

Aus dem Klinischen Department Nutztiere und Sicherheit von Lebensmittelsystemen  
Veterinärmedizinischen Universität Wien

Klinisches Zentrum für Wiederkäuer- und Kamelidenmedizin  
(Leiter: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Thomas Wittek, Dipl.ECBHM)

**Vorkommen von *Treponema spp.* in Dermatitis digitalis-  
assoziierten Klauenhornläsionen versus eitrigen, tiefen  
Klaueninfektionen beim Rind**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von  
Mariella Zimmermann

Wien, im November 2024

Betreuer: Ao. Univ. Prof. Dr.med.vet. Johann Kofler

Universitätsklinik für Wiederkäuer

Klinisches Department für Nutztiere und Sicherheit von Lebensmittelsystemen

Veterinärmedizinische Universität Wien

Begutachterin: DI. Dr. habil. Sabine Brandt

Head of Research Group Oncology

Division of Equine Surgery

Centre for Equine Health and Research

University of Veterinary Medicine

### Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle übernommenen Textstellen aus fremden Quellen wurden kenntlich gemacht.

Ich habe die entscheidenden Arbeiten selbst durchgeführt und alle zuarbeitend Tätigen mit ihrem Beitrag zur Arbeit angeführt.

Die vorliegende Arbeit wurde nicht an anderer Stelle eingereicht oder veröffentlicht.

Wien, am 28.11.2024

Unterschrift: \_\_\_\_\_

## Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	10
1.1	TIERWOHLBEZOGENE UND WIRTSCHAFTLICHE ASPEKTE VON KLAUENERKRANKUNGEN .....	10
1.2	DERMATITIS DIGITALIS .....	10
1.2.1	Ätiologie.....	10
1.2.2	Prädisponierende Faktoren .....	12
1.2.3	Klinisches Erscheinungsbild der kutanen DD .....	14
1.2.4	Diagnosestellung und Differenzialdiagnose der kutanen DD.....	15
1.3	DERMATITIS DIGITALIS-ASSOZIIERTE KLAUENHORNLÄSIONEN .....	16
1.3.1	Klinisches Erscheinungsbild der DD-assoziierten Klauenhornläsionen.....	16
1.3.2	Diagnosestellung und Differenzialdiagnose der DD-assoziierten Klauenhornläsionen ..	17
1.4	EITRIGE, TIEFE KLAUENINFEKTIONEN BEIM RIND.....	17
1.4.1	Infektionen der tiefen Beugesehne, des Klauensesambeines, des Klauenbeines, des Klauengelenkes und der Fesselbeugesehnnenscheide.....	17
1.4.2	Zwischenklauenphlegmone .....	18
1.5	BAKTERIELLE INTERFERENZ (BAKTERIELLER ANTAGONISMUS).....	21
2	WISSENSCHAFTLICHE FRAGESTELLUNG .....	22
3	MATERIAL UND METHODIK .....	23
3.1	PROBENMATERIAL .....	23
3.2	DNS-EXTRAKTION.....	25
3.3	DNS-VALIDIERUNG .....	26
3.4	BETA-AKTIN-PCR .....	26
3.5	TREPONEMEN-PCR UND SEQUENZANALYSE.....	26
4	ERGEBNISSE .....	29
4.1	NACHGEWIESENE <i>TREPONEMA SSP.</i> IN DD-ASSOZIIERTEN KLAUENHORNLÄSIONEN.....	29
4.2	NACHGEWIESENE BAKTERIEN IN EITRIGEN, TIEFEN KLAUENINFEKTIONEN.....	30
5	DISKUSSION .....	31
6	LITERATURVERZEICHNIS .....	38
7	TABELLENVERZEICHNIS.....	48

## **Danksagung**

Ich danke meinem Betreuer Herrn Ao. Univ.-Prof. Dr.med.vet.Dipl.ECBHM Johann Kofler für die Idee zu dieser Arbeit. Des Weiteren möchte ich mich für die stets freundliche und sehr rasche Unterstützung, sowie die konstruktiven Ratschläge bedanken.

Danke auch an Herrn Priv.-Doz. Dr.med.vet. Dipl.ECVM Joachim Spergser, der auch viele meiner Fragen hinsichtlich Bakteriologie mit viel Geduld beantwortet hat.

Ein weiteres sehr großes Dankeschön geht an Dr. Christoph Jindra, der mir bei Fragen immer sehr hilfsbereit und geduldig weitergeholfen und mir auch einiges an Laborarbeit abgenommen hat.

Mein größter Dank gilt außerdem meinen Eltern, die mich immer sowohl finanziell als auch psychisch, während dieses wundervollen, jedoch nicht immer ganz leichten Studiums unterstützt haben. Danke, dass ihr mir meinen Kindheitstraum, Tierärztin zu werden, ermöglicht habt. Danke auch meiner Schwester Alex und meinem Freund Matthias. Ihr habt stets ein offenes Ohr für mich und ich weiß, dass ich mich in allen Lebenslagen auf euch verlassen kann. Danke des Weiteren auch an meine Schwiegereltern, die mir mit viel gutem Essen und emotionaler Unterstützung durch das Studium geholfen haben.

Und zu guter Letzt möchte ich mich bei all meinen Freunden bedanken, die mich während meines Studiums begleitet haben und es zu dem gemacht haben, was es war: Eine wunderschöne (wenn auch streckenweise sehr anstrengende) Zeit.

Danke Conni, Nena, Günther, Martin, Markus, Manuel, Larissa, 4xAnna (Freytag, Schodi, Schulerin, Ripperl), Julie, Gerda, Michelle, Katja, Sabrina und Anna-Lena. Ihr wart immer für mich da und ich freue mich auf viele weitere gemeinsame Jahre, Zeit zum Feiern, Lachen und Abenteuer erleben, sowie den fachlichen Austausch unter KollegInnen.

## Abkürzungsverzeichnis

DIC .....	Disseminated Intravascular Coagulation
ICAR.....	International Committee for Animal Recording
NHI .....	<i>National Library of Medicine</i>

## ABSTRACT

Cattle can be affected by both non-infectious and infectious claw diseases. The latter includes bovine digital dermatitis (BDD) and interdigital phlegmon. In BDD, anaerobic spirochetes of the *Treponema* species have been identified as the main cause of the disease. Starting from sole ulcers and white-line abscesses, deep digital infections involving tendons, bones and joints often develop in cattle. *Fusobacterium necrophorum*, *Dichelobacter nodosus* and other pyogenic bacteria play an active role in these deep digital infections. It is still unclear to what extent treponemes are involved in the pathogenesis of deep digital sepsis. Conversely, there is currently no reasonable explanation as to why BDD-associated claw horn lesions often persist for many months or even a year without infection of deep supporting structures of the claw, such as the pedal bone, the deep flexor tendon, or the distal interphalangeal joint, by pyogenic bacteria.

The aim of this study was to examine samples from purulent, deep digital infections and BDD-associated claw horn lesions for the presence of treponemal DNA. The goal was to determine if infections caused by BDD-treponemes, and pyogenic bacteria can coexist or if they exclude each other. Nineteen samples of deep, purulent digital infections were taken from eleven cattle, while 18 samples of BDD-associated claw horn lesions were collected from 15 cattle.

DNA was extracted from a total of 37 samples, quantified and tested for PCR-compatible quality using beta-actin PCR. The DNA extracts were then tested for the presence of treponemal DNA using a "universal spirochete PCR". Amplification products of the correct size were purified and sequenced. The sequences obtained were compared with sequences from the gene database using a BLAST program. Treponemal sequences were clearly detected in 8 of 15 cattle with BDD-associated claw horn lesions, with *Treponema pedis* being the most common. Additionally, a feline oral bacterium was identified in six cases, which is often found in association with BDD. In contrast, no treponemal DNA was detectable in deep, purulent digital infections. However, a pathogen that presumably corresponds to oral *Parvimonas micra* was frequently detected in samples from deep, purulent digital infections.

The results indicate that BDD treponemes play only a very minor role, if any, in deep, purulent digital infections. This circumstance can possibly be explained by the phenomenon of "bacterial interference", whereby it is assumed that one group of bacteria displaces another group through various mechanisms.

A possible causal contribution of *Parvimonas micra* to the development and progression of purulent claw defects should be investigated more closely.

## ZUSAMMENFASSUNG

Rinder können von nicht-infektiösen und von infektiösen Klauenerkrankungen betroffen sein, zu letzteren zählt Dermatitis digitalis (DD) und die Zwischenklauenphlegmone. Bei DD wurden anaerobe Spirochäten der Gattung *Treponema* als wesentliche Verursacher der Erkrankung identifiziert. Ausgehend von Sohlengeschwüren und Weiße-Linie Abszessen, entwickeln sich beim Rind häufig tiefe Infektionen mit Beteiligung von Sehnen, Knochen und Gelenken. Bei diesen tiefen Klaueninfektionen spielen *Fusobacterium necrophorum*, *Dichelobacter nodosus* und weitere Eitererreger eine aktive Rolle. Bislang ist unklar, inwieweit auch Treponemen bei der Pathogenese von eitrigen Klauenerkrankungen involviert sind. Umgekehrt gibt es dato keine begründete Erklärung dafür, weshalb DD-assoziierte Klauenhornläsionen häufig über viele Monate bis hin zu einem Jahr bestehen, ohne dass es zu einer Infektion tiefer Stützstrukturen der Klaue, wie dem Klauenbein, der tiefen Beugesehne oder dem Klauengelenk durch Eiterbakterien kommt.

Ziel dieser Studie war es daher, Proben von eitrigen, tiefen Klaueninfektionen versus an DD-assoziierten Klauenhornläsionen auf die Anwesenheit von Treponemen-DNS zu untersuchen, um Hinweise zu erhalten, ob Infektionen durch Treponemen und Eitererreger nebeneinander persistieren können, oder einander eher ausschließen.

Von 11 Rindern wurden 18 Proben von tiefen, eitrigen Klaueninfektionen entnommen. Von 15 Rindern wurden 18 Proben von DD-assoziierten Klauenhornläsionen gesammelt. Aus den insgesamt 36 Proben wurde DNS extrahiert, quantifiziert und mittels Beta-Aktin-PCR auf PCR-kompatible Qualität geprüft. Im Anschluss wurden die DNS-Extrakte mit einer „Universal-Spirochäten-PCR“ auf Anwesenheit von Treponemen-DNS getestet. Amplifikationsprodukte korrekter Größe wurden gereinigt und sequenziert. Erhaltene Sequenzen wurden mittels eines BLAST-Programmes mit Sequenzen aus der Gen-Datenbank verglichen.

Bei 8 von 15 Rindern mit DD-assoziierten Klauenhornläsionen wurden eindeutig Treponemen-Sequenzen nachgewiesen, wobei *Treponema pedis* am häufigsten vertreten war. Daneben wurde in sechs Fällen ein felines orales Bakterium identifiziert, welches häufig in Assoziation mit DD gefunden wird. Hingegen war bei tiefen, eitrigen Klaueninfektionen keine Treponemen-DNS nachweisbar. In den Proben von tiefen, eitrigen Klaueninfektionen wurde jedoch häufig ein Pathogen nachgewiesen, welches vermutlich dem oralen Bakterium *Parvimonas micra* entspricht.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Treponemen bei tiefen, eitrigen Klaueninfektionen, wenn überhaupt, nur eine sehr untergeordnete Rolle spielen. Möglicherweise kann dieser Umstand mit dem Phänomen der „bakteriellen Interferenz“ erklärt werden, wobei man davon ausgeht, dass eine Gruppe von Bakterien eine andere Gruppe durch verschiedene Mechanismen verdrängt.

Ein möglicher kausaler Beitrag von *Parvimonas micra* an der Entstehung und dem Fortschreiten eitriger Klauendefekten sollte wissenschaftlich näher untersucht werden.

## 1 Einleitung

### 1.1 Tierwohlbezogene und wirtschaftliche Aspekte von Klauenerkrankungen

Neben Fruchtbarkeitsstörungen und Mastitiden stellen Klauen- und Gliedmaßenkrankungen die häufigste Abgangsursache bei Milchkühen in Österreich dar (1). Das führt einerseits zu einer bedeutenden wirtschaftlichen Belastung für die Milchviehbetriebe, andererseits ist auch das Wohl erkrankter Tiere stark beeinträchtigt, da die schmerzbedingten Klauenerkrankungen, sogenannte „Alarm-Erkrankungen“, immer Lahmheiten zur Folge haben (2). Neben den wirtschaftlichen Gründen, die ein Vorbeugen von Klauenerkrankungen notwendig machen, ist es auch aus ethischer Sicht nicht vertretbar, wenn eine hohe Lahmheitsprävalenz in einer Herde vorherrscht. Ethisch tolerierbar ist eine Lahmheitsprävalenz von maximal 10% (3). Sollte die Prävalenz höher sein, müssen Maßnahmen, wie zum Beispiel Verbesserungen der Stallbedingungen und des Haltungsmanagements, getroffen werden, da die vorliegenden Haltungsbedingungen offensichtlich inadäquat sind (3).

Die mittleren Gesamtkosten pro lahmer Kuh und Jahr wurden mit 307,50 ( $\pm 8,40$ ) Euro, und die mittleren Kosten einer an Dermatitis digitalis (DD) erkrankten Kuh pro Jahr wurden mit 391,80 ( $\pm 10,0$ ) Euro beziffert (4). Der größte Kostenfaktor bzw. die größten finanziellen Verluste im Hinblick auf Klauenerkrankungen sind mit 44% dem Rückgang der Milchleistung geschuldet, jedoch sind mit 22% das Ausmerzen der Tiere und mit je 12% die verlängerte Zwischenkalbezeit und die Mehrarbeit der LandwirtInnen ebenfalls nicht zu vernachlässigen (5).

### 1.2 Dermatitis digitalis

Dermatitis digitalis (DD) stellt eine infektiöse Klauenhauterkrankung dar und führt zu ulzerativen Läsionen an der Epidermis und Lederhaut der Haut an den Klauen (6). Das klinische Erscheinungsbild der DD an der Klauenhaut kann sehr unterschiedlich sein, zur Beschreibung der verschiedenen Stadien der DD wurde das sogenannte „M-Scoring System“ mit den Stadien M0, M1, M2, M3, M4 und M4.1 entwickelt (7, 8).

