

**Aus dem Institut für Tierpathologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

**Einfluss immunsuppressiver Virusinfektionen auf eine  
natürlich erworbene Infektion mit *Bartonella henselae*  
bei Katzen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin**

vorgelegt von

**Alexandra U. Buchmann**

Tierärztin aus Freiburg im Breisgau

**Berlin 2010**

Journal Nr.: 3424

**Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Leo Brunberg

**Erster Gutachter:** Univ.-Prof. Dr. Achim D. Gruber

**Zweiter Gutachter:** Univ.-Prof. Dr. Barbara Kohn

**Dritter Gutachter:** Univ.-Prof. Dr. Lothar H. Wieler

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): *Bartonella henselae*, cats, feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus, feline panleukopenia virus, immunohistochemistry, immunosuppressive agents, latent infections, polymerase chain reaction

**Tag der Promotion:** 26.10.2010

*Meiner Mutter († 2007)*  
*in Liebe und Dankbarkeit*



## Inhalt

1	Einleitung .....	1
2	Literaturübersicht .....	2
2.1	Einführung.....	2
2.1.1	<i>Bartonella</i> spp.- eine erstaunliche Bakteriengattung.....	2
2.1.2	Pathogenese einer Infektion mit <i>Bartonella</i> spp. ....	2
2.1.3	Wichtige Vertreter der Gattung <i>Bartonella</i> .....	3
2.2	<i>B. henselae</i> bei Katzen .....	8
2.2.1	Geographische Verbreitung .....	8
2.2.2	Verbreitung von <i>B. henselae</i> innerhalb einer Katzenpopulation .....	8
2.2.3	Bild einer <i>B. henselae</i> - Infektion bei Katzen .....	9
2.2.4	Einfluss immunsuppressiver Koinfektionen .....	10
2.2.5	Peliosis hepatis bei Katzen .....	10
2.3	Diagnose einer <i>B. henselae</i> - Infektion .....	11
2.3.1	Direkte Nachweisverfahren .....	11
2.3.2	Indirekte Nachweisverfahren.....	13
2.4	Therapie von <i>B. henselae</i> - Infektionen bei Mensch und Katze .....	13
2.4.1	Therapie bei Menschen.....	13
2.4.2	Therapie bei Katzen.....	14
2.5	<i>B. henselae</i> - Infektionen bei Hunden.....	14
2.6	Immunsuppressive Virusinfektionen bei Katzen .....	15
2.6.1	Infektionen mit dem Felinen Leukämievirus (FeLV).....	15
2.6.2	Infektionen mit dem Felinen Immundefizienz Virus (FIV).....	17
2.6.3	Feline Parvovirose (feline Panleukopenie) .....	18
2.7	Ziel der Untersuchung, Arbeitshypothesen.....	20
3	Material und Methoden.....	22
3.1	Untersuchte Katzen.....	22
3.1.1	Probenspektrum.....	22
3.1.2	Probenentnahme .....	23
3.1.3	DNA - Extraktion aus tiefgekühlten Gewebeproben.....	24
3.1.4	Bestimmung der DNA - Konzentration im Eluat.....	25
3.2	Nested PCR zum Nachweis von <i>B. henselae</i> .....	25
3.2.1	Primer .....	25
3.2.2	Durchführung der nested PCR .....	27
3.2.3	Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte .....	28
3.2.4	Nachweisgrenzen der nested PCR .....	28
3.2.5	Vorversuch: Einfluss von Autolyse .....	30

# Inhalt

---

3.3	Nachweis von <i>B. henselae</i> - Antigen im Gewebe .....	32
3.3.1	Antikörper .....	33
3.3.2	Durchführung der immunhistochemischen Untersuchung .....	33
3.3.3	Kontrollen.....	34
3.4	Nachweis immunsuppressiver Virusinfektionen.....	34
3.4.1	PCR .....	34
3.4.2	Nachweis von FeLV - Antigen .....	36
3.5	Zusammenhang zwischen interstitieller Nephritis und einer <i>B. henselae</i> - Infektion ....	37
3.6	Statistische Auswertung .....	37
3.7	Zusammenhang zwischen Peliosis hepatis und einer <i>B. henselae</i> - Infektion.....	38
3.7.1	Untersuchungsmaterial .....	38
3.7.2	DNA - Extraktion aus paraffineingebettetem Lebergewebe .....	38
3.7.3	Nachweis des htrA-Gens.....	39
3.7.4	Nachweis des pap31-Gens .....	39
3.7.5	Nachweis von felinem EF1-alpha .....	40
3.7.6	Immunhistochemische Untersuchung auf BadA-Antigen.....	40
4	Ergebnisse .....	41
4.1	Sektionsbefunde .....	41
4.2	Nachweis einer Infektion mit <i>B. henselae</i> .....	41
4.2.1	Nachweis mittels nested PCR .....	41
4.2.2	Nachweis mittels immunhistochemischer Untersuchung .....	42
4.3	Nachweis von Infektionen mit FeLV, FIV und FPV .....	43
4.3.1	FeLV - Infektion.....	43
4.3.2	FIV - Infektion.....	43
4.3.3	FPV - Infektion .....	44
4.3.4	Statistische Auswertung mittels log-linearer Regression .....	44
4.4	Zusammenhang zwischen interstitieller Nephritis und einer <i>B. henselae</i> - Infektion ....	44
4.5	Zusammenhang zwischen Peliosis hepatis und einer <i>B. henselae</i> - Infektion.....	46
5	Diskussion.....	50
6	Zusammenfassung.....	58
7	Summary.....	61
8	Tabellenverzeichnis.....	62
9	Abbildungsverzeichnis.....	64
10	Literaturverzeichnis .....	65
	Anhang I: Abkürzungen.....	75
	Anhang II: Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien .....	76
	Anhang III: Rezepturen.....	78

