welches die *in vivo* Bedingungen so optimal wie möglich nachahmt. Um eine Selektion der Treponemen von anderen Bakterien zu erreichen, wurden dem Medium die Antibiotika Rifampicin und Fosfomycin (LESCHINE u. CANALE-PAROLA, 1980) zugesetzt.

Die offizielle morphologische Beschreibung von Treponemen (HOLT et al., 1994) entspricht dem mikroskopischen Bild des isolierten Stammes DD5/3<sup>T</sup>. Der Endoflagellen-Typ des Isolates unterschied sich von denen, die WALKER et al. 1995 beschrieben hat. Die Enzymaktivitäten wurden mit den Minisystemen API ZYM und rapid ID32A getestet, um einen Vergleich zu anderen Untersuchungen zu ermöglichen. Der Stamm DD5/3<sup>T</sup> besaß die Enzymaktivitäten Saure Phosphatase und Naphtolphosphohydrolase, die auch bei den von WALKER et al. (1995) beschriebenen Treponemen und bei den kultivierbaren oralen Treponemen (WYSS et al., 1996, 1997) nachweisbar waren. Die weiteren enzymatischen Aktivitäten des Stammes DD5/3<sup>T</sup> unterschieden sich von denen, die WALKER et al. (1995) isolierten. Dies traf auch für den Stamm 1-9185MED zu, der eine Trypsin- und Chymotrypsinaktivität hatte, aber keine  $\beta$ -Galaktosidase-,  $\alpha$ -Glukosidase- und N-Acetyl- $\beta$ -Glukosaminidase-Aktivität besaß. Keiner der kultivierbaren Treponemen zeigte das gleiche Enzymaktivitätsmuster wie DD5/3<sup>T</sup>. Das Proteinmuster des neuen Isolates wies ebenso ein anderes Bandenmuster als die untersuchten Treponemen auf (Abb. 11).

		Vergleichende 16S rRNA Matrix (%)																		
Taxon	#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
1	<i>T. vincentii</i>	I																		
2	DDKL-13*	I	98.7																	
3	<i>T. medium</i>	I	98.8	99.6																
4	<i>T. phagedenis</i>		91.0	91.3	91.4															
5	DDKL-4*		90.6	91.2	91.4	99.4														
6	<i>T. denticola</i>	II	90.4	91.4	91.6	92.3	93.0													
7	DDKL-3*	II	89.3	90.2	90.4	92.0	92.1	95.3												
8	<i>T. pallidum</i>		87.6	87.7	87.7	90.4	90.5	89.4	89.1											
9	<i>T. maltophilum</i>	IV	86.6	86.3	86.9	86.4	86.3	87.2	87.1	84.5										
10	DD5/3 <sup>T</sup>	IV	87.1	86.9	87.7	84.9	85.2	86.5	86.3	83.7	88.7									
11	<i>T. bryantii</i>		85.0	83.9	84.4	84.8	84.4	85.1	85.7	84.2	86.4	86.6								
12	<i>T. pectinovorum</i>		84.5	85.1	85.5	84.6	85.1	85.4	85.4	84.1	87.9	88.3	87.0							
13	<i>T. amylovorum</i>		82.8	83.2	83.8	84.2	83.7	84.8	84.3	83.0	85.6	86.5	86.8	88.5						
14	<i>T. succinifaciens</i>		79.5	79.8	80.5	80.8	81.5	81.0	80.9	82.6	81.3	83.0	83.5	83.6	85.5					
15	<i>Treponema sp.</i>		82.2	83.4	83.7	83.9	83.5	83.8	83.6	84.7	84.6	84.7	86.0	86.6	86.2	88.2				
16	<i>T. saccharophilum</i>		82.4	83.6	84.1	82.9	83.2	83.7	83.9	82.8	82.7	83.3	83.6	86.2	83.5	82.7	87.9			
17	<i>T. socranskii</i>		82.8	82.1	82.8	83.8	84.2	82.8	82.9	83.9	82.9	84.1	84.9	86.6	83.9	85.1	81.3			
18	<i>Spirochaeta sp.</i>		87.6	87.6	88.3	86.1	87.5	87.0	87.9	87.0	85.2	86.8	85.3	83.9	84.9	82.4	84.9	83.0	83.2	

**Abb. 18:** Vergleichende 16S rRNA-Matrix von *T. brennaborensis* und 14 anderen Spirochäten und 3 rekombinanten Klonen. Berechnung der vergleichenden Matrix durch paarweisen Sequenzvergleich. Der Algorithmus wurde nach JUKES u. CANTOR (1969) berechnet und nach der Neighbor-Joining-Methode korrigiert (SAITOU u. NEI, 1987).

\* 16S rRNA-Sequenzen rekombinanter Klone  
# Phylogenetische Gruppe

Die vergleichende 16S rDNA-Sequenzanalyse ordnete das Isolat DD5/3<sup>T</sup> eindeutig in die Gattung *Treponema* ein. In der 16S rRNA-Matrix wurde die Sequenz des Stammes DD5/3<sup>T</sup> mit den 14 anderen Spirochäten und 3 rekombinanten Klonen verglichen (Abb. 18). Die höchste Ähnlichkeit (89,5%) bestand zu *T. maltophilum*, einer erst kürzlich beschriebenen Treponemenart, die aus menschlichen subgingivalen Plaquematerial isoliert wurde und der phylogenetischen Gruppe IV der oralen Treponemen zugeordnet ist (WYSS et al., 1997).

DD5/3<sup>T</sup> konnte keiner bisher bekannten kultivierbaren *Treponema sp.* zugeordnet werden. Alle Sequenzen bisher beschriebener Treponemen unterschieden sich von dem neuen Isolat (Sequenz-Analysen-Programm HUSAR 4.0, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg). Das neue Isolat mit der Stammbezeichnung DD5/3<sup>T</sup> wurde unter der Speziesbezeichnung *Treponema brennaborensis* bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) hinterlegt (DSM 12168T, SCHRANK et al., 1999).

Für weiterführende Untersuchungen in Mischpopulationen und anderen Klauenbiopтатаen wurde eine spezifische Oligonukleotidsonde von *T. brennaborensis* entwickelt, die sich von bisher bekannten *Treponema*-Stämmen differenziert. Diese Sonde wurde auf ihre Spezifität hin in der Dot blot- bzw. *In situ*-Hybridisierung geprüft und evaluiert. Die Sequenz des Isolates wurde in der 16S rDNA-Genbank nicht detektiert. Das Ausgangsmaterial für die Genbank und das Biopatatmaterial aus dem der Stamm DD5/3<sup>T</sup> isoliert wurde, waren nicht identisch. Das läßt darauf schließen, daß *T. brennaborensis* nicht in allen Läsionen der DD vorhanden war bzw. in der Genbank nicht erfaßt wurde. Durch weiterführende zukünftige epidemiologische Untersuchungen wird es nun unter Nutzung dieser Sonde möglich sein, das Vorkommen von *T. brennaborensis* zu bestimmen. Diese Untersuchungen werden für die Aufklärung der Ätiologie der DD von entscheidender Bedeutung sein. Wie bereits angesprochen ist das Wissen über Virulenzfaktoren zur Zeit sehr lückenhaft. Allerdings konnte auf der Suche nach möglichen Virulenzfaktoren in weiterführenden Untersuchungen eine Monozyten-stimulierende Aktivität im Überstand von *T. brennaborensis* nachgewiesen werden. Diese Aktivität (vergleichbar mit LPS) ließ sich durch Anti-CD14-Antikörper hemmen. Die Zytokininduktion war gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase am stärksten (SCHRÖDER et al., 1997). Das LPS von Treponemen ist biologisch sehr

aktiv. Die bei chronischer DD nachgewiesenen starken Gewichtsverluste und Leistungsrückgänge könnten ihre Ursache in der zunehmenden LPS-Belastung des erkrankten Rindes haben.

In der Dunkelfeldmikroskopie der Kultur waren Einrollungs- bzw. Rundformen zu sehen. Diese wurden ebenso in der Elektronenmikroskopie als auch in der *In situ*-Hybridisierung nachgewiesen. Eine Kontamination konnte ausgeschlossen werden, da diese Formen eindeutig als Einrollungs- bzw. Rundformen des Isolates in der *In situ*-Hybridisierung identifiziert wurden. Eine spezifische Hybridisierungsbindung zwischen der Oligonukleotidsonde und den Rundformen war zu erkennen (Abb. 10a,b). Ebenso war in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen eindeutig zu sehen, daß es sich um Treponemen handelte. Wie von WOLF et al. (1993) bei *T. denticola* beschrieben, waren die Rundformen verstärkt nach der logarithmischen Phase des Wachstums und vorwiegend im Sediment sichtbar. Das Phänomen der Abkugelung beschrieben auch WALKER et al. (1995) bei DD-Isolaten. Diese morphologischen Formen wurden weiterhin bei folgenden Spirochäten nachgewiesen: *T. denticola* (HAMPP et al., 1948; WOLF et al., 1993; WOLF u. WECKE, 1994; WECKE et al., 1995); *Leptospira icthohaemorrhagiae* und *L. canicola* (CZEKALOWSKI u. EAVES, 1954); Reiter treponeme (KAWATA u. INOUE, 1964). Die eigentliche Rolle dieser Rundformen ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht exakt geklärt. Bei *T. denticola* wurden sie als mögliche Ruheformen beschrieben (WOLF et al., 1993). Ein schnellerer Prozeß der Einrollung und eine Vergrößerung der Rate der Rundformen wurde durch Nährstoffdefizite oder ungünstige Lebensbedingungen (Serum, anderes Medium) hervorgerufen.

Bei dem Stamm *T. brennaborensis* handelt es sich nach phäno- und genotypischer Charakterisierung um eine neue *Treponema*-Spezies. Die ätiologische Relevanz dieser Treponeme ist jedoch noch unklar, da sie bei den Untersuchungen der 16S rDNA-Genbank nicht nachgewiesen werden konnte. Deshalb müssen zukünftige epidemiologische Untersuchungen dieser Frage nachgehen.

## 4.2 16S rDNA-Genbank

In der Arbeit wurde die Diversität der bei der DD beteiligten Treponemen aufgrund der angesprochenen Problematik der traditionellen Bakteriologie mittels kulturunabhängiger Analyse untersucht. Die rRNA ist ubiquitär verbreitet und ihre evolutionäre Stabilität und die funktionelle Konstanz ermöglichen es, sie als Zielgen für phylogenetische Systematik zu nutzen.

Die 16S rRNA enthält den nötigen Informationsgehalt und ist relativ leicht zu analysieren. In den ca. 1600 Basenpaaren befinden sich phylogenetisch konservierte und variable, gattungs- und speziesspezifische Sequenzbereiche der Bakterien. Die Einordnung der Gattungen erfolgt auf Grundlage stark konservierter Bereiche und die der Spezies aufgrund variabler Bereiche. Durch vergleichende 16S rRNA-Sequenzanalysen können Bakterien in Mischpopulationen auch ohne vorherige Kultivierung identifiziert werden.

Diese Eigenschaften ermöglichen eine Einordnung und Identifizierung bekannter und nicht klassifizierbarer oder bisher nicht kultivierbarer Bakterien in den phylogenetischen Stammbaum. Um die nötigen Informationen für die systematische Einordnung zu erhalten, ist die 5S rRNA zu klein (ca. 120 Basen), dagegen die Analyse der 23S rRNA zu aufwendig.