#### 1.2.1 Ätiologie

Bei DD handelt es sich um eine multifaktorielle Erkrankung mit infektiöser Schlüsselkomponente. Spirochäten der Gattung *Treponema spp.* spielen nach derzeitigem Kenntnisstand eine wesentliche Rolle im Krankheitsgeschehen (9–13). Den Namen

„Spirochäten“ haben die Bakterien aufgrund ihrer besonderen Form erhalten, welche sich lang, dünn und spiralig darstellt [*spira*, spiralig und *chaete*, Haar] (14, 11). Ein weiteres Charakteristikum der Spirochäten sind die vorhandenen Flagellen, auch Geißeln genannt. Die Anzahl dieser fadenförmigen Strukturen ist unterschiedlich, kann aber von einer Flagelle bis zu mehreren hundert pro Bakterium reichen. Bei den Treponemen reicht die Anzahl der Flagellen von einer bis acht pro Organismus. Die Geißeln ermöglichen es den Bakterien, sich selbst in sehr viskösen Umgebungen fortzubewegen (10, 15). Spirochäten sind obligat anaerob, d.h. sie benötigen für ihr Wachstum eine Umgebung, welche frei von Sauerstoff ist (16, 17). Bei manchen dieser Bakterien-Arten wird auch diskutiert, ob ein Wachstum in mikroaerophiler Umgebung ebenfalls möglich ist (18). Die pathogenen Mechanismen der Treponemen sind bis dato noch nicht vollständig geklärt und es ist auch nicht bekannt, ob es sich bei diesen Bakterien um die primären Pathogene oder Kofaktoren handelt. Ein pathogener Mechanismus von Treponemen, welcher von Opitz et. al. (2001) geklärt werden konnte, ist die Aktivierung eines Signalpfades, der zur Produktion des Tumornekrosefaktors-alpha (TNF $\alpha$ ), einem proinflammatorischen Zytokin, führt (19, 10, 15). Des Weiteren wurde die Aktivität von Enzymen wie etwa Esterasen oder Phospholipasen mittels API ZYM Complete Research Kit untersucht und es wurde herausgefunden, dass im Vergleich zu anderen Treponema-Spezies eine vermehrte Exo – und Endopeptidaseaktivität bei Infektionen mit *T. denticola* vorhanden ist. Bei der Esterase wird vermutet, dass sie in Verbindung mit Phospholipase-Aktivität eine Rolle bei der Zerstörung von Gewebe spielt (20). Weitere Untersuchungen werden aber nötig sein, um herauszufinden, wie DD-spezifische Treponemen in die Induktion von Dermatitis digitalis involviert sind und ob bzw. auf welche Weise sie das Fortschreiten dieser Erkrankung beeinflussen (10).

Die erste erfolgreiche in-vitro Kultivierung von Treponemen bei boviner papillomatöser Dermatitis digitalis beschrieben Walker et. al. (1995). Gomez et al. (2012) gelang erstmals die Entwicklung eines experimentellen Infektionsmodells zur Auslösung einer akuten DD bei gesunden Rindern durch Inokulation verschiedener *Treponema spp.*-Isolate von akuten DD-Läsionen von erkrankten Rindern.

Obwohl Bakterienkulturen und die Untersuchung histologischer Schnitte die Präsenz einer Vielfalt an verschiedenen Bakterien wie *Porphyromonas spp.*, *Campylobacter spp.*, *Fusobacterium necrophorum* und *Dichelobacter nodosus* in akuten (M2) DD-Läsionen belegen, ist *Treponema spp.* die vorherrschende Bakterienart bei akuten DD-Läsionen der Haut bei Rindern (9, 10, 21). Verschiedene phylogenetische Gruppen von Treponemen konnten in den DD-assoziierten Läsionen nachgewiesen werden. Als vorherrschende

Treponemen in DD-Läsionen gelten heute *T. pedis*, *T. medium*, *T. phagedenis*, *T. denticola* und *T. brennaborensis* (10, 9, 21).

Die DD-spezifischen *Treponema spp.* besiedeln konsistent in großer Anzahl sowohl in oberflächliche und auch tiefere Schichten der Epidermis wie zum Beispiel das Stratum spinosum, als auch die Lederhaut. Die DD-spezifischen *Treponema spp.*-Bakterien zeigen allerdings im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien keine Tendenz in tiefere Gewebeschichten wie die Unterhaut, die Muskulatur oder Knochen vorzudringen (9, 22, 15). Des Weiteren ist bekannt, dass Treponemen nicht an den Klauen bzw. an der Haut der Beine von gesunden Rindern nachweisbar sind (10).

In einer 16S rRNA-Sequenzierung konnten drei verschiedene phylogenetische Gruppen herausgearbeitet werden, die sehr unterschiedliche Treponemen-Spezies beinhalten. So sind zum Beispiel die Isolate aus den phylogenetischen Gruppen 1 und 3 in parodontale Erkrankungen des Menschen involviert (23). Als Beispiele können *T. denticola* und *T. medium/vincentii* genannt werden, die häufig in Zusammenhang mit humaner Parodontose nachweisbar sind (10). Die Isolate aus der phylogenetischen Gruppe 2 sind mit Kommensalen aus dem menschlichen Urogenitaltrakt verwandt (23).

### 1.2.2 Prädisponierende Faktoren

Da es sich bei DD, wie bereits erwähnt um eine multifaktorielle infektiöse Klauenhauterkrankung handelt (12), reicht die ausschließliche Anwesenheit dieser anaeroben Bakterien nicht aus, um die Krankheit an der Klauenhaut zu induzieren. Es braucht unbedingt begünstigende Faktoren, die dazu führen, dass die schützende Hautbarriere geschädigt wird, sodass die Treponemen in die Haut eindringen können und DD sich somit klinisch manifestieren kann. Zu diesen Faktoren zählen maßgeblich die Haltungsform (Laufstall- oder Anbindehaltung), die Qualität und Beschaffenheit von Lauf- und Liegeflächen, die Hygiene im Lauf- und Liegenbereich der Rinder, verschiedene Stressfaktoren und die Genetik (24–28). Huber (2002) stellte ein doppelt so hohes Risiko an DD zu erkranken fest, wenn die Kühe in Laufställen gehalten werden gegenüber der Aufstallung in Anbindehaltung. Eine aktuelle Studie wies nach, dass Milchrinder in Anbindeställen ein um 75% geringeres Risiko haben, an DD zu erkranken, als Rinder in Laufställen, und auch Holstein-Kühe zeigten ein höheres Risiko an DD zu erkranken im Vergleich zu anderen Rassen (29). Der Umstand, dass Tiere in Anbindehaltung seltener an DD erkranken, wurde damit erklärt, dass sie in Anbindehaltung

weniger Kot-Harn-Gemisch bzw. generell weniger feuchten Lauf- und Liegeflächen ausgesetzt sind (30, 29). Tiere in Laufställen, in denen die Schrappfrequenz zu gering ist oder in denen die Laufbereiche stark kotverschmutzt sind, haben dadurch sehr häufig kotverschmutzte Klauen und Zehen. Die Mazeration des weichen Ballenhorns und der Klauenhaut wird dadurch stark begünstigt und zudem werden anaerobe Bedingungen geschaffen (28). Interessant ist auch eine geringere DD-Prävalenz bei Rindern, welche saisonal gealpt werden, was damit erklärt wird, dass die Kotverschmutzung der Klauen auf den weitläufigen Bergweiden kaum vorliegt und auch kein Überbelegungsstress herrscht. Dadurch besteht ein weit geringerer Infektionsdruck, da die DD-spezifischen Treponemen in der Regel über direkten Haut-zu-Haut-Kontakt und Kot übertragen werden (28).

Treponemen und damit DD können nachweislich auch über die Arbeitsinstrumente der KlauenpflegerInnen von Betrieb zu Betrieb und von Kuh zu Kuh übertragen werden (29, 27). Die Möglichkeit der Übertragung von DD durch KlauenpflegerInnen wird auch durch eine Studie von Bayer et al. (2023) gestützt, in welcher gezeigt wurde, dass Klauenpfleger, welche während der Klauenpflege Biosicherheitsmaßnahmen beachteten, die Verschleppung von DD-spezifischen Treponemen und Salmonellen deutlich minimieren konnten (31).

Einen weiteren Faktor für das Aufflackern von DD in endemisch infizierten Herden stellt die verminderte körpereigene Immunabwehr dar, verursacht durch Stressfaktoren (z.B. Überbelegung, Umstellungen der Färsen in die Herde, schlechte Futter-(Silage)-qualitäten und in den letzten Jahren in zunehmendem Maße Hitzestress (12, 32, 33).

In zahlreichen Studien wurde eine unterschiedlich genetisch bedingte Anfälligkeit für DD bei Rindern beschrieben: Typ 1-Tiere haben nie Mortellaro, Typ 2-Tiere haben nur selten schmerzhafte DD-Läsionen und Typ 3-Tiere haben häufig wiederkehrende akute (M2) Läsionen im 2 – 6 Wochen Rhythmus (34–37). Diese 3 Typen können zusammen in einer Herde vorkommen. In einer mit DD infizierten Herde gilt es diese 3 Typen zu detektieren, um die Risikogruppe (Typ-3) zu identifizieren und somit Behandlungs- und Vorbeugemaßnahmen besser steuern zu können (34, 38).

Die verschiedenen „DD-Typen“ scheinen sich in ihrer Immunogenität gegenüber Treponemen (und anderen Bakterien) zu unterscheiden, was erklären könnte, weshalb manche Tiere niemals M2-Stadien entwickeln und andere Rinder wiederum regelmäßig, beispielsweise alle 2 – 6 Wochen an neuerlichen akuten DD-Infektionen erkranken (34, 39, 40). So deuten individuelle

Unterschiede bei den Titern protektiver Antikörper auf Immunevasionsmechanismen bei manchen Tieren hin (41).

### 1.2.3 Klinisches Erscheinungsbild der kutanen DD

DD stellt sich als eine infektiöse, ulzerative, und in gewissen Stadien, schmerzhaftes Hauterkrankung dar, welche vor allem die Haut unmittelbar über dem Klauenhorn plantar/palmar, dorsal und auch im Zwischenzehenspalt betrifft (9, 12, 6). Döpfer et al. (1994) hat das sogenannte „M-Scoring System“ (M steht dabei für "Mortellaro") entwickelt, welches dabei hilft, die verschiedenen klinischen Stadien von DD zu beschreiben (7). Im Jahr 2020 wurde von ICAR eine Online-Broschüre publiziert, welche schriftlich und bildlich die verschiedenen M-Stadien im Detail beschreibt (8).

**M0:** Gesunde Haut; keine Anzeichen von DD.

**M1:** Frühstadium von DD; Läsion 0,5 – 2 cm im Durchmesser; oftmals noch nicht schmerzhaft, daher häufig keine Lahmheit damit einhergehend; M1-Stadien können lange vorherrschend sein, bis es dann letztendlich zur Entwicklung des akuten, ulzerativen M2-Stadiums kommt.

**M2:** Akutes, ulzeratives, bei Palpation schmerzhaftes Stadium der Erkrankung an der Klauenhaut mit Läsionen > 2 cm im Durchmesser. Aufgrund der Schmerzhaftigkeit meist mit Lahmheit einhergehend; vorwiegend Lahmheitsgrad 2 – 3 beurteilt nach Sprecher *et. al.* (1997). Die Läsionen können ein Ausmaß von 7–10 cm erreichen; Nach Reinigung der betroffenen Stelle stellt sich die pathologische Veränderung leuchtend rot mit „erdbeerartiger“ leicht höckeriger Oberfläche dar. M2 Stadien liegen auch immer dann vor, wenn die Sohlen- oder Wandlederhaut frei liegt und sogenannte DD-assoziierte Klauenhornläsionen (Sohlengeschwüre, Sohlenspitzeneschwüre, Weiße-Linie-Abszesse, perforierende Hornspalten) vorliegen (42–44).

**M3:** Übergangsstadium; 1–2 Tage nach Beginn der Behandlung verändert sich die Läsion. Die M3-Läsion ist von einer Kruste bedeckt und bei Palpation bereits deutlich weniger schmerzhaft als das M2-Stadium.

**M4:** Chronisches Stadium der DD mit grau-braun-weißer und typischer hyperkeratotischer Oberfläche umgeben von einem hyperkeratotischen Wall. Die M4-Läsion ist von Epithel überzogen, deutlich kleiner und nicht mehr schmerzhaft. M4-Läsionen können häufig über längere Zeit (einige Wochen) vorliegen.

**M4.1:** Hierbei handelt es sich ebenfalls um ein chronisches Stadium der DD, der Unterschied zum reinen M4-Stadium ist jedoch, dass im M4.1-Stadium wieder eine kleine M1-Läsion mittig

oder randständig in der M4-Läsion vorliegt. Das M4.1-Stadium spielt neben dem M4-Stadium eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des Zyklus der Dermatitis-digitalis-Infektion (7, 8).

Neben den üblichen Lokalisationen der verschiedenen M-Stadien über dem Weichballen und dorsal an der Krone treten DD-Läsionen auch häufig an der Haut des Zwischenzehenspaltes auf. Hierbei wird häufig beobachtet, dass DD einer Limax, einer bindegewebigen, proliferativen Zubildung im Zwischenklauenspalt, aufsitzt (13, 8). Kofler et al. (2013) konnten signifikante Korrelationen hinsichtlich des Auftretens von DD und dem Vorhandensein einer Limax nachweisen: So betrug der Korrelationskoeffizient ( $r$ ) für akute DD und dem Vorliegen einer Limax 0,81 und der Korrelationskoeffizient ( $r$ ) für chronische DD und dem Vorliegen eines Tyloms 0,71.

#### **1.2.4 Diagnosestellung und Differenzialdiagnose der kutanen DD**

Häufig ist bereits die klinische Adspektion ausreichend, um die Diagnose DD sicher stellen zu können, zum Beispiel im Melkstand nach Reinigung der Klauen mittels Wasser, oder unter Verwendung eines schwenkbaren Spiegels (45). Die zuverlässigste Diagnosemöglichkeit für DD ist die Untersuchung der Klauen nach Reinigung der Klauen im Klauenpflegestand, da hierbei selbst kleinste Läsionen im Interdigitalspalt mit Hilfe einer Klauenspreizzange erkannt werden können. Beim Erkennen von DD achtet man auf das typische morphologische Erscheinungsbild, wie oben bereits beschrieben, und auch auf den typischen, penetranten, faulig-süßlichen Geruch, der von akuten DD-Läsionen ausgeht (13, 8).

In Zweifelsfällen kann ein Erregernachweis mittels PCR auf DD-spezifische Treponemen durchgeführt werden. Hierbei entnimmt man mithilfe einer Biopsiestanze eine tiefe Gewebeprobe, extrahiert daraus DNS und kann letztere im Anschluss qualitativ und quantitativ auf die Anwesenheit von Treponemen-DNS untersuchen (46–48, 21). Differenzialdiagnostisch müssen Klauenhauterkrankungen anderer Genese, wie zum Beispiel nichtinfektiöse Hautekzeme oder Dermatitis, die etwa durch eine Photosensibilitätsreaktion induziert sind, in Betracht gezogen werden. Auch Hautreaktionen aufgrund von Kontakt mit Desinfektionsmitteln oder Brandkalk müssen bedacht werden. Und systemische Infektionskrankheiten wie Bovine Virusdiarrhoe/Mucosal Disease, Maul- und Klauenseuche, Blauzungenkrankheit und Bösartiges Katarrhalfieber können ebenfalls u.a. zu Veränderungen an der Haut im Klauenbereich führen (13).

### 1.3 Dermatitis digitalis-assoziierte Klauenhornläsionen

#### 1.3.1 Klinisches Erscheinungsbild der DD-assoziierten Klauenhornläsionen

Seit mehr als 15 Jahren wird weltweit und auch in Österreich zunehmend eine neue Erscheinungsform der DD in Milchviehbetrieben mit endemischer DD-Infektion beobachtet, welche in den frühen Publikationen als „nicht-heilende“ Klauenhornläsionen bezeichnet wurden (49, 42, 50, 51). Dabei wird die bei Weiße-Linie-Abszessen, Sohlengeschwüren, Sohlenspitzen- und Sohlenspitzennekrose und penetrierenden axialen, abaxialen oder dorsalen Hornspalten freiliegende Lederhaut an Sohle und Wand der Klaue mit den überall im Lauf- und Liegebereich vorhandenen DD-spezifischen Bakterien der Gattung *Treponema spp.* infiziert (49, 42, 50, 51, 8). In diesen Klauenhornläsionen mit offen liegender Lederhaut wurden dieselben spezifischen *Treponema spp.* mittels PCR nachgewiesen, wie man sie aus akuten DD-M2 Läsionen von der Klauenhaut nachweisen konnte (42, 48, 21). In späteren Publikationen setzte sich für diese sekundär mit *Treponema spp.*-infizierten Lederhautdefekten bei Klauenhornläsionen die nunmehr gültige Bezeichnung Dermatitis-digitalis-assoziierte Klauenhornläsionen durch, nachdem für diese Läsionen erfolgreiche Therapiemethoden entwickelt worden waren (51, 52, 8).

Kühe mit DD-assoziierten Klauenhornläsionen sind in vielen Milchvieh- und Mutterkuhbetrieben oft über viele Monate, ja sogar mehr als ein Jahr lang andauernd lahm, weil herkömmliche Behandlungsverfahren (Defekt freilegen, Klotz kleben), wie sie von Landwirten, Klauenpflegern und TierärztenInnen für gewöhnliche Weiße-Linie-Abszesse und Sohlengeschwüre ohne Beteiligung von DD-spezifischen Treponemen mit Erfolg angewandt werden, hierbei selten oder keine Heilungserfolge erzielen (49, 42, 50). Dadurch stellen diese über viele Monate bestehenden, schmerzhaften DD-assoziierten Klauenhornläsionen in vielen endemisch mit DD infizierten Herden ein absolut tierschutzrelevantes Problem dar (42, 21, 43), welches bei fachgerechter und evidenzbasierter Therapie dieser Läsionen durchaus vermieden werden könnte (52, 43, 53).

Bei allen diesen DD-assoziierten Klauenhornläsionen, bei denen über viele Monate bzw. sogar über ein Jahr lang eine chronische DD-Infektion im Bereich der Lederhaut abaxial, dorsal oder axial an der Hornwand und an der Lederhaut der Sohle vorliegt, liegt eine meist gering- bis mittelgradige, selten hochgradige, derbe und meist nicht schmerzhaft Schwellung im Bereich der Krone dorsal oder am Ballen abaxial/plantar vor, jeweils abhängig von der Lokalisation der Läsion (52, 44, 43). Diese deutlich vorhandene Schwellung an Krone/Ballen verleitet

möglicherweise zur vorschnellen Vermutung, dass das Klauenbein bzw. das Klauengelenk mitinfiziert sein könnten, wie es ja vielfach bei komplizierten Sohlengeschwüren und Weiße-Linie-Abszessen mit daraus resultierender eitriger Arthritis des Klauengelenkes in Betrieben ohne DD-Infektion typischerweise der Fall ist (54, 55).

### **1.3.2 Diagnosestellung und Differenzialdiagnose der DD-assoziierten Klauenhornläsionen**

Kühe in Betrieben mit endemischer DD-Infektion zeigen einen weiße-Linie-Abszess, ein Sohlengeschwür, ein Sohlenspitzeneschwür oder einen penetrierenden Hornspalt (axial, dorsal oder abaxial), wobei die Lederhaut freiliegt (42, 43). Dadurch werden diese Klauenhornläsionen mit freiliegender Lederhaut mit den überall im Betrieb vorhandenen DD-spezifischen *Treponema spp.* infiziert (42, 48). Bereits vor oder vielfach erst nach Entfernung des losen Horns mit dem Hufmesser sieht man eine hypergranulierende Lederhautveränderung, die in Form und Oberflächenbeschaffenheit der klassischen akuten DD-Läsion (M2-Stadium) an der Klauenhaut sehr ähnlich ist (44, 43). Diese Defekte sind sehr schmerzhaft, sie weisen zudem den typischen stinkenden „Mortellaro-Geruch“ auf, und betroffene Kühe zeigen in der Regel eine höhergradige Lahmheit im Vergleich zu Kühen mit akuter DD an der Klauenhaut (42, 43, 52). Da diese DD-assoziierten Klauenhornläsionen oftmals bereits seit vielen Monaten bestehen (42, 56) oder sogar seit über einem Jahr bestehen können (43), weisen betroffene Klauen, bei denen der Defekt im hinteren Wand- und Sohlenabschnitt lokalisiert ist, eine sehr hohe Trachtenhöhe auf, welche oftmals der Vorderwandlänge entspricht (Bockklaue) (57).

In Zweifelsfällen, bei denen das klinische Bild untypisch ist oder wenn aus anderen (juristischen) Gründen ein Nachweis der Erreger erforderlich sein sollte, kann man tiefe Gewebeproben entnehmen, diese bei -20°C tiefgefrieren und mittels qualitativer und quantitativer PCR auf DD-spezifische *Treponema spp.* in einem spezialisierten Labor (46, 42, 48) untersuchen lassen.

## **1.4 Eitrige, tiefe Klaueninfektionen beim Rind**

### **1.4.1 Infektionen der tiefen Beugesehne, des Klauensesambeines, des Klauenbeines, des Klauengelenkes und der Fesselbeugesehnenscheide**

Man unterscheidet einerseits nicht-infektiöse, druckbedingte Klauenhornerkrankungen und Klauenhauterkrankungen (58, 12). Klauenhornerkrankungen betreffen das Horn und die

darunter liegende Lederhaut an Sohle, Wand und Ballen. Dazu zählen Sohlenblutung, Doppelsohle, Sohlengeschwür, Sohlenspitzen- und Ballengeschwür, Weiße-Linie-Defekt, Weiße-Linie-Abszess, Hornspalt und Ballenfäule. Ursächlich sind hierfür primär übermäßige chronische Druckeinwirkungen von außen und/oder von innen infolge Absinkens des Klauenbeines im Rahmen der Klauenrehe (59, 58, 60, 61). Zu den Klauenhauterkrankungen zählen Limax, Dermatitis digitalis und Interdigitalphlegmone, wobei die beiden letzteren infektiöse Klauenerkrankungen darstellen (12).

Tiefe Infektionen an der Klaue ('Deep digital sepsis') entwickeln sich über einige Wochen hinweg ausgehend von den genannten Klauenhorn- und Klauenhauterkrankungen durch Fortschreiten der Infektion, so dass auch tiefer liegende Stützstrukturen wie die tiefe Beugesehne, das Tuberculum flexorium, das Klauensesambein, die Bursa podotrochlearis, die Klauenbeinspitze, das Klauengelenk und/oder die Fesselbeugesehnenscheide mit-erkranken, wenn die ursprünglichen Läsionen an der Lederhaut nicht fachgerecht behandelt wurden oder die Lahmheit zu spät erkannt wurde. Dabei ist immer eine mittel- bis hochgradige, wulstförmige, zirkuläre Schwellung an Krone und/oder am Weichballen, meist unilateral, vorhanden (62, 63, 54, 64).

Für die Infektion der genannten tiefen Stützstrukturen an der Klaue sind Eitererreger wie *Trueperella sp.*, *E. coli*, *Proteus sp.*, *Fusobacterium necrophorum*, *Bacteroides pyogenes*, *Streptococcus spp.* verantwortlich, welche nach und nach immer tiefer liegende Strukturen infizieren (65–67). Als ernsthafte Komplikationen entwickeln sich dadurch innerhalb von ca. 2 – 4 Wochen eitrige Arthritiden des Klauengelenkes, des Krongelenkes, umfangreiche Infektionen der Zehenknochen, und eine eitrige Tendovaginitis der Fesselbeugesehnenscheide (65, 62, 63, 68, 64).

#### **1.4.2 Zwischenklauenphlegmone**

Die Zwischenklauenphlegmone ist eine infektiöse bakterielle Klauenhauterkrankung bei welcher jedoch auch Management und Umweltfaktoren eine große Rolle in der Entstehung spielen (69, 70). Die ursächlichen infektiösen Komponenten sind dabei *Fusobacterium necrophorum* und *Dichelobacter nodosus*, wobei aber auch weitere Bakterien, wie zum Beispiel *Porphyromonas levii*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Prevotella intermedia* oder *Prevotella melaninogenica* einen Teil zur Entstehung, Ausbreitung und Komplikation der Krankheit beitragen (69–71).

*F. necrophorum* ist ein pleomorphes, stäbchenförmiges, gram-negatives, nicht sporenbildendes, anaerobes Bakterium. *F. necrophorum* ist ein opportunistisches Pathogen und ein

häufig vorkommender Bewohner der Mundhöhle, des Verdauungs- und des Urogenitaltraktes von Menschen und Tieren (72, 69, 71). Außerdem konnte das anaerobe Bakterium sehr häufig aus Abszessinhalten isoliert werden (72). Üblicherweise wird *F. necrophorum* in vier Biotypen eingeteilt: A, B, AB und C, wobei Biotyp AB von ovinen Abszessen isoliert werden konnte und den Biotypen A und B sehr ähnlich ist. Von Biotyp C ist bekannt, dass er nicht-pathogen ist, daher wurde dieser Biotyp auch *F. pseudonecrophorum* genannt. Biotyp A wird als *F. necrophorum ssp. necrophorum* und Biotyp B als *F. necrophorum ssp. funduliforme* bezeichnet (70, 72). Es ist außerdem bekannt, dass die Subspezies *F. necrophorum ssp. necrophorum* virulenter ist als die anderen beschriebenen Subspezies des Erregers. Die Virulenzfaktoren, welche die Pathogenität von *F. necrophorum ssp. necrophorum* erklären können, sind unter anderem Leukotoxine, Zytotoxine, endotoxische Lipopolysaccharide, Hämolyisin und Hämagglutinin (72, 70). Leukotoxin ist für Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Hepatozyten und Epithelzellen von Wiederkäuern zytotoxisch (72, 70). Die charakteristische Gewebsnekrose im Interdigitalspalt, welche bei dieser Erkrankung auftritt, scheint eine Folgeerscheinung der Einwirkung von Leukotoxin auf das Gewebe zu sein. *F. necrophorum ssp. necrophorum* besitzt deutlich stärkere hämolytische Eigenschaften und ist enzymatisch aktiver als *F. ssp. funduliforme* (73). *F. necrophorum* ist in der Lage, bovine Thrombozyten zu aggregieren, wodurch es in weiterer Folge zu Thrombozytopenie, disseminierter intravasaler Koagulopathie (DIC) und anderen koagulativen Effekten kommt (74).

Neben *F. necrophorum* spielt auch *Dichelobacter nodosus* eine wichtige Rolle in der Entstehung der Zwischenklauenphlegmone (70, 71). *D. nodosus* ist ein Gram-negatives, obligat anaerobes nicht sporenbildendes Bakterium, welches hervorragend in feuchtem, warmen Milieu gedeiht, welches etwa im Interdigitalspalt von Tieren vorherrschen kann (75, 76). *D. nodosus* ist außerdem auch das pathologische Agens der infektiösen Klauenentzündung beim Schaf, bekannt als "Moderhinke" (im englischen Sprachraum als „Ovine Foot Rot“ bezeichnet) (77). Vergleichende Sequenzanalysen haben ergeben, dass der Erreger eher mit *Escherichia coli* und *Pseudomonas sp.* verwandt ist, daher wurde das Bakterium in die neue Gattung *Dichelobacter* eingestuft (78).

Wie auch bei *F. necrophorum* ist es möglich, Isolate von *D. nodosus* als benigne oder virulent einzuteilen, je nachdem welche Gene von den jeweiligen Isolaten exprimiert werden. Die verschiedenen Gene kodieren dann entweder für thermolabile oder thermostabile Proteasen,

wobei es sich bei aprB2 um die thermolabile und bei aprV2 um die thermostabile Form dieser Proteasen handelt. Die thermostabilen Proteasen sind wesentlich an der gewebserstörenden Pathogenese der Moderhinke bzw. auch der Interdigitalnekrose beteiligt (75). Neben hitzestabileren Proteasen bei virulenten Stämmen von *D. nodosus* stellen Fimbrien, auch Pili genannt, einen Virulenzfaktor dar (79).

Neben der bakteriellen Komponente spielen prädisponierende Faktoren, wie zum Beispiel die oberflächliche Verletzung der interdigitalen Haut etwa durch Einstreu, die Mazeration der Haut durch ständig feuchten Untergrund und Kot, subakute Pansenazidose und Hitzestress eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Zwischenklauenphlegmone (69, 80)

Die klinischen Symptome umfassen eine symmetrische Schwellung des Kronsaums sowie der gesamten Zehe beider Klauen eines Fußes (meist an den Hintergliedmaßen), die Haut im Zwischenklauenspalt ist gerötet und vermehrt warm und oft kommt es aufgrund der Schwellung zur Spreizung der Klauen und später zu umfangreicher Nekrose der Haut und Unterhaut im Interdigitalspalt. Die erkrankten Tiere zeigen meist eine mittel- bis hochgradige Lahmheit. Diese Symptome treten innerhalb weniger Stunden auf, meist von einer Melkung zur nächsten (80). Auch eine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens der Tiere mit Krankheitsanzeichen wie Fieber, verminderte Fresslust und deutlich verringerte Milchleistung liegen oftmals vor (69). Die Zwischenklauenphlegmone kann klinisch gut diagnostiziert werden, jedoch sollte man eine gründliche Untersuchung an der aufgehobenen Gliedmaße bzw. im Klauenstand durchführen, um andere Erkrankungen, welche ebenfalls, allerdings eine unilaterale, zirkuläre Kronsaumschwellung hervorrufen, wie zum Beispiel eine eitrig-Entzündung des Klauengelenks ausgehend von einem Sohlengeschwür oder einem Weiße-Linie-Abszess sicher ausschließen zu können. Werden die erkrankten Tiere nicht rechtzeitig tierärztlich behandelt, besteht bei der Zwischenklauenphlegmone häufig die Gefahr, dass es zu einer Infektion des Klauengelenkes und/oder auch der Fesselbeugesehnscheide kommt, da die Gewebebarriere zwischen der Hautoberfläche im Zwischenzehenspalt und dem Klauengelenk nur ca. 10 mm beträgt (81, 69, 80).

Die verantwortlichen Keime *Fusobacterium necrophorum* und *Dichelobacter nodosus* sind oftmals sehr schwierig zu isolieren und anaerob zu kultivieren. Wesentlich schneller, kostengünstiger und sensitiver ist es, diese Bakterien mittels PCR aus Proben-DNS nachzuweisen. Bei Verwendung von spezifischen PCR-Primern kann man davon ausgehen, dass die Methode selbst wenige Moleküle des gesuchten, bakteriellen genetischen Materials

amplifizieren und damit nachweisen kann (82). Differentialdiagnostisch sind zum Beispiel eine infizierte Limax, DD an der Haut des Zwischenklauenspaltes, Schnittwunden mit Granulationsgewebekonstruktion oder nichtinfektiöse Hautekzeme durch Eiweißüberfütterung zu bedenken (69, 80).

### **1.5 Bakterielle Interferenz (Bakterieller Antagonismus)**

Die langjährige chirurgische Behandlung von DD-assoziierten Klauenhornläsionen (52, 44) zeigte erstaunlicherweise, dass, obwohl diese DD-assoziierten Klauenhornläsionen oft viele Monate bis zu über einem Jahr lang an der erkrankten Klaue vorlagen, nur äußerst selten tiefe Stützstrukturen der Klaue wie das Klauenbein, das Klauensesambein die tiefe Beugesehne am Ansatz und das Klauengelenk mitinfiziert waren. Eine eitrige Infektion dieser genannten Strukturen ist üblicherweise immer die Regel, wenn Lederhauterkrankungen an der Sohle und Wand der Klaue nicht rechtzeitig und fachgerecht therapiert werden (54, 83, 55). Die vermutete aber bislang nicht überprüfte Erklärung dafür könnte lauten, dass die DD-spezifischen *Treponema spp.* die eiterbildenden Bakterien verdrängen, d.h., dass eine Interferenz bzw. ein Antagonismus zwischen den DD-spezifischen *Treponema spp.* und den eiterbildenden Bakterien während des Prozesses der Kolonisation stattfindet (84–86). Durch diese vermutete Bakterieninterferenz könnten die typischen Eitererreger wie *Trueperella sp.*, *E. coli*, *Proteus spp.*, *Fusobacterium necrophorum*, *Bacteroides pyogenes*, *Streptococcus spp.* (65–67) verdrängt und daran gehindert werden, in tiefer liegende Gewebestrukturen vorzudringen.

Bei geschwürartigen, akuten DD-Läsionen (M2) im Bereich der Klauenhaut ist aus der wissenschaftlichen Literatur bekannt, dass die DD-spezifischen *Treponema spp.* ausschließlich die Epidermis und die Lederhaut infizieren, nicht aber in tiefere Gewebeschichten vordringen (9, 15, 22). Bei der Behandlung von akuten M2-Stadien muss immer eine gründliche Reinigung der Klauen, sowie der DD-Läsionen mit Fließwasser vorausgehen, um den anhaftenden Biofilm, welcher für anaerobe Verhältnisse sorgt, restlos zu entfernen (16). Nur dadurch ist gewährleistet, dass lokal applizierte Medikamente überhaupt zur Wirkung gelangen (87–90).

## 2 Wissenschaftliche Fragestellung

Die Fragestellung für die geplante ex-vivo-Studie lautete: Kann mittels der Auswertung der qualitativen PCR aus Proben von BDD-assoziierten Klauenhornläsionen bzw. von Gewebeproben von eitrigen tiefen Klaueninfektionen nachgewiesen werden, dass die jeweils anderen Bakteriengruppen (Eitererreger bzw. BDD-spezifische *Treponema spp.*) dabei entweder gar nicht nachweisbar sind oder nur in sehr geringer Zahl, sodass man eine Interferenz vermuten könnte?

### Hypothesen:

- Die 1. Hypothese für die geplante ex-vivo-Studie lautete: Bei DD-assoziierten Klauenhornläsionen können mittels qualitativer PCR überwiegend nur BDD-spezifische *Treponema spp.* in entsprechenden Gewebeproben nachgewiesen werden.
- Die 2. Hypothese für die geplante ex-vivo-Studie lautete: Bei tiefen, eitrigen Klaueninfektionen mit Eitererregern können mittels qualitativer PCR keine DD-spezifischen *Treponema spp.* nachgewiesen werden, sondern überwiegend spezifische Eitererreger in entsprechenden Gewebeproben nachgewiesen werden (65–67).

Das Ziel dieser ex-vivo-Studie ist es, diese Hypothesen zu testen und diese Fragestellung zu beantworten. Es soll eine begründete Erklärung, für die in der Praxis häufig gemachte Beobachtung geliefert werden, warum viele DD-assoziierte Klauenhornläsionen häufig über viele Monate, sogar bis hin zu einem Jahr bestehen, ohne dass es kaum jemals zu einer Infektion tiefer Stützstrukturen der Klaue, wie Klauenbein, tiefer Beugesehen oder Klauengelenk kommt.

### **3 Material und Methodik**

#### **3.1 Probenmaterial**

Insgesamt wurden 36 Gewebeproben von 26 Rindern aus österreichischen Betrieben in die Studie aufgenommen. Bei den Rindern handelte es sich um zugewiesene Patienten des Klinischen Zentrums für Wiederkäuer- und Kamelidenmedizin der Veterinärmedizinischen Universität Wien.

Von den insgesamt 36 Gewebeproben stammten 18 Proben von 11 Kühen mit tiefen, eitrigen Klaueninfektionen der Klaue, wobei laut Auskunft der Tierhalter die Herkunftsbetriebe frei von Dermatitis digitalis waren.

Die anderen 18 Gewebeproben stammten von 15 Kühen mit Dermatitis-digitalis-assoziierten Klauenhornläsionen. Die Diagnose dieser DD-assoziierten Klauenhornläsionen konnte an der Klinik aufgrund der vorliegenden klinischen Befunde bei diesen Patienten gestellt werden. Alle diese Lederhautläsionen zeigten den charakteristischen „Dermatitis-digitalis“-Geruch und zudem wiesen einige dieser Kühe auch noch Frühstadien (M1), akute Stadien (M2) oder chronische Stadien der DD (M4, M4.1) an der Klauenhaut an einer ihrer acht Klauen auf.

Die jeweiligen Gewebeproben wurden im Zuge eines für die Behandlung notwendigen chirurgischen Eingriffes (Resektion des Klauensesambeines und der tiefen Beugesehne am Ansatz, Klauenamputation, Resektion der Beugesehnen an einer der beiden Fesselbeugesehnen-scheiden bei Rinderpatienten mit tiefen Klaueninfektionen) oder im Zuge des notwendigen chirurgischen Wunddebridements im Jahr 2023 gewonnen.

Jede einzelne Probe wurde entweder intraoperativ oder postoperativ (bei Amputation) mit jeweils einer neuen, sterilen Skalpellklinge aus dem resezierten Gewebematerial entnommen und in ein steriles Plastikgefäß gegeben. Die Probe wurde sofort tiefgefroren und bei -20°C bis zur DNS-Extraktion, gelagert. Die schriftliche Einwilligung seitens der TierbesitzerInnen für die wissenschaftliche Nutzung des Probenmaterials liegt vor.

In den folgenden beiden Tabellen (Tab. 1, Tab. 2) sind die Tier- und Probennummern und eine Kurzbeschreibung von Diagnose und Lokalisation der jeweiligen Klauenerkrankungen angegeben. Darüber hinaus sind die jeweiligen Konzentrationen der aus den Proben gewonnenen DNS-Isolate in ng/µl angeführt.

Tab. 1: Auflistung der Herkunft der 18 Gewebeproben von 11 Rinderpatienten mit eitrigen, tiefen Klaueninfektionen

Proben-Nr.	ng DNS/ $\mu$ l	Diagnose und Lokalisation
1	63	WLA mit eitriger Arthritis Klauengelenk, Hi. li. lat.
2	208	Knocheninfektion der Tibia nach Osteosynthese, Hi. re.
3	124	WLA mit Nekrose Klauensesambein, Ansatz TBS, Hi. re. lat.
4a	119	SG mit eitriger Arthritis Klauengelenk, Hi. li. lat.
4b	175	
5a	506	SG mit eitriger Arthritis Klauengelenk, Hi. re. lat. mit retroartikulären Abszessen, Hi. re. lat.; aus Abszessgewebe
5b	77	Infizierte Wunde dorsal an Krone mit eitriger Arthritis Klauengelenk, Hi. re. med.; aus infizierter Wunde
6a	208	SG mit eitriger Arthritis Klauengelenk, Hi. re. lat.; aus Eiter hinter SG lat.
6b	365	SG mit eitriger Arthritis Klauengelenk, Hi. li. med.; aus Eiter hinter SG med.
7a	176	WLA mit eitriger Arthritis Klauengelenk, Hi. li. med.; ausgehend von WLA; aus Eiter hinter WLA
7b	72	WLA mit eitriger Arthritis Klauengelenk, Hi. li. med.; aus Eiter hinter WLA
8a	208	WLA mit eitrig-fibrinöser Arthritis Klauengelenk Hi. re. lat. + Eitrig-fibrinöse Tendovaginitis lat. FBSS Hi. re.; Fibrin-Eitergewebe Hi. re. lat. aus Klauengelenk
8b	64	WLA mit eitrig-fibrinöser Arthritis Klauengelenk Hi. re. lat. + Eitrig-fibrinöse Tendovaginitis lat. FBSS Hi. re.; Fibrin-Eitergewebe Hi. re. lat. aus lat. FBSS
9a	163	WLA mit Nekrose der TBS und des Tub. flexorium und septische, seröse Arthritis Hi. re. lat; Bursitis praecarpalis vorne beidseits
9b	110	
9c	108	
10	259	Infizierte interdigitale Schnittwunde mit eitrig-nekrotisierender Entzündung Klauengelenk Hi. re. lat.
11	91	

WLA: Weiße-Linie-Abszess; Hi.: Hinten; li.: links; lat.: lateral; re.: rechts; med.: medial; TBS: Tiefe Beugesehne; SG: Sohlengeschwür; FBSS: Fesselbeugesehnnenscheide; Tub. flexorium: Tuberculum flexorium; vo.: vorne.

Tab. 2: Auflistung der Herkunft der 18 Gewebeproben von 15 Rinderpatienten mit Dermatitis digitalis-assoziierten Klauenhornkrankungen

Proben-Nr.	ng DNS/ $\mu$ l	Diagnose und Lokalisation
A1	28	DD-HSA, Hi. re. lat. Klaue
A2	24	DD-SG, Hi. li. lat. Klaue
B	63	DD-WLA, Hi. re. lat. Klaue
C	48	DD-SG, Hi. li. lat. Klaue
D1	152	DD-WLA, Hi. li. lat. Klaue
D2	10	DD-SG, Hi. re. lat. Klaue
E	45	DD-HSA und DD-SSG, Hi. re. lat. Klaue
F	50	DD-SG, Hi. li. lat. Klaue
G	70	DD unter Horn der Afterklaue, Hi. re. med. Klaue
H	47	DD-WLA, Vo. li. med. Klaue
I	105	DD-HSA, Hi. re. lat. Klaue
J1	65	DD-SG, Hi. li. lat. Klaue
J2	64	DD-HSA, Hi. re. med. Klaue
K	54	DD-HSA, Hi. re. lat. Klaue
L	42	DD-SSG, Hi. re. med. Klaue
M	106	DD-WLA, Hi. re. lat. Klaue
N	158	DD-HSA, Hi. re. lat. Klaue
O	135	DD-SG, Hi. re. lat. Klaue

DD-HSA: Dermatitis digitalis-assoziiertes axialer Hornspalt; Hi.: Hinten; re.: rechts; lat.: lateral; DD-SG: Dermatitis digitalis-assoziiertes Sohlengeschwür; li.: links; DD-SSG: Dermatitis digitalis-assoziiertes Sohlenspitzen-geschwür; DD-WLA: Dermatitis digitalis-assoziiertes Weiße-Linie-Abszess; DD: Dermatitis digitalis; med.: medial; Vo.: Vorne.

### 3.2 DNS-Extraktion

Insgesamt wurden 18 Proben von Kühen mit eitrigen tiefen Klaueninfektionen und 18 Proben von Kühen mit DD-assoziierten Klauenhornläsionen prozessiert. Die DNS-Extraktion erfolgte für jede Probe mittels eines DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) nach den Instruktionen des Herstellers. Im Wesentlichen wurde ein kleines Gewebeatiquot mit

einem maximalen Volumen von 3 mm<sup>3</sup> von jeder Probe entnommen und bei 56°C über Nacht in einer Pufferlösung mit Proteinase K lysiert. Nach Fällung und Abtrennung der Zellreste wurde die jeweilige DNS dann über eine Säule gereinigt und mit jeweils 150 µl TE-Puffer in 1,5 ml-Reaktionsgefäße hinein eluiert.

### **3.3 DNS-Validierung**

Um den Erfolg der DNS-Extraktion mittels des DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) bestimmen zu können, wurde zunächst eine spektrophotometrische Messung der einzelnen extrahierten DNS-Isolate mit Hilfe eines NanoDrop-Spektrophotometers (Thermo Fisher Scientific, Wien, Österreich) durchgeführt. Die erhaltenen DNS-Konzentrationen sind in den Tabellen 1 und 2 angegeben. Im Anschluss wurde eine  $\beta$ -Aktin-PCR durchgeführt.

### **3.4 Beta-Aktin-PCR**

Das  $\beta$ -Aktin ist, neben den beiden anderen Isoformen  $\alpha$  und  $\gamma$ , das häufigste Protein in eukaryotischen Zellen und seine Gensequenz ist zwischen den Arten höchst konserviert. Das Protein und seine Isoformen spielen eine sehr wichtige Rolle in der Zellbeweglichkeit und der Funktionsweise des Zytoskeletts. Die entsprechenden  $\beta$ -Aktin-Gene sind in jeder Zelle in unterschiedlicher Anzahl/Spezies vorhanden und zählen daher zu den so genannten "house-keeping genes" (91).

Die  $\beta$ -Aktin-PCR wurde durchgeführt, um sicherzustellen, dass die erhaltenen DNS-Isolate PCR-kompatibel sind, d.h. keine Verunreinigungen wie beispielsweise Melanin, enthalten sind, welche die Amplifikationsreaktion, die durch eine DNS-Polymerase bewerkstelligt wird, inhibieren könnten. Die  $\beta$ -Aktin-PCR erfolgte auf Basis eines etablierten Protokolls (92) und lieferte für alle Proben ein positives Ergebnis.

### **3.5 Treponemen-PCR und Sequenzanalyse**

Nach der erfolgreichen Validierung der DNS-Isolate aller Gewebeproben, d.h. sowohl von Proben aus DD-assoziierten Klauenhornläsionen als auch aus Proben von tiefen eitrigem Klauenläsionen, wurden diese mittels PCR auf Anwesenheit von Treponemen-DNS getestet. Dazu wurde eine TT-PCR (Total Treponemal PCR) auf Basis des Protokolls von Moe et. al. (2010) mit Phusion Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Wien, Österreich) durchgeführt (93). Die Reaktionsmischung pro DNS-Template setzte sich, wie in Tab. 3 dargestellt, zusammen.

Tab. 3: TT-PCR-Reaktionsgemisch pro Probe

Zutat	Hersteller	Volumen
Aqua destillata	Thermo Fisher Scientific, Wien Österreich	12,8 µl
5x HF-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Wien Österreich	4 µl
DMSO	Merck, Wien, Österreich	0,6 µl
dNTPs (10 mM)	Thermo Fisher Scientific, Wien Österreich	0,4 µl
Vorwärtsprimer (5'TT) (100 pmol/µl)	Eurofins, Wien, Österreich	0,5 µl
Rückwärtsprimer (3'TT) (100 pmol/µl)	Eurofins, Wien Österreich	0,5 µl
Phusion Hotstart Polymerase (0,5 Units)	Thermo Fisher Scientific, Wien Österreich	0,2 µl
Template		1 µl
Gesamtvolumen		20 µl

Die Amplifikationen wurden in einem Life Eco Thermocycler von Biozym (Hessisch-Oldendorf, Deutschland) durchgeführt. Es wurden jeweils 10 Reaktionen pro Durchgang realisiert. In jedem PCR-Durchgang waren eine Positivkontrolle (Treponemen-DNS-positive Dermatitis digitalis DNS), eine Negativkontrolle (gesunde Klauenhaut-DNS) und eine Wasserkontrolle (steriles Wasser als Template) inkludiert, um die Authentizität der Ergebnisse zu sichern. Das PCR-Programm startete zunächst mit einem Denaturierungsschritt {2 Minuten bei 98°C}, gefolgt von sieben Amplifikationszyklen {98°C für 15s, 72°C – 69°C für 30s, 72°C für 30s}, bei denen die Primer-Annealingtemperatur um jeweils 0,5°C gesenkt wurde. Weitere 40 Amplifikationszyklen liefen nach dem folgenden Temperaturschema ab: {98°C für 15s, 69°C für 30s, 72°C für 30s}. Der abschließende Schritt lief dann bei {72°C für 5min} ab und danach wurde die Probe auf 15°C gekühlt und bei dieser Temperatur so lange gehalten, bis sie für die weitere Verwendung aus dem Thermocycler entnommen wurde.

Für die PCR genutzt wurden von Moe et al. (2010) entworfene Primer mit den Bezeichnungen 5'TT und 3'TT, wobei die Sequenzen sich folgendermaßen darstellten: Der 5'TT-Primer hatte die Sequenz (5'-TTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAC-3'). Der 3'TT-Primer hatte die Sequenz (5'-GTCRYMGGCAGTTCCGCCWGAGTC-3'). Es handelte sich hier um consensus „Wobble Primer“, die in einer hoch-konservierten Region des 16S-rRNS-Gens primen und sich

für die Amplifikation der DNS unterschiedlicher *Treponema spp.* und anderer, genetisch eng verwandter Bakterien eignen (93).

Nach jeder PCR wurden die Produkte auf ein 1,5%iges TAE-Agarosegel aufgetragen, gelelektrophoretisch bei 130 V aufgetrennt und anschließend via Ethidiumbromid-Färbung mit UV-Licht visualisiert und fotografiert. Zum Schätzen der Produktgröße diente eine 100-bp-DNS-Leiter (Thermo Fisher Scientific, Wien, Österreich). Amplikons korrekter Größe (657 bp) wurden mit einem Skalpell aus dem jeweiligen Gel ausgeschnitten und mit Hilfe eines DNS-Gelextraktionskits (Thermo Fisher Scientific, Wien, Österreich) gemäß dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Anschließend wurden die aufgereinigten PCR-Produkte von der Firma Eurofins (Wien, Österreich) bidirektional sequenziert.

Erhaltene 5'- und 3'-Sequenzen wurden zunächst paarweise miteinander und anschließend mit allen in der GenBank hinterlegten Bakterien-DNS-Sequenzen elektronisch verglichen. Hierzu diente das frei zugängliche Programm BLAST des NIH (National Library of Medicine). ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)).

Im Ergebnisteil ist für jedes erhaltene Amplikon jene GenBank-Sequenz angegeben, mit welcher es genetisch am besten übereinstimmte und auch der Prozentsatz dieser Homologie ist für jedes Produkt angegeben (siehe Tabellen 4 und 5).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Nachgewiesene *Treponema ssp.* in DD-assoziierten Klauenhornläsionen

Alle aus DD-Läsionen extrahierten DNS-Isolate konnten für den Nachweis von Treponemen-DNS herangezogen werden, da sie PCR-positiv für  $\beta$ -Aktin getestet hatten und somit PCR-kompatibel waren.

Tabelle 4 stellt sämtliche Ergebnisse dar, die mittels TT-PCR und anschließender Sequenzanalyse erhalten wurden. In 8 von 15 Rindern mit DD-assoziierten Läsionen konnten Treponema-DNS-Sequenzen eindeutig nachgewiesen werden, wobei *T. pedis* am häufigsten identifiziert wurde.

Tab. 4 Sequenzierungsergebnisse der 18 Gewebeproben von DD-assoziierten Klauenhornläsionen bei 15 Rindern im Hinblick auf jenes Bakterium, welches in den Proben im größten Überschuss vorlag

	ID	ng DNS/ $\mu$ l	PCR		Bakterien-DNS, die mittels TT-PCR amplifiziert wurde (% max. Homologie)
			$\beta$ -Akt	TT	
Gewebeproben aus DD-assoziierten Klauenhornläsionen	A1	28	+	+	Uncultured bacterium clone 071041_137 ID: JQ468350.1 (95%)
	A2	24	+	+	<i>Solitalea sp.</i> strain GDC8 ID: OR497504.1 (100%)
	B	63	+	+	<i>Bacteroidia bacterium</i> feline oral taxon 312 ID: KM462160.1 (89%)
	C	48	+	+	<i>Treponema sp.</i> PT1 ID: AM942445.1 (97%)
	D1	152	+	+	<i>Bacteroidia bacterium</i> feline oral taxon 312 ID: KM462160.1 (95%)
	D2	10	+	+	Uncultured <i>Bacteroidetes bacterium</i> clone P-02 ID: GQ424167.1 (98%)
	E	45	+	+	<i>Treponema pedis</i> strain DD3F ID: KR025849.1 (98%)
	F	50	+	+	<i>Bacteroidia bacterium</i> feline oral taxon 312 ID: KM462160.1 (89%)
	G	70	+	+	<i>Bacteroidia bacterium</i> feline oral taxon 312 ID: KM462160.1 (98%)
	H	47	+	+	<i>Treponema pedis</i> strain G9JD ID: KJ206531.1 (98%)
	I	105	+	+	<i>Treponema pedis</i> strain DD3F ID: KR025849.1 (99%)
	J1	65	+	+	Uncultured bacterium clone 615d ID: MW726636.1 (87%)
	J2	64	+	+	<i>Treponema sp.</i> OMZ 788 chromosome ID: CP051199.1 (99%)
	K	54	+	+	Uncultured <i>Treponema sp.</i> clone 10B549 ID: FJ976308.1 (99%)
	L	42	+	+	<i>Treponema sp.</i> OMZ 788 chromosome ID: CP051199.1 (96%)
	M	106	+	+	<i>Treponema phagedenis</i> strain 1498med ID: KR025851.1 (99%)
	N	158	+	+	<i>Bacteroidia bacterium</i> feline oral taxon 312 ID: KM462160.1 (88%)
	O	135	+	+	<i>Bacteroidia bacterium</i> feline oral taxon 312 ID: KM462160.1 (94%)

ng DNS: Nanogramm Desoxyribonukleinsäure,  $\mu$ l: Mikroliter,  $\beta$ -Aktin: Beta-Aktin, TT PCR: Total Treponemal PCR

Daneben wurde *T. phagedenis*-DNS detektiert, sowie DNS von weniger gut charakterisierten *Treponema ssp.* (PT1 bzw. OMZ788). In sechs weiteren Fällen wurde ein felines, orales Bakterium (*Bacteroidia bacterium*) vorrangig amplifiziert, welches bislang noch nicht näher charakterisiert ist (Tab. 4). Dieses Ergebnis schließt die simultane Anwesenheit von Treponemen in diesen sechs Proben keinesfalls aus, da die PCR in der Regel jene DNS amplifiziert, die in der höchsten Konzentration in einer Probe vorhanden ist und am besten vom Detektionssystem "erkannt" wird.

#### **4.2 Nachgewiesene Bakterien in eitrigen, tiefen Klaueninfektionen**

Obwohl auch diese Proben  $\beta$ -Aktin-PCR-positiv getestet hatten und das Screening mit einem vorrangig Treponemen-spezifischen PCR-System (TT-PCR) durchgeführt wurde, konnte aus keiner einzigen Probe *Treponema ssp.*-DNS amplifiziert werden. Die Verwendung der TT-PCR hatte auch zur Folge, dass 7/18 DNS-Proben negativ testeten.

In positiven Fällen wurden DNS-Sequenzen von Bakterien vervielfältigt, die aufgrund ausreichender Sequenzhomologie eine spezifische TT-Primer-Bindung und damit Amplifikation erlaubten. Dazu gehörten typische Eitererreger wie *Fusobacterium necrophorum ssp. necrophorum* und ein felines orales Bakterium. Daneben wurden auffällig häufig Sequenzen nachgewiesen, die zu 97 bis 99% mit *Parvimonas micra*-Stamm KCOM 3168 identisch waren.

Tabelle 5 präsentiert die Ergebnisse des TT-PCR-Screenings von Proben, die aus tiefen, eitrigen Klauenläsionen erhalten wurden, sowie die Sequenzierungsergebnisse. Angegeben ist jener Bakterienstamm inklusive GenBank-Identifikationsnummer, der mit der amplifizierten Sequenz die jeweils größte genetische Homologie aufwies. Letztere ist in Prozent in Klammer angegeben (Tab. 5).

Tab. 5: Sequenzierungsergebnisse der 18 Gewebeproben von 11 Rindern mit eitrigen, tiefen Klaueninfektionen im Hinblick auf jenes Bakterium, welches in den Proben im größten Überschuss vorlag.

	ID	ng DNS/ $\mu$ l	PCR		Bakterien-DNS, die mittels TT-PCR amplifiziert wurde (% max. Homologie)
			$\beta$ -Akt	TT	
Gewebeproben aus eitrigen tiefen Klaueninfektionen	1	63	+	+	Keine Sequenz erhalten
	2	208	+	-	-
	3	124	+	+	<i>Parvimonas micra</i> strain KCOM 3168 ID: MT323076.1 (99%)
	4a	119	+	-	-
	4b	175	+	-	-
	5a	506	+	+	<i>Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum</i> ID: OR145050.1 (95%)
	5b	77	+	+	<i>Bacteroidia bacterium feline oral taxon 312</i> ID: KM462160.1 (89%)
	6a	208	+	+	<i>Parvimonas micra</i> strain KCOM 3168 ID: MT323076.1 (98%)
	6b	365	+	+	<i>Parvimonas micra</i> strain KCOM 3168 ID: MT323076.1 (98%)
	7a	176	+	+	<i>Parvimonas micra</i> strain KCOM 3168 ID: MT323076.1 (99%)
	7b	72	+	+	<i>Parvimonas micra</i> strain KCOM 3168 ID: MT323076.1 (98%)
	8a	208	+	+	<i>Parvimonas micra</i> strain KCOM 3168 ID: MT323076.1 (97%)
	8b	64	+	-	-
	9a	163	+	-	-
	9b	110	+	+	<i>Parvimonas micra</i> strain KCOM 3168 ID: MT323076.1 (99%)
	9c	108	+	-	-
	10	259	+	+	Uncultured Bacteroidetes bacterium clone P-02 ID: GQ424167.1 (99%)
	11	91	+	-	-

## 5 Diskussion

Wie im Kapitel „wissenschaftliche Fragestellung“ bereits erläutert, sollte mit der Durchführung von qualitativen PCR-Tests herausgefunden werden, wie sich das Vorkommen von *Treponema spp.* in Dermatitis digitalis-assoziierten Klauenhornläsionen im Vergleich zu eitrigen, tiefen Klaueninfektionen darstellt. Hierzu wurde eine consensus-"Total-Treponemal"-PCR dazu verwendet, die Proben auf die Anwesenheit von DD-spezifischer Treponemen-DNS zu testen, und mittels dieser qualitativen TT-PCR wurde jeweils DNS jenes Bakteriums amplifiziert, welches in den Proben vermutlich im größten Überschuss vorlag. Anschließend an diesen Schritt wurden die Bakterien durch Sequenzierung und BLAST-Analyse identifiziert.