## Inhalt

---

Publikationsliste.....	79
Danksagung .....	80





# 1 Einleitung

*Bartonella (B.) henselae* ist ein gramnegatives Bakterium, welches sich als Zoonoseerreger einen Namen gemacht hat. Durch Kratzen oder Beißen wird es von Katzen auf Menschen übertragen und verursacht bei diesen, abhängig vom Immunstatus, unterschiedliche Krankheitsbilder. Während immunkompetente Patienten in der Regel an der selbstlimitierten und vergleichsweise harmlosen Katzenkratzkrankheit (Cat scratch disease) erkranken, zeigen immunsupprimierte Patienten schwere, septikämische Verläufe oder angioproliferative Krankheitsbilder wie Bazilläre Angiomatose oder Peliosis hepatis, die auch tödlich verlaufen können. Obwohl Infektionen mit *B. henselae* auch bei Löwen, Geparden und anderen Großkatzen vorkommen, liegt der Schwerpunkt der medizinischen Forschung auf der Erreger-Wirt-Beziehung zwischen *B. henselae* und seinem Reservoirwirt, der Hauskatze. Tatsächlich ist *B. henselae* an diesen sehr gut angepasst. In experimentellen Infektionen verursacht der Erreger bei Hauskatzen in der Regel lediglich eine lang andauernde oder wiederkehrende intraerythrozytäre Bakteriämie und dabei keine oder nur milde, unspezifische Krankheitszeichen, wie Fieber oder ein reduziertes Allgemeinbefinden. Allerdings wurden diese Infektionsversuche an gesunden, spezifiziert pathogenfreien (SPF) Hauskatzen durchgeführt. Systematische Untersuchungen an natürlich infizierten, immunsupprimierten Hauskatzen fehlen dagegen bisher. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, herauszufinden, ob unter natürlichen Bedingungen bei Hauskatzen ein Zusammenhang zwischen immunsuppressiven Virusinfektionen und der Prävalenz einer *B. henselae* - Infektion besteht. Weiterhin wurde untersucht, ob sich die Läsionen einer *B. henselae* - Infektion bei Hauskatzen mit immunsuppressiven Virusinfektionen von denen bei Hauskatzen ohne solche Infektionen unterscheiden. Im Folgenden steht der Begriff „Katze“, soweit nicht ausdrücklich anders bezeichnet, für Hauskatzen (*Felis sylvestris catus*).

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Einführung

#### 2.1.1 *Bartonella* spp.- eine erstaunliche Bakteriengattung

Die Mitglieder der Gattung *Bartonella* gehören zu den interessantesten Vertretern der Bakterien überhaupt. Es handelt sich um gramnegative Kurzstäbchen, welche zur Familie *Bartonellaceae* der  $\alpha$ 2-Proteobakterien zählen und mit dem Pflanzenpathogen *Agrobacterium tumefaciens*, aber auch mit Zoonoseerregern wie der Gattung *Brucella* verwandt sind. Als einzige Bakterien sind sie in der Lage, die Neubildung von Blutgefäßen zu induzieren. Daher werden sie vor allem in der Humanmedizin intensiv erforscht.

Ursprünglich enthielt die Gattung nur eine Art, *B. bacilliformis*, bevor Genomanalysen 1993 zu der Zusammenführung der beiden Gattungen *Rochalimea* und *Bartonella* führten und diese neu in die phylogenetische Systematik einordneten (Brenner et al. 1993). 1995 wurde auch die Gattung *Grahamella* den Bartonellen zugeordnet (Birtles et al. 1995). Heute zählt die Gattung 23 Arten, mit noch immer steigender Tendenz (Kempf 2007).

Jede *Bartonella* - Art besitzt einen spezifischen (Säugetier-)Wirt, der ihr natürliches Reservoir darstellt, sowie einen spezifischen Arthropoden - Vektor, welcher den Erreger innerhalb der Population von Reservoirwirten überträgt. An die Übertragung durch blutsaugende Arthropoden sind alle *Bartonella* - Arten hervorragend angepasst. So verursachen sie bei ihren Reservoirwirten eine lang anhaltende, intraerythrozytäre Bakteriämie, aber meist keine oder lediglich milde Krankheitssymptome. Erstaunlicherweise kommt es dabei nicht zu einer Hämolyse, was eine Selbstlimitierung der Erregervermehrung in den roten Blutkörperchen voraussetzt – ein weiterer Hinweis auf die optimale Anpassung von *Bartonella* spp. an ihre Reservoirwirte. Eine Ausnahme bildet die durch *B. bacilliformis* hervorgerufene Carrión-Krankheit des Menschen, in deren akuter Phase, dem sogenannten Oroya-Fieber, es zu einer massiven hämolytischen Anämie kommt.

#### 2.1.2 Pathogenese einer Infektion mit *Bartonella* spp.

Schülein und Mitarbeiter zeigten im Tiermodell anhand der rattenadaptierten Spezies *B. tribecorum*, dass diese erst fünf Tage nach der Infektion im Blut nachzuweisen ist (Schülein et al. 2001). Im Blut kommt es zur Anbindung und zum Eindringen des Erregers in die Erythrozyten, gefolgt von einer Vermehrungsphase, welche zwei bis vier Wochen *post infectionem* von selbst zum Stillstand kommt. Von diesem Zeitpunkt an persistieren die Bakterien in großer Zahl in den Erythrozyten, wo sie durch blutsaugende Vektoren aufgenommen und weiterverbreitet werden können.

Ungeklärt bleibt die Frage, was innerhalb der fünf Tage zwischen der Infektion und der erstmaligen Nachweisbarkeit von *B. tribecorum* im Blut geