

5. Zusammenfassung

Die Dermatitis digitalis (DD) ist gegenwärtig die bedeutendste infektiöse Klauenerkrankung des Rindes. Die Ätiologie dieser Erkrankung ist bis heute nicht exakt geklärt. Die mikroskopisch sichtbaren spiralförmigen Bakterien lassen eine ursächliche Beteiligung vermuten. Um eine kulturunabhängige Analyse der an der DD des Rindes beteiligten Spirochäten zu ermöglichen, wurden diese schwer oder gar nicht kultivierbaren Bakterien mittels 16S rDNA-Sequenzanalyse untersucht und eindeutig klassifiziert. Die 16S rDNA-Gene wurden *in vitro* mittels PCR amplifiziert, in den Plasmidvektor pUC19 ligiert und anschließend in *E. coli* transformiert.

Die Analyse der 16S rDNA-Genbank ergab, daß die mikroskopisch sichtbaren, helikal gewundenen Bakterien mit Sicherheit der Gattung *Treponema* zugeordnet werden konnten. Es wurden 27 Phylotypen beschrieben. Zwischen jenen Treponemenphylotypen, die bei an Parodontitis erkrankten Menschen in der subgingivalen Plaque nachgewiesen wurden, und denen die in den Läsionen der DD des Rindes gefunden wurden, bestand eine enge phylogenetische Verwandtschaft. Bei beiden Mischinfektionen traten ebenso die gleichen anaeroben Spezies auf, wie z. B. *Fusobacterium spp.*, *Porphyromonas spp.* und *Prevotella spp.*. Somit besitzen beide Erkrankungen fast das gleiche Bakterienspektrum. Ein Rückschluß auf das Vorhandensein bestimmter Virulenzgene ist anhand der Phylotypensequenzen jedoch nicht möglich. Daher wurden Treponemen isoliert und aufgrund ihrer morphologischen und biochemischen Eigenschaften klassifiziert.

Aus einem Hautbioptat mit typischen klinischen Symptomen der DD wurde eine Spirochäte angezüchtet. Die Auswertung der Enzymaktivitäten, der Proteinanalyse und der 16S rDNA-Sequenz ergab, daß das neue Isolat der Gattung *Treponema* zugeordnet werden konnte. Alle phäno- und genotypischen Merkmale unterschieden sich von den bisher beschriebenen Treponemen, so daß das Isolat als neue Spezies beschrieben wurde und mit der Stammbezeichnung DD5/3^T unter dem Namen *Treponema brennaborensis* bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) hinterlegt wurde. *Treponema brennaborensis* besaß die höchste Ähnlichkeit (89,5%) zu *Treponema maltophilum*, einer Spirochäte die von einem menschlichen subgingivalen Plaquematerial isoliert wurde und sich in die Gruppe IV der oralen Treponemen einordnen läßt. Die ätiologische Relevanz ist allerdings unklar, da *Treponema brennaborensis* bei der

Analyse einer aus drei Biopaten erstellten Genbank nicht nachgewiesen werden konnte. Die Tatsache, daß die Anzahl der Biopattstichproben als Ausgangsmaterial für die Erstellung einer Genbank möglicherweise zu gering war, könnte die Ursache für das Nichtvorhandensein von DD5/3^T in der Genbank sein.

Die phylogenetische Klassifikation und die hohe Diversität der Treponemen unterstreichen eine mögliche Bedeutung der Treponemen an der Ätiologie der DD und die neue Spezies *Treponema brennaborense* steht nunmehr zur weiteren Untersuchung der Pathogenese dieser Erkrankung zur Verfügung.

Summary

Diversity of treponemes from Dermatitis digitalis of cattle- description of the novel species *Treponema brennaborensis*

The etiology of Dermatitis digitalis (DD), a severe infectious disease of claws in dairy cows, is not well understood. The high number of spirochetes, as observed microscopically, suggests a pathogenetic role of these organisms. Since these fastidious organisms are difficult to culture or even unculturable, 16S rRNA sequence analysis was used to determine the diversity and phylogeny of this hitherto unclassified DD spirochetes. 16S rRNA genes were cloned from PCR amplified products of DNA extracted from DD lesions and the respective PCR products were cloned into *E. coli* by using the plasmid vector pUC19.

Analysis of the resulting genebank revealed, that the microscopically observed spirochetes all clustered within the genus *Treponema*, being divided into 27 phylotypes. Phylogenetically these treponemes were closely related to those found in periodontal pockets of periodontitis patients. Moreover both infections are associated with a mixed anaerobic flora, e.g. *Fusobacterium spp.*, *Porphyromonas spp.* and *Prevotella spp.* Since phylogenetic analysis alone can not prove the pathogenetic potential of an microorganism, it is necessary to isolate the respective bacteria for further analysis of virulence factors. Therefore Treponemes were isolated and classified according to their morphological and biochemical characteristics.

A novel *Treponema* species was isolated from an ulcerative lesion of a cow suffering from DD. By chemotaxonomy, protein analysis and comparative 16S rDNA sequence analysis this isolate was classified as a treponeme that differed from all *Treponema* species described so far. Type strain DD5/3^T, for which the name *Treponema brennaborensis* was proposed, has been deposited in the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Germany) as DSM12168T. *Treponema brennaborensis* was phylogenetically most closely related (89,5% 16S rRNA similarity) to *Treponema maltophilum*, an oral spirochete of group IV isolated from a periodontitis patient. However the precise etiological significance of this spirochete *Treponema brennaborensis* is not clear, as *Treponema brennaborensis* could not be identified in the genebank elaborating described above

comparative 16S RNA sequence analysis. A possible reason could be the low numbers of *Treponema brennaborensis* in the respective biopsies.

The phylogenetic classification and high diversity of treponemes underline their possible role in the etiology of DD. The novel isolate *Treponema brennaborensis* may be used to further investigate the pathogenetics of those microorganisms.