Die Reaktionen wurden in mehreren Durchgängen à jeweils etwa sieben Proben und drei Kontrollen durchgeführt, um das Risiko einer Kontamination zu minimieren und ein qualitativ äußerst hochwertiges Ergebnis zu erhalten. Die für die Positiv-, Negativ- und Wasserkontrolle jeweils erhaltenen korrekten Ergebnisse unterstreichen, dass alle Reaktionen experimentell einwandfrei durchgeführt worden waren.

In den Proben der DD-assoziierten Klauenhornläsionen wurde mehrheitlich Treponemen-DNS nachgewiesen. Diese Ergebnisse unterstreichen einmal mehr die ätiologische Assoziation von Treponemen mit boviner DD. Bei den nachgewiesenen Treponemen handelte es sich in erster Linie um *T. pedis*. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da *T. pedis* mittlerweile als ein wesentlicher Verursacher von DD identifiziert werden konnte (94, 46).

Bei den Proben von tiefen, eitrigem Klaueninfektionen jedoch wurden, wie in Tab. 5 veranschaulicht, keine Treponemen nachgewiesen. Vielmehr konnte man *Fusobacterium necrophorum ssp. necrophorum*, ein Bakterium namens *Parvimonas micra* und wiederum ein felines, orales Bakterium identifizieren.

In einer Studie von Rachidi et. al. aus dem Jahr 2022 wurden ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der vorkommenden Erreger in kutanen DD-Läsionen beschrieben. So wurde *Treponema spp.* ebenfalls als Haupterregerspezies in DD-Läsionen nachgewiesen, wobei hier bei 93% aller Proben vor lokaler Therapie und bei 75% aller Proben nach Abschluss der Therapie *Treponema spp.* nachgewiesen werden konnten. Im Hinblick auf Eitererreger, wie zum Beispiel *Fusobacterium necrophorum* wurde dieses Bakterium bei 15% der DD-Läsionen vor und 4% der DD-Läsionen nach Therapie nachgewiesen. Interessant ist, wie sich das Vorkommen von *Dichelobacter nodosus* in dieser Studie darstellte: Der Erreger konnte in keiner der DD-Läsionen vor der Therapie nachgewiesen werden, in 46% der Fälle nach der Therapie war das Bakterium aber sehr wohl nachweisbar (67). Es gibt also Parallelen im Nachweis von Treponemen aus DD-Läsionen, ein Unterschied ist aber erkennbar bei der Detektion von Eitererregern in DD-Läsionen. Rachidi et al. (2022) konnten im Gegensatz zu unseren Ergebnissen sehr wohl Eitererreger, wie beispielsweise *F.necrophorum* oder *D. nodosus*, in DD-assoziierten Klauenhornläsionen nachweisen.

Der Umstand, dass bei den DD-assoziierten Klauenhornläsionen mehrheitlich Treponemen-DNS nachgewiesen ist insofern interessant, weil somit die aufgestellte Hypothese 1 in der wissenschaftlichen Fragestellung bestätigt werden kann.

In dieser Hypothese wollte man mittels der vorliegenden ex-vivo-Studie überprüfen, ob bei DD-assoziierten Klauenhornläsionen mittels qualitativer PCR überwiegend nur DD-spezifische *Treponema spp.* in den entsprechenden Gewebeproben nachgewiesen werden können.

Des Weiteren spielen Treponemen bei tiefen, eitrigen Klaueninfektionen augenscheinlich eine nur sehr untergeordnete bzw. keine Rolle, da sie mittels der qualitativen PCR nicht nachgewiesen werden konnten.

Somit kann auch Hypothese 2 bestätigt werden, welche lautete: „Bei tiefen, eitrigen Klaueninfektionen mit Eitererregern können mittels qualitativer PCR keine DD-spezifischen *Treponema spp.* nachgewiesen werden, sondern überwiegend Bakterien dieser spezifischen Eitererreger.“

DD-assoziierte Klauenhornläsionen treten typischerweise in Herden auf, von denen man weiß, dass DD endemisch vorhanden ist (42, 83, 52). Die in früheren Publikationen als „nicht-heilende“ Klauenhornläsionen beschriebenen Defekte (50, 42, 56, 49) werden mittlerweile als „DD-assoziierte Klauenhornläsionen“ bezeichnet, da inzwischen von einigen Autoren erfolgreiche Behandlungsmethoden beschrieben wurden (44).

Sykora *et al.* (2015) wiesen in Gewebeproben von „nicht-heilenden Weiße-Linien-Defekten“ (nhWLD) und „nicht-heilenden Sohlenulzera“ (nhSU) dieselbe Treponema-DNS, überwiegend *T. medium*, nach wie in Gewebeproben aus kutanen, akuten M2-Läsionen. Alsaad *et al.* (2022) beschrieb, dass vier Fälle von DD-assoziierten Klauenhornläsionen mittels PCR positiv auf *Treponema spp.*, *Fusobacterium necrophorum* und *Porphyromonas (P.) levii* getestet wurden. Des Weiteren ergab die Untersuchung mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), dass Treponemen in allen vier Läsionen über 90% der gesamten Bakterienpopulation ausmachten. Die FISH-Tests waren außerdem positiv für *P.levii*, aber negativ für *F. necrophorum*. Diese Daten könnten darauf hindeuten, dass DD-assoziierte Treponemen, aber auch *P. levii* potentielle Erreger bei der Entstehung von „nicht-heilenden“ Klauenhornläsionen sind (90).

In der uns zugänglichen wissenschaftlichen Literatur konnten wir keine Erklärung finden, welcher Mechanismus dazu führt, dass sich bei Entstehung von DD-assoziierten Klauenhornläsionen auch nach vielen Wochen kaum bis nie tiefe Klaueninfektionen daraus entwickeln. Eine Erklärung könnte aber das Phänomen der „bakteriellen Interferenz“ sein, wobei eine Gruppe von Bakterien durch das Vorhandensein einer anderen Gruppe beispielsweise in ihrem Wachstum gehemmt wird (86, 85, 95). Möglicherweise kann auch das

alleinige Vorhandensein von Treponemen bei DD-assozierten Klauenhornläsionen bzw. das alleinige Vorhandensein von typischen Eitererregern bei tiefen, eitrigen Klauenhornläsionen damit erklärt werden, dass die im Überschuss vorhandenen Bakterien, das Wachstum anderer Bakterien unterdrücken oder gar gänzlich verhindern.

Reid et al. (2001) beschreiben die bakterielle Interferenz folgendermaßen: Bakterielle Interferenz bezieht sich auf die Fähigkeit eines Mikroorganismus, seinen Wirt vor einem eingedrungenen mikrobiellen Krankheitserreger zu schützen, indem er dessen Adhäsion und toxische Wirkung beeinträchtigt. Falagas et al. (2008) definierte die bakterielle Interferenz wiederum als „Antagonismus zwischen den Bakterienarten während des Prozesses der Oberflächenbesiedelung und des Erwerbs von Nährstoffen“. Im Review von Falagas et al. (2008) wurden einige Studien und deren Ergebnisse näher beleuchtet. So konnte eine wissenschaftliche Arbeit zeigen, dass die Besiedelung der Harnblase beim Menschen, mittels des nicht-pathogenen *E. coli*-Stamms 83972, dazu führt, dass die Rezidiv-Rate von Harnwegsinfekten bei Personen mit neuropathischer Blase nach Rückenmarksläsion verringert ist. Patienten, welche mit *E. coli* 83972 kolonialisiert worden waren, waren um die Hälfte weniger anfällig dafür, nach einer Harnwegsinfektion nochmals eine Harnwegsinfektion zu bekommen, als Patienten ohne Besiedelung mit *E. coli* 83972 (85).

In der Übersichtsarbeit von Darouiche et al. (2012) konzentrierten sich die Autoren ebenfalls auf die Rolle der bakteriellen Interferenz bei der Prävention von Harnwegsinfektionen. Diese wissenschaftliche Arbeit beschäftigte sich ebenso mit der Verwendung von nicht-pathogenen *E. coli*-Stämmen, sowie mit dem Gebrauch von apathogenen Laktobazillus-Stämmen zur Prävention von Harnwegsinfektionen. Auch wenn nicht alle betrachteten Studien in dieser Übersichtsarbeit hinsichtlich des Studienaufbaus ideal konstruiert waren und noch weiterführende Untersuchungen notwendig sein werden, haben die ersten Daten gezeigt, dass es mithilfe des Mechanismus der bakteriellen Interferenz möglich ist, eine niedrigere durchschnittliche Rate an symptomatischen Harnwegsinfekten zu erreichen (86). Diese Autoren beschreiben des Weiteren verschiedene Wirkmechanismen der bakteriellen Interferenz. Zu den Wirkmechanismen zählen: Die Konkurrenz um Nährstoffe, die Produktion von antibakteriellen Wirkstoffen (einschließlich Bakteriozine, Antiseptika und saure Substanzen), die Konkurrenz um Adhäsionsstellen, die Regulierung der Genexpression und die Zerstörung von Biofilmen (86).

„Konkurrenz um Nährstoffe“ scheint ein plausibler Grund für das Vermögen von *E. coli* 83972 zu sein, andere pathogene Bakterien in ihrem Wachstum zu hemmen und diese gegebenenfalls sogar gänzlich aus der Harnblase zu eliminieren. In wissenschaftlichen Untersuchungen hat

sich ursprünglich auch gezeigt, dass *E. coli* 83972 schneller wächst, als andere pathogene Mikroorganismen, jedoch konnte *E. coli* 83972 pathogene Bakterien nicht aus der Harnblase eliminieren, sodass dieser Mechanismus, zumindest als alleiniger Grund, für die Wirksamkeit der bakteriellen Interferenz ausscheidet (86).

Bakteriozine sind antibiotische Proteine, welche empfängliche Bakterien aus derselben Spezies abtöten können. Ein Stamm von *E. coli*, welcher das Bakteriozin „Kolizin“ produzierte, wurde dafür eingesetzt, einen Katheter zu kolonisieren. Durch diese Kolonisierung wurden andere, Kolizin-empfindliche Bakterien, abgetötet und damit eine Infektion verhindert. Bedacht werden muss aber, dass es auch Kolizin-resistente Bakterien gibt, die dementsprechend unempfindlich gegenüber dem produzierten Kolizin sind (86).

Eine wissenschaftliche Arbeit legt nahe, dass die Anheftung des probiotischen *E. coli*-Stamms „*E. coli* Nissle“ an das Wirtsgewebe, eine Anheftung pathogener Mikroorganismen unterbinden kann. Man ist sich aktuell noch uneinig, ob beispielsweise spezielle Fimbrien für die Anheftung an Wirtszellen notwendig sind. Klar ist jedoch, dass eine Adhäsion von probiotischen Bakterien die weitere Adhäsion von pathogenen Mikroorganismen unterdrücken kann, sodass eine Konkurrenz um Adhäsionsstellen vorliegt (86).

Laktobazillen sind möglicherweise in der Lage mittels Regulierung der Genexpression die Expression von Virulenzfaktoren herunterzuregulieren. So konnte in einer Studie von Cadieux et al. (2009) herausgefunden werden, dass probiotische Laktobazillen die Promotoraktivität von *E. coli* Typ-1 und P-Fimbrien herunterregulierten (96, 86).

In der Studie von Darouiche et al. (2012) konnte auch nachgewiesen werden, dass es möglich ist, beispielsweise Harnkatheter mit einem Biofilm des nicht-pathogenen Erregers *E. coli* 83972 zu belegen und dadurch einer Besiedelung mit pathogenen Mikroorganismen vorzubeugen.

Neben Untersuchungen zur Prävention von Infektionen der Harnwege mithilfe von bakterieller Interferenz, gibt es auch noch zahlreiche weitere Studien in Bezug auf diese Thematik, zum Beispiel zur Prävention von Infektionen des oberen Atemtraktes oder des Gastrointestinaltraktes.

Uehara et al. (2000) beschrieben das Phänomen der bakteriellen Interferenz bei 17 Probanden, welche alle Träger des pathogenen Keims *Staphylococcus aureus* in den vorderen Nasenlöchern waren, und bei denen der apathogene Stamm *Corynebakterium* Co304 mittels Wattestäbchen in die Nasenlöcher inokuliert worden war. In 71% der Fälle konnte der pathogene Keim *Staphylococcus aureus* mit dieser Methode eradikiert werden (97). Auch im Gastrointestinaltrakt spielt das im Darm ansässige Ökosystem eine entscheidende Rolle in der

Abwehr von pathogenen Mikroorganismen. Einerseits bilden die Epithelzellen des Darms eine mechanische Barriere, andererseits werden jedoch auch die Kommensalen im Darm dazu benötigt, pathogene Keime mittels lokaler Immunabwehr abzuwehren (85).

Hinsichtlich der beschriebenen Mechanismen, welche die bakterielle Interferenz ermöglichen, waren bis dato in der zugänglichen wissenschaftlichen Literatur keine Studien zu finden, welche eine mögliche bakterielle Interferenz zwischen BDD-spezifischen Treponemen und den beim Rind typischen Eitererregern untersuchten. In den oben genannten Studien aus der Humanmedizin wurden hauptsächlich die Erreger *E. coli.*, Laktobazillen und Bifidobakterien näher untersucht. Es ist jedoch denkbar, dass auch die Treponemen ähnliche Mechanismen, wie beispielsweise Bakteriozine, Wettbewerb um Anheftungsorte oder die Zerstörung bzw. Verhinderung des Aufbaus von Biofilmen aufweisen, und dadurch Eitererreger möglicherweise erfolgreich verdrängen. Dies würde sehr gut erklären, dass es trotz des langen Bestehens von DD-assoziierten Klauenhornläsionen an der Lederhaut von Sohle und Wand, oftmals über viele Monate hinweg, nicht zu einer Infektion der tiefen Strukturen der Klaue, wie beispielsweise der tiefen Beugesehne am Ansatz, des Klauensesambeines oder der Klauenbeinspitze kommt (83, 44, 43). Eine sekundäre eitrige Infektion dieser genannten unter der Klauenlederhaut liegenden tiefen Stützstrukturen innerhalb von 2 bis etwa 4 Wochen ist üblicherweise die Regel, wenn Sohlengeschwüre und Weiße-Linie-Abszesse an der Sohle und Wand der Klaue bei Kühen in DD-freien Herden nicht rechtzeitig und fachgerecht therapiert werden (54, 83, 55).