In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl von Sequenzen in den Datenbanken der 16S rRNA registriert (GUTELL et al., 1994). Durch diese kulturunabhängigen molekularbiologischen Methoden konnten Mikroorganismen erfaßt werden, die bei einer Kultivierung bisher unerkannt blieben.

Zurückgreifend auf die Methoden von CHOI et al. (1997) wurde deshalb eine 16S rDNA-Genbank erstellt.

Bei der Erstellung einer 16S rDNA-Genbank treten bei der Amplifikation häufig zwei Probleme auf. Punktmutationen und die Hybridmolekülbildung (Chimären) sind PCR-Artefakte, die beim Nachweis von Bakterien in Mischpopulationen kritisch zu bewerten und zu berücksichtigen sind.

Die durch die *Taq*-Polymerase bedingte Entstehung von Punktmutationen ist von der Targetsequenz und den Reaktionsbedingungen abhängig. Die Werte liegen zwischen  $10^{-4}$  und  $2 \times 10^{-5}$  [pro Nukleotid und Zyklus, (KEOHAVONG u. THILLY, 1989; ECKERT u. KUNKEL, 1990; von WINTZINGERODE et al., 1997)]. Die

Fehlerrate kann durch Veränderung der Magnesium- und Desoxynukleotidkonzentration, des pH-Wertes des Puffers und des Temperaturprofils verringert werden (ECKERT u. KUNKEL, 1990). Dieser mögliche Austausch einzelner Basen muß berücksichtigt werden. Sie haben aber keinen Einfluß auf das phylogenetische Dendrogramm. Wenn von einer maximalen Fehlerrate des Nukleotideinbaus nach 30 Thermozyklen (1 in 400 Basen) ausgegangen wird, liegt sie bei 0,5 % (SAIKI et al., 1988).

Hybridmoleküle sind Sequenzen, die in der Natur nicht vorkommen. Bei der PCR-Analyse von Mischinfektionen können sie in einer Häufigkeit von bis zu 30% entstehen, wenn die PCR-Bedingungen nicht optimal waren. (LIESACK et al., 1991; KOPCZYNSKI et al., 1994; von WINTZINGERODE et al., 1997). Bei der Untersuchung der in dieser Arbeit erstellten 16S rDNA-Genbank wurden nur 6 Chimären nachgewiesen. Das entspricht einer Häufigkeit von 5,8%. Die Chimären reagierten mit 2 verschiedenen Oligonukleotidsonden. Die Sequenzanalyse dieser Klone gab Aufschluß über die Art der Chimärenbildung. Es wurden 2 verschiedene 16S rDNA-Teilsequenzen von Treponemen gefunden. Die Oligonukleotidsonde DDK2 bindet an der *E. coli*-Position 1246. Im Gegensatz dazu binden die weiter verwendeten Oligonukleotidsonden zwischen 100-500 bp der *E. coli*-Position. Dies erklärt die Hybridisierungsergebnisse.

Neben Hybridmolekülbildung und Punktmutationen bildet die unterschiedliche Effizienz der einzelnen DNA-Stränge bei der PCR-Amplifikation ein weiteres Problem. Inhibitorische Faktoren, wie z.B. Blutbestandteile ebenso Amplifikationsprimer (SUZUKI u. GIOVANNONI, 1996; RAINEY et al., 1994) und die unterschiedliche Konzentration der Template-DNA (CHANDLER et al., 1997) können Ursache für bevorzugte Amplifikation sein. Um inhibitorische Faktoren auszuschließen, wurde als Ausgangsmaterial extrahierte DNA für die Erstellung der Genbank aus den Bioptaten verwendet.