Um ein kompletteres Bild der Bakterienzusammensetzung in den einzelnen Rinderproben zu erhalten, werden diese derzeit im Rahmen eines Folgeprojekts mittels Typ-spezifischer qPCR weiter untersucht. Des Weiteren soll noch kurz darauf eingegangen werden, dass neben den erwarteten Bakterien, wie Treponemen und Eitererregern, wie *Fusobacterium necrophorum* häufig noch ein Bakterium nachgewiesen wurde, welches erstmalig aus der Maulhöhle einer Katze isoliert worden war (98). Es ist denkbar, dass es sich dabei um einen potentiellen Parodontose-Erreger handelt, denn es gibt interessanterweise eine große Überschneidung zwischen bakteriellen Erregern in bovinen und ovinen infektiösen Klauenerkrankungen inklusive DD, equinem Hufkrebs und Parodontose bei unterschiedlichen Säugetieren einschließlich des Menschen (47, 99, 100).

In den Proben von eitrig-tiefen Klaueninfektionen wurde überraschenderweise vorwiegend der Erreger *Parvimonas micra* nachgewiesen. Bislang gibt es keine Literatur zum Vorkommen

dieses Erregers bei bovinen Klaueninfektionen. *Parvimonas micra* sind kleine, nicht-sporenbildende, Gram-positive, anaerobe Kokken (101). Ursprünglich war der Erreger bekannt unter dem Namen *Peptostreptococcus micros*, wurde dann 1999 der Gattung *Micromonas* zugeordnet und zu guter Letzt in die aktuelle Gattung *Parvimonas* eingeordnet (102). *P. micra* ist ein Bakterium, das häufig die Mundhöhle besiedelt und mit parodontalen Erkrankungen in Verbindung gebracht wird (102). Des Weiteren kommt dieser Mikroorganismus auch im Gastrointestinaltrakt vor. Interessanterweise wird *P. micra* zunehmend als primäres Pathogen bei Humaninfektionen identifiziert, so zum Beispiel als Erreger von Gelenksentzündungen bei Prothesen, als Erreger bei diabetischen Fußinfektionen oder als auslösendes Bakterium bei Leber- und Milzabszessen (102).

Diese bislang bekannten, pathobiologischen Assoziationen legen nahe, dass *P. micra* auch eine aktive Rolle bei der Entstehung und Progression eitriger Klauenläsionen, sprich Interdigitalphlegmonen beim Rind und anderer Wiederkäuer spielen könnte. Die Tatsache, dass *P. micra*-DNS in den Gewebeproben von 7/11 Tieren mit eitrig-tiefen Klaueninfektionen als dominant vorkommendes Bakterium amplifiziert wurde, könnte darauf hindeuten, dass hier eine neue ätiologische Assoziation entdeckt wurde. Diese Möglichkeit bedarf aber weiterer Untersuchungen. Derzeit werden alle Proben quantitativ mittels *P. micra*-spezifischer qPCR in einem Folgeprojekt getestet.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Rinderzucht AUSTRIA 2023. ZuchtData-Jahresbericht 2023 [cited 2024 Oct 22]. Available from: URL: <https://www.rinderzucht.at/downloads/jahresberichte.html>.
2. Kofler J, Suntinger M, Mayerhofer M, Linke K, Maurer L, Hund A et al. Benchmarking Based on Regularly Recorded Claw Health Data of Austrian Dairy Cattle for Implementation in the Cattle Data Network (RDV). *Animals (Basel)* 2022; 12(7):808.
3. Algers B, Blokhuis HJ, Botner A, Broom DM, Costa P, Domingo M et al. Scientific opinion on welfare of dairy cows in relation to leg and locomotion problems based on a risk assessment with special reference to the impact of housing, feeding, management and genetic selection. *EFSA Journal* 2009 [cited 2024 Oct 22]; 7(7):18. Available from: URL: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2009.1142>.
4. Robcis R, Ferchiou A, Berrada M, Ndiaye Y, Herman N, Lhermie G et al. Cost of lameness in dairy herds: An integrated bioeconomic modeling approach. *J Dairy Sci* 2023; 106(4):2519–34.
5. Bruijnis MRN, Hogeveen H, Stassen EN. Assessing economic consequences of foot disorders in dairy cattle using a dynamic stochastic simulation model. *J Dairy Sci* 2010; 93(6):2419–32.
6. Sullivan LE, Carter SD, Blowey R, Duncan JS, Grove-White D, Evans NJ. Digital dermatitis in beef cattle. *Veterinary Record* 2013; 173(23):582.
7. Döpfer D, Koopmans A, Meijer FA, Schukken YH, Brand A, Klee W et al., editors. *Epidemiological investigations of digital dermatitis in Dutch dairy cattle*; 1994.
8. Kofler J, Fiedler A, Charfeddine N, Capion N, Fjeldaas T, Cramer G et al. ICAR Claw Health Atlas - Appendix 1 (Digital Dermatitis Stages (M-Stages); 2020a. Available from: URL: <https://www.icar.org/Documents/ICAR-Claw-Health-Atlas-Appendix-1-DD-stages-M-stages.pdf>.
9. Döpfer D, Koopmans A, Meijer FA, Szakáll I, Schukken YH, Klee W et al. Histological and bacteriological evaluation of digital dermatitis in cattle, with special reference to spirochaetes and *Campylobacter faecalis*. *Vet Rec* 1997; 140(24):620–3.
10. Stamm V. L., Trott J. D. Treponema and Bovine Skin Disease: Papillomatous Digital Dermatitis and Ulcerative Mammary Dermatitis. In: Radolf JD, editor. *Pathogenic*

Treponema: Molecular and Cellular Biology. Norfolk: Caister Academic Press; 2006. p. 403–16.

11. Berry SL, Read DH, Walker RL, Famula TR. Clinical, histologic, and bacteriologic findings in dairy cows with digital dermatitis (footwarts) one month after topical treatment with lincomycin hydrochloride or oxytetracycline hydrochloride. *J Am Vet Med Assoc* 2010; 237(5):555–60.

12. Refaai W, van Aert M, Abd El-Aal AM, Behery AE, Opsomer G. Infectious diseases causing lameness in cattle with a main emphasis on digital dermatitis (Mortellaro disease). *Livestock Science* 2013; 156(1-3):53–63.

13. Fiedler A, Kofler J. Dermatitis digitalis (Mortellaro-Krankheit, "Erdbeerkrankheit"). In: Fiedler A, Maierl J, Nuss K, editors. *Erkrankungen der Klauen und Zehen des Rindes*. 2., überarbeitete und aktualisierte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2019. p. 103–11.

14. Read DH, Walker RL. Papillomatous digital dermatitis (footwarts) in California dairy cattle: clinical and gross pathologic findings. *J Vet Diagn Invest* 1998; 10(1):67–76.

15. Klitgaard K, Boye M, Capion N, Jensen TK. Evidence of multiple *Treponema* phylotypes involved in bovine digital dermatitis as shown by 16S rRNA gene analysis and fluorescence in situ hybridization. *J Clin Microbiol* 2008; 46(9):3012–20.

16. Manabe H, Yoshitani K, Ishii R. *Treponema* is Live in the Biofilm of Digital Dermatitis. In: *The 15th International Symposium & the 7th Conference on Lameness in Ruminants*; 2008. p. 352–4.

17. Walker RL, Read DH, Loretz KJ, Nordhausen RW. Spirochetes isolated from dairy cattle with papillomatous digital dermatitis and interdigital dermatitis. *Vet Microbiol* 1995; 47(3-4):343–55.

18. Edwards AM, Dymock D, Jenkinson HF. From tooth to hoof: treponemes in tissue-destructive diseases. *J Appl Microbiol* 2003; 94(5):767–80.

19. Opitz B, Schröder NW, Spreitzer I, Michelsen KS, Kirschning CJ, Hallatschek W et al. Toll-like receptor-2 mediates *Treponema* glycolipid and lipoteichoic acid-induced NF- $\kappa$ B translocation. *J Biol Chem* 2001; 276(25):22041–7.

20. Mikx FHM. Comparison of peptidase, glycosidase and esterase activities of oral and non-oral *Treponema* species. *J Gen Microbiol* 1991; 137(1):63–8.

21. Alsaad M, Locher I, Jores J, Grimm P, Brodard I, Steiner A et al. Detection of specific *Treponema* species and *Dichelobacter nodosus* from digital dermatitis (Mortellaro's disease) lesions in Swiss cattle. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 2019; 161(4):207–15.
22. Moter A, Leist G, Rudolph R, Schrank K, Choi B-K, Wagner M et al. Fluorescence in situ hybridization shows spatial distribution of as yet uncultured treponemes in biopsies from digital dermatitis lesions. *Microbiology (Reading)* 1998; 144(9):2459–67.
23. Evans NJ, Brown JM, Demirkan I, Murray RD, Vink WD, Blowey RW et al. Three unique groups of spirochetes isolated from digital dermatitis lesions in UK cattle. *Vet Microbiol* 2008; 130(1-2):141–50.
24. Somers JGCJ, Frankena K, Noordhuizen-Stassen EN, Metz JHM. Risk factors for digital dermatitis in dairy cows kept in cubicle houses in The Netherlands. *Preventive Veterinary Medicine* 2005; 71(1-2):11–21.
25. Döpfer D, Holzhauser M, van Boven M. The dynamics of digital dermatitis in populations of dairy cattle: model-based estimates of transition rates and implications for control. *Vet J* 2012; 193(3):648–53.
26. Plummer PJ, Krull A. Clinical Perspectives of Digital Dermatitis in Dairy and Beef Cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2017; 33(2):165–81.
27. Ahlén L, Holmøy IH, Nødtvedt A, Sogstad ÅM, Fjeldaas T. A case-control study regarding factors associated with digital dermatitis in Norwegian dairy herds. *Acta Vet Scand* 2022; 64(19).
28. Weber J, Becker J, Syring C, Ruiters MW, Locher I, Bayer M et al. Farm-level risk factors for digital dermatitis in dairy cows in mountainous regions. *J Dairy Sci* 2023; 106(2):1341–50.
29. Fürmann A, Syring C, Becker J, Sarbach A, Weber J, Welham R. M. et al. Prevalence of Painful Lesions of the Digits and Risk Factors Associated with Digital Dermatitis, Ulcers and White Line Disease on Swiss Cattle Farms. *Animals (Basel)* 2024; 14(1).
30. Huber J. Klauenerkrankungen bei Milchkühen in verschiedenen Haltungformen: im Vergleich Anbindehaltung und Laufstallhaltung [Inaugural-Dissertation aus der Universitätsklinik für Orthopädie bei Huf-und Klauentieren und dem Institut für Tierhaltung und Tierschutz der Veterinärmedizinischen Universität Wien]. *Veterinärmedizinische Universität Wien*; 2002.

31. Bayer M, Strauss G, Syring C, Ruiters M, Becker J, Steiner A. Umsetzung von Biosicherheitsmassnahmen durch Klauenpfleger in der Schweiz. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 2023; 165(5):307–20.
32. Gernand E, König S, Kipp C. Influence of on-farm measurements for heat stress indicators on dairy cow productivity, female fertility, and health. *J Dairy Sci* 2019; 102(7):6660–71.
33. Yang DA, Gates MC, Müller KR, Laven RA. Bayesian analysis of herd-level risk factors for bovine digital dermatitis in New Zealand dairy herds. *BMC Vet Res* 2019; 15(1):125.
34. Capion N, Boye M, Ekstrøm CT, Jensen TK. Infection dynamics of digital dermatitis in first-lactation Holstein cows in an infected herd. *J Dairy Sci* 2012; 95(11):6457–64.
35. Biemans F, Jong MCM de, Bijma P. Genetic parameters and genomic breeding values for digital dermatitis in Holstein Friesian dairy cattle: host susceptibility, infectivity and the basic reproduction ratio. *Genet Sel Evol* 2019; 51(67):1–13.
36. Lai E, Danner AL, Famula TR, Oberbauer AM. Genome-Wide Association Studies Reveal Susceptibility Loci for Digital Dermatitis in Holstein Cattle. *Animals: an open access journal from MDPI* 2020; 10(11).
37. Corlevic AT, Beggs DS. Host Factors Impacting the Development and Transmission of Bovine Digital Dermatitis. *Ruminants* 2022; 2(1):90–100.
38. Tremblay M, Bennett T, Döpfer D. The DD Check App for prevention and control of digital dermatitis in dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* 2016; 132:1–13.
39. Nielsen BH, Thomsen PT, Green LE, Kaler J. A study of the dynamics of digital dermatitis in 742 lactating dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine* 2012; 104(1-2):44–52.
40. Schöpke K, Gomez A, Dunbar KA, Swalve HH, Döpfer D. Investigating the genetic background of bovine digital dermatitis using improved definitions of clinical status. *J Dairy Sci* 2015; 98(11):8164–74.
41. Murray RD, Downham DY, Demirkan I, Carter SD. Some relationships between spirochaete infections and digital dermatitis in four UK dairy herds. *Res Vet Sci* 2002; 73(3):223–30.