Viele Autoren (BLOWEY u. SHARP, 1988; READ et al., 1992; HANNA et al., 1994; SAUVAGEAU et al., 1994; BORGMANN et al., 1996; NATTERMANN et al., 1996; WALKER et al., 1997) postulieren einen Zusammenhang zwischen Spirochäten und der DD. Bei früheren Untersuchungen wurden die spiralförmigen Bakterien den Treponemen zugeordnet. Diese Zuordnung basierte auf phänotypischen Merkmalen,



wie Sitz der Insertionsstellen und Anzahl der Endoflagellen. GRUND et al. (1995) und WALKER et al. (1995) nutzten zusätzlich Antigenmerkmale und enzymatische Aktivitäten für eine taxonomische Einordnung.

Erst unter Verwendung der vergleichenden 16S rDNA-Sequenzanalyse konnte jedoch eindeutig nachgewiesen werden, daß es sich bei den mikroskopisch sichtbaren spiralförmigen Bakterien um Vertreter der Gattung *Treponema* handelte. In einer ersten molekularbiologischen Analyse der DD ordneten CHOI et al. (1997) 5 Spirochätenphylotypen der Gattung *Treponema* zu. Zwei dieser Phylotypen besaßen eine hohe Identität zu solchen Treponemen, die in oralen Kavitäten bei der Parodontitis des Menschen gefunden wurden. Ein Vergleich der Ergebnisse zeigte, daß DD-spezifische rekombinante Klonsequenzen (DDKL-4 und DDKL-12) in beiden Genbanken vorhanden waren. Sie wurden mit den DIG-markierten Oligonukleotidsonden DDK2 und DDK12 detektiert. Damit bestätigte diese Studie die Untersuchungsergebnisse von CHOI et al. (1997).

Die Untersuchung der 16S rDNA-Genbank durch die Dot blot-Hybridisierung mit anschließender Sequenzanalyse ergab 27 unterschiedliche Teilsequenzen, die der Gattung *Treponema* zugeordnet werden konnten. Die analysierten Sequenzen entsprachen der 16S rDNA *E. coli*-Position 100-600. Der analysierte Bereich enthielt drei der fünf hochvariablen Sequenzbereiche, entsprechend den 16S rDNA *E. coli*-Positionen 185-195, 201-219 und 455-478. Die phylogenetische Klassifizierung wurde nach der Gruppeneinteilung der oralen Spirochäten nach CHOI et al. (1994) mit 92%iger Homologie vorgenommen. Bei der Interpretation des in Abb. 19 dargestellten Dendrogramms muß berücksichtigt werden, daß nur 500 Basenpaare bei der Erstellung einbezogen wurden. Alle sequenzierten Phylotypen fügen sich gut in den Stammbaum der Treponemen ein (CHOI et al., 1994; 1997).

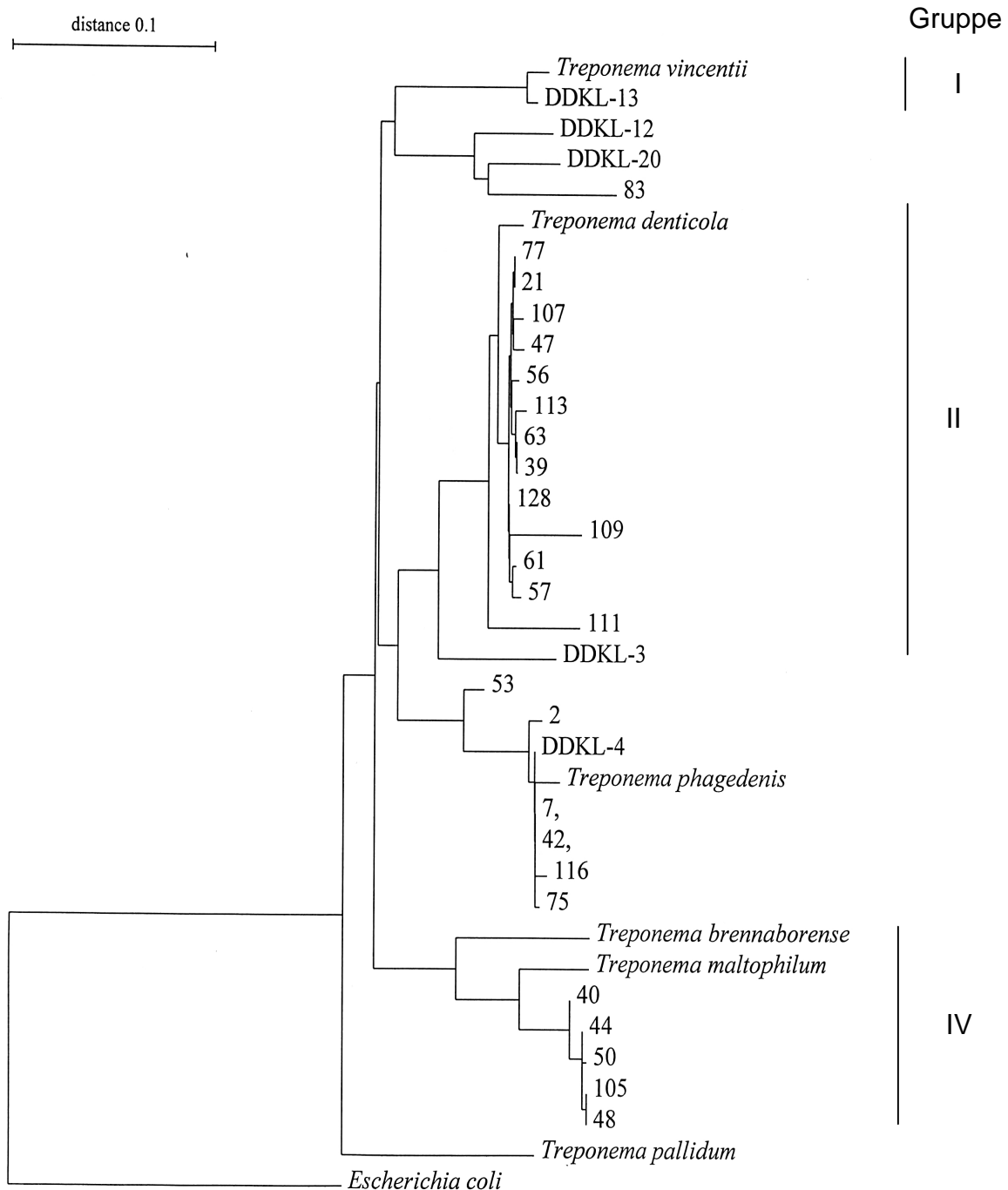
Treponemenphylotypen, die sich in die Gruppen der oralen Treponemen einordneten, traten in der Genbank mit einer Häufigkeit von 18 % (12%- Gruppe II; 6%- Gruppe IV) auf. Die TREII- und TREIV-positiven Inserts waren zwischen 94,0-98,4% zu *T. denticola* und zu *T. maltophilum* zwischen 92,8-94,8% identisch. Die Einordnung von rekombinanten Klonen in die Gruppe IV der oralen Treponemen machte deutlich, daß eine noch engere Verwandtschaft der oralen Treponemen und der beteiligten Treponemen an der DD besteht, als bisher anzunehmen war (Abb. 19). In der ersten Studie von CHOI et al. (1997) über die DD wurden Sequenzen der

Gruppe IV nicht nachgewiesen. Dagegen wurden zwei Phylotypen, die eine hohe Identität zu anderen Treponemen der oralen Gruppen besaßen, ermittelt (CHOI et al., 1997). Von anderen Autoren (RIJPKEMA et al., 1997; DEMIRKAN et al., 1998) wurde ebenso eine Verwandtschaft oraler Treponemen zu denen, die bei der DD beteiligt sind, beschrieben. Sie leiteten ihre Feststellungen von Teilsequenzen der 16S rDNA ab, die sie als Ergebnis einer PCR aus Bioplatmaterial erhielten. COLLIGHAN u. WOODWARD (1997) bestätigten die Verwandtschaft zwischen *T. denticola*-ähnlichen und Treponemenphylotypen der DD.