42. Evans NJ, Blowey RW, Timofte D, Isherwood DR, Brown JM, Murray R et al. Association between bovine digital dermatitis treponemes and a range of 'non-healing' bovine hoof disorders. *Veterinary Record* 2011; 168(8):198–222.
43. Kofler J, Fiedler A, Charfeddine N, Capion N, Fjeldaas T, Cramer G et al. ICAR Atlas der Klauengesundheit - Appendix 2 Dermatitis digitalis-assozierte Klauenhornläsionen; 2020b [cited 2024 Oct 22]. Available from: URL: <https://www.icar.org/wp-content/uploads/2021/08/ICAR-Claw-Health-Atlas-Appendix-2-in-German.pdf>.
44. Kofler J. Das "Neue" Gesicht der Mortellaro-Krankheit - Rinder leiden bis zu 12 Monate und länger an DD-assozierten Klauenhornläsionen. *Klauentierpraxis* 2020; 28(4):145–57.
45. Relun A, Guatteo R, Roussel P, Bareille N. A simple method to score digital dermatitis in dairy cows in the milking parlor. *J Dairy Sci* 2011; 94(11):5424–34.
46. Brandt S, Apprich V, Hackl V, Tober R, Danzer M, Kainzbauer C et al. Prevalence of bovine papillomavirus and *Treponema* DNA in bovine digital dermatitis lesions. *Vet Microbiol* 2011; 148(2-4):161–7.
47. Sykora S, Brandt S. Occurrence of *Treponema* DNA in equine hoof canker and normal hoof tissue. *Equine Vet J* 2015; 47(5):627–30.
48. Sykora S, Kofler J, Glonegger-Reichert J, Dietrich J, Auersperg G, Brandt S. *Treponema* DNA in bovine 'non-healing' versus common sole ulcers and white line disease. *Vet J* 2015; 205(3):417–20.
49. Holzhauser M, Vos J, editors. *Non-Healing White Line Disorders, a New Clinical Presentation*; 2008.
50. Blowey R. Non-healing hoof lesions in dairy cows. *Veterinary Record* 2012; 170(1):26–7.
51. Nouri M, Ashrafi-Helan J. Observations on Healing Process of Wall Ulcers with Concurrent Digital Dermatitis in 52 Cattle: Gross and Light Microscopic Pathology. *AVS* 2013; 1(6):60–5.
52. Kofler J, Glonegger-Reichert J, Dietrich J, Sykora S, Tichy A, Brandt S. A simple surgical treatment for bovine digital dermatitis-associated white line lesions and sole ulcers. *Vet J* 2015; 204(2):229–31.
53. Kofler J, Altenbrunner-Martinek B. Qualitätssicherung bei der Behandlung von Klauen- und Zehenerkrankungen des Rindes – Vorstellung von Standardvorgehensweisen zur

Erzielung besserer Therapieerfolge und zur Reduktion des Antibiotikaeinsatzes. Wiener Tierärztliche Monatsschrift 2022; 109:1–21.

54. Nuss K. Surgery of the Distal Limb. Vet Clin North Am Food Anim Pract 2016; 32(3):753–75.

55. Kofler J. Surgical treatment in deep digital sepsis in cattle – Claw preserving methods and claw amputation. Rev. Acad. Ciên. Anim. 2017; 15(Suppl 2):45–65.

56. Holzhauser M, Pijl R, editors. Non-Healing White Line Lesion, Advanced Experience.; 2011.

57. Gomez A, Cook NB, Rieman J, Dunbar KA, Cooley KE, Socha MT et al. The effect of digital dermatitis on hoof conformation. J Dairy Sci 2015; 98(2):927–36.

58. Machado VS, Caixeta LS, McArt JAA, Bicalho RC. The effect of claw horn disruption lesions and body condition score at dry-off on survivability, reproductive performance, and milk production in the subsequent lactation. J Dairy Sci 2010; 93(9):4071–8.

59. Greenough PR, editor. Bovine laminitis and lameness: A hands-on approach. Edinburgh: W. B. Saunders; 2007.

60. Thomas HJ, Miguel-Pacheco GG, Bollard NJ, Archer SC, Bell NJ, Mason C et al. Evaluation of treatments for claw horn lesions in dairy cows in a randomized controlled trial. J Dairy Sci 2015; 98(7):4477–86.

61. Kofler J, Egger-Danner C, Fürst-Waltl B, Knapp MS, Paschinger J, Suntinger M et al. Incidences of claw lesions in Austrian dairy herds in relation to lactation number, lactation month, housing system and breed. Wiener Tierärztliche Monatsschrift 2024; 111(1).

62. Kofler J, Feist M, Starke A, Nuss K. Resection of the distal/proximal interphalangeal joint and digit amputation in 21 breeding bulls - indications, clinical findings and long-term outcome. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 2007; 120(3-4):156–64.

63. Heppelmann M, Kofler J, Meyer H, Rehage J, Starke A. Advances in surgical treatment of septic arthritis of the distal interphalangeal joint in cattle: a review. Vet J 2009; 182(2):162–75.

64. Hund A, Senn M, Kofler J. Septic Tenosynovitis of the Digital Flexor Tendon Sheath in 83 Cattle. Animals (Basel) 2020; 10(8).

65. Kofler J. Clinical study of toe ulcer and necrosis of the apex of the distal phalanx in 53 cattle. *Vet J* 1999; 157(2):139–47.
66. Paetsch DC. Epidemiology of Toe Tip Necrosis Syndrome in Western Canadian Feedlot Cattle. Saskatoon, Canada: University of Saskatchewan; 2014.
67. Rachidi F, Kühn T, Sobucka D, Kovács GK, Kretschmann J, Öhm AW et al. Erregerdiagnostik bei infektiösen und komplizierten belastungsbedingten Klauenerkrankungen. In: Leipziger Blaue Hefte: LBH: 11. Leipziger Tierärztekongress - Tagungsband 3. Universität Leipzig; Universitätsbibliothek Leipzig; 2022. p. 371–3 (Leipziger blaue Hefte; vol. 11).
68. Kofler J, Osová A, Altenbrunner-Martinek B, Burgstaller J. Klauenbeinspitzennekrose bei 30 Rindern - retrospektive Analyse der chirurgischen Behandlungstechniken und der Behandlungsergebnisse. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 2017; 104:131–42.
69. Osová A, Mihajlovičová X, Hund A, Mudroň P. Interdigital phlegmon (foot rot) in dairy cattle - an update. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 2017; 104(7-8):209–20.
70. van Metre DC. Pathogenesis and Treatment of Bovine Foot Rot. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2017; 33(2):183–94.
71. Kontturi M, Junni R, Simojoki H, Malinen E, Seuna E, Klitgaard K et al. Bacterial species associated with interdigital phlegmon outbreaks in Finnish dairy herds. *BMC Vet Res* 2019; 15(44).
72. Nagaraja TG, Narayanan SK, Stewart GC, Chengappa MM. *Fusobacterium necrophorum* infections in animals: pathogenesis and pathogenic mechanisms. *Anaerobe* 2005; 11(4):239–46.
73. Amoako KK, Goto Y, Misawa N, Xu DL, Shinjo T. Interactions between *Fusobacterium necrophorum* hemolysin, erythrocytes and erythrocyte membranes. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 150(1):101–6.
74. Forrester LJ, Campbell BJ, Berg JN, Barrett JT. Aggregation of platelets by *Fusobacterium necrophorum*. *J Clin Microbiol* 1985; 22(2):245–9.
75. Kraft AF, Strobel H, Hilke J, Steiner A, Kuhnert P. The prevalence of *Dichelobacter nodosus* in clinically footrot-free sheep flocks: a comparative field study on elimination strategies. *BMC Vet Res* 2020; 16(1).

76. Kuhlemann J. Epidemiologie und Bekämpfung der Moderhinke auf regionaler Ebene [Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin oder eines Doktors der Veterinärmedizin (Dr.med.vet.)]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 2011.
77. Zanolari P, Dürr S, Jores J, Steiner A, Kuhnert P. Ovine footrot: A review of current knowledge. *Vet J* 2021; 271.
78. Billington SJ, Johnston JL, Rood JI. Virulence regions and virulence factors of the ovine footrot pathogen, *Dichelobacter nodosus*. *FEMS Microbiol Lett* 1996; 145(2):147–56.
79. Katz ME, Howarth PM, Yong WK, Riffkin GG, DePiazzi LJ, Rood JI. Identification of three gene regions associated with virulence in *Dichelobacter nodosus*, the causative agent of ovine footrot. *J Gen Microbiol* 1991; 137(9):2117–24.
80. Kofler J. Zwischenklauennekrose beim Rind - was man dazu wissen sollte. *Fleckvieh Austria Magazin* 2023 [cited 2024 Oct 23]; 23(5). Available from: URL: <https://www.fleckvieh.at/zwischenklauennekrose-beim-rind-was-man-dazu-wissen-sollte/#:~:text=Die%20Zwischenklauennekrose%20z%C3%A4hlt%20neben%20der,darunterliegenden%20Bindegewebes%20im%20Zwischenzehenspalt%20dar>.
81. Reinöhl-DeSouza C, Kofler J. Infektiöse Interdigitalnekrose (infektiöse Interdigitalphlegmone) bei 66 Rindern: Teil 1: Klinische Befunde. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere / Nutztiere* 2006a; 34(01):5–14.
82. Bennett G, Hickford J, Sedcole R, Zhou H. *Dichelobacter nodosus*, *Fusobacterium necrophorum* and the epidemiology of footrot. *Anaerobe* 2009; 15(4):173–6.
83. Kofler J. Pathogenesis and Treatment of Toe Lesions in Cattle Including "Nonhealing" Toe Lesions. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2017; 33(2):301–28.
84. Brook I. Bacterial interference. *Crit Rev Microbiol* 1999; 25(3):155–72.
85. Falagas ME, Rafailidis PI, Makris GC. Bacterial interference for the prevention and treatment of infections. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31(6):518–22.
86. Darouiche RO, Hull RA. Bacterial interference for prevention of urinary tract infection. *Clin Infect Dis* 2012; 55(10):1400–7.
87. Schultz N, Capion N. Comparison of the effect of salicylic acid and tetracycline for treatment of digital dermatitis. In: *Proceedings of the 17th International Symposium and 9th International Conference on Lameness in Ruminants*. Bristol; 2013. p. 205.

88. Kofler J, Innerebner C, Pesenhofer R, Hangl A, Tichy A. Effectiveness of salicylic acid paste for treatment of digital dermatitis in dairy cows compared with tetracycline spray and hydrotherapy. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2015; 128(7-8):326–34.
89. Alsaad M, Jensen TK, Miglinci L, Gurtner C, Brandt S, Plüss J et al. Proof of an optimized salicylic acid paste-based treatment concept of ulcerative M2-stage digital dermatitis lesions in 21 dairy cows. *PLoS One* 2022; 17(6).
90. Alsaad M, Weber J, Jensen T, Brandt S, Gurtner C, Devaux D et al. "Non-healing" claw horn lesions in dairy cows: Clinical, histopathological and molecular biological characterization of four cases. *Front Vet Sci* 2022; 9.
91. Ruan W, Lai M. Actin, a reliable marker of internal control? *Clin Chim Acta* 2007; 385(1-2):1–5.
92. Brandt S, Haralambus R, Schoster A, Kirnbauer R, Stanek C. Peripheral blood mononuclear cells represent a reservoir of bovine papillomavirus DNA in sarcoid-affected equines. *J Gen Virol* 2008; 89(6):1390–5.
93. Moe KK, Yano T, Kuwano A, Sasaki S, Misawa N. Detection of treponemes in canker lesions of horses by 16S rRNA clonal sequencing analysis. *J Vet Med Sci* 2010; 72(2):235–9.
94. Evans NJ, Brown JM, Demirkan I, Murray RD, Birtles RJ, Hart CA et al. *Treponema pedis* sp. nov., a spirochaete isolated from bovine digital dermatitis lesions. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009; 59(5):987–91.
95. Reid G, Howard J, Gan BS. Can bacterial interference prevent infection? *Trends Microbiol* 2001; 9(9):424–8.
96. Cadieux PA, Burton J, Devillard E, Reid G. *Lactobacillus* by-products inhibit the growth and virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60(6):13–8.
97. Uehara Y, Nakama H, Agematsu K, Uchida M, Kawakami Y, Abdul Fattah AS et al. Bacterial interference among nasal inhabitants: eradication of *Staphylococcus aureus* from nasal cavities by artificial implantation of *Corynebacterium* sp. *J Hosp Infect* 2000; 44(2):127–33.
98. Dewhirst FE, Klein EA, Bennett M-L, Croft JM, Harris SJ, Marshall-Jones ZV. The feline oral microbiome: a provisional 16S rRNA gene based taxonomy with full-length reference sequences. *Vet Microbiol* 2015; 175(2-4):294–303.

99. Sykora S, Pieber K, Simhofer H, Hackl V, Brodesser D, Brandt S. Isolation of *Treponema* and *Tannerella* spp. from equine odontoclastic tooth resorption and hypercementosis related periodontal disease. *Equine Vet J* 2014; 46(3):358–63.
100. Staton GJ, Angell JW, Grove-White D, Clegg SR, Carter SD, Evans NJ et al. Contagious Ovine Digital Dermatitis: A Novel Bacterial Etiology and Lesion Pathogenesis. *Front Vet Sci* 2021; 8.
101. Uemura H, Hayakawa K, Shimada K, Tojo M, Nagamatsu M, Miyoshi-Akiyama T et al. *Parvimonas micra* as a causative organism of spondylodiscitis: a report of two cases and a literature review. *Int J Infect Dis* 2014; 23:53–5.
102. Gomez A, Gerber DA, Zambrano E, Banaei N, Deresinski S, Blackburn BG. First case of infectious endocarditis caused by *Parvimonas micra*. *Anaerobe* 2015; 36:53–5.

## 7 **Tabellenverzeichnis**

TAB. 1: AUFLISTUNG DER HERKUNFT DER 18 GEWEBEPROBEN VON 11 RINDERPATIENTEN MIT EITRIGEN, TIEFEN KLAUENINFEKTIONEN .....	24
TAB. 2: AUFLISTUNG DER HERKUNFT DER 18 GEWEBEPROBEN VON 15 RINDERPATIENTEN MIT DERMATITIS-DIGITALIS-ASSOZIIERTEN KLAUENHORNLÄSIONEN.....	25
TAB. 3: TT-PCR-REAKTIONSGEMISCH PRO PROBE.....	27
TAB. 4 SEQUENZIERUNGSERGEBNISSE DER 18 GEWEBEPROBEN VON DD-ASSOZIIERTEN KLAUENHORNLÄSIONEN BEI 15 RINDERN IM HINBLICK AUF JENES BAKTERIUM, WELCHES IN DEN PROBEN IM GRÖßTEN ÜBERSCHUSS VORLAG.....	29
TAB. 5: SEQUENZIERUNGSERGEBNISSE DER 18 GEWEBEPROBEN VON 11 RINDERN MIT EITRIGEN, TIEFEN KLAUENINFEKTIONEN IM HINBLICK AUF JENES BAKTERIUM, WELCHES IN DEN PROBEN IM GRÖßTEN ÜBERSCHUSS VORLAG.....	31