Aus den Hybridisierungsergebnissen der 16S rDNA-Genbank läßt sich schließen, daß die gattungsspezifische Oligonukleotidsonde TREPS einen Großteil der Treponemen detektierte. Von jenen Inserts (26), die mit der Oligonukleotidsonde DDK2 hybridisierten, hatten 3 kein und 2 ein schwaches Signal mit dieser Sonde. Wenn davon ausgegangen wird, daß die schwachen Signale als negativ gewertet werden, wurden 7 Inserts mit Sequenzähnlichkeit zu Treponemen nicht erkannt. Das entspricht einer Häufigkeit von 6,7%.

Mit der gattungsspezifischen Sonde der Treponemen TREPS reagierten 85 Klone, davon zeigten 13 ein schwaches Signal. Die signalschwachen Inserts wurden gesondert betrachtet. Sequenzübereinstimmung mit Treponemenphylotypen besaßen fünf Sequenzen (4,8%). Die anderen 8 Klone (7,7%) ähnelten den Gattungen *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, *Clostridium*, *Mycoplasma*, *Porphyromonas* und *Ruminococcus*. Einige dieser Spezies, wie z.B. *Bacteroides* spp. (CORNELISSE et al., 1981; PETERSE et al., 1982; BLOWEY u. SHARP, 1988; BRUNNER et al., 1989), *Mycoplasma* spp. (NATTERMANN et al., 1998), *Porphyromonas* spp. (DIETZ et al., 1995; NATTERMANN et al., 1996) wurden bereits kulturell in DD-Läsionen nachgewiesen.

Der Anteil der anaeroben Bakterien in den DD-Läsionen variierte von Tier zu Tier (DIETZ et al. (1995); NATTERMANN et al., 1996). Weiterhin wurde nachgewiesen, daß bei einem Rind mit DD *Porphyromonas levii* in unterschiedlichen Subtypen auftrat (ZUCKER u. NATTERMANN, 1996). Das unterschiedliche Spektrum der anaeroben Bakterien läßt darauf hindeuten, daß sie nicht alleine ursächlich verantwortlich sein können.



**Abb. 19:** Dendrogramm zur Darstellung von Klonsequenzen auf der Basis von 500 bp (16S rRNA *E. coli*-Position 100-600). Der Algorithmus wurde nach JUKES u. CANTOR (1969) berechnet und nach der Neighbor-Joining-Methode korrigiert (SAITOU u. NEI, 1987).

Zahlen = Klonnummern  
DDKL = rekombinante Klone (CHOI et al., 1997)

Die Beteiligung der oben genannten Spezies *Bacteroides*, *Porphyromonas* und *Mycoplasma* ist umstritten. Hierdurch können die unterschiedliche Wirksamkeit stallspezifischer Impfstoffe erklärt werden. OELKERS (1996) beschrieb beim Einsatz bestandsspezifischer Vakzine gegen DD unter Verwendung von u. a. *Porphyromonas levii* und *Bacteroides oralis* in zwei Milchviehbeständen bei der geimpften Gruppe signifikant weniger erkrankte Hintergliedmaßen, als bei der Kontrollgruppe. SCHMITT (1997) stellte dagegen beim Einsatz von Mischvakzinen aus Anaerobiernisolate keine therapeutische und prophylaktische Wirkung der Impfstoffe fest.

Wie NATTERMANN et al. (1998) in einem Vergleich von 105 Rinderbeständen in 7 Bundesländern feststellten, erkrankten nach der Immunisierung mit bestandsspezifischen Vakzinen gegen die DD weniger Rinder und der Krankheitsverlauf der immunisierten Rinder war in den meisten Fällen milder.

Nach allen vorliegenden Ergebnissen ist davon auszugehen, daß die anaeroben Bakterien, wie auch die Treponemen, allein nicht die Ursache dieser Erkrankung sein können.

Weiterführende epidemiologische Untersuchungen, welche die Verteilung der Treponemenphylotypen und anaerober Bakterien, wie z. B. *Porphyromonas levii*, *Bacteroides spp.* und *Fusobacterium spp.* bei der DD darstellen, sind deshalb notwendig. Durch die Anwendung spezifischer Oligonukleotidsonden in der FISH an Gewebeschnitten oder in der Dot blot-Hybridisierung könnte die Ätiologie der DD aufgeklärt werden.

Unter Berücksichtigung der gefundenen Phylotypen der 16S rDNA-Genbank und der vorliegenden Untersuchung von CHOI et al. (1997) konnte gezeigt werden, daß die Diversität der beteiligten Treponemen bei an DD erkrankten Rindern größer ist, als bisher anzunehmen war. Ebenso ist eine noch engere Verwandtschaft zu den Treponemen, die in den oralen Kavitäten bei der Parodontitis des Menschen gefunden wurden, festzustellen. Diese *Treponema*-Phylotypen, die beim Mensch und beim Rind nachgewiesen wurden, ließen sich gut in den phylogenetischen Stammbaum der Treponemen einordnen. Die Gruppen I, III, V, VI und VII der oralen Treponemen konnten im Untersuchungsmaterial der DD dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

Die von CHOI et al. (1997) und die in dieser Arbeit durchgeführte 16S rDNA-Sequenzanalyse der DD ergab, daß neben den gemeinsam identifizierten Phylotypen DDKL-4 und DDKL-12 noch weitere gefunden wurden. Das Ausgangsmaterial der 16S rDNA-Genbank der vorliegenden Arbeit bildeten 3 Biopate von DD-Läsionen eines Betriebes. Hier stellt sich die Frage, ob in den verschiedenen Betrieben die gleiche Präsenz der Phylotypen vorliegt, ob regionale Unterschiede, Zeitpunkt der Probenentnahme, klinisches Bild und Verlaufsstadien Einfluß auf die Verteilung der Treponemen haben. Sollten diese Einflüsse auf die Verteilung der Treponemen eine Rolle spielen, stellt die 16S rDNA-Sequenzanalyse dieser Arbeit die Diversität der Treponemen eines Betriebes dar. Um dieses Problem zu umgehen, müßte eine Genbank erstellt werden, die als Ausgangsmaterial eine Vielzahl von Biopaten mit unterschiedlichen Verlaufsstadien aus verschiedenen Betrieben verwendet. Ebenso könnte ein Vergleich von 16S rDNA-Genbanken unterschiedlicher Herkunftsbetriebe eine Lösung darstellen. Eine sich anschließende epidemiologische Arbeit könnte Aufschluß darüber geben, welche Einflüsse bei der Verteilung der Phylotypen eine Rolle spielen.

Wie bei allen Infektionen mit anaeroben Bakterien sind auch bei der DD verschiedene prädisponierenden Faktoren nötig. Diese Faktoren werden mit großer Wahrscheinlichkeit durch die Hochleistung der Rinder, Hygieneprobleme und die nicht sachgerechte Ernährung (hohe Kohlenhydrat- oder Proteinration) begünstigt. Dazu kommen die Behandlung mit Antibiotika, Enteritiden oder bakterielle sowie virale Erkrankungen. Die resultierenden Verdauungsstörungen führen zur Dysfunktion der Darmschleimhaut, zum Anstieg der Endotoxinkonzentration im Magen-Darm-Kanal mit anschließender Translokation. Die Folge kann eine Endotoxämie sein, die zu Mikrozirkulationsstörungen führt. Diese Voraussetzungen sind höchstwahrscheinlich der Ausgangspunkt für diese synergistische Mischinfektion (KRÜGER u. RÖPKE, 1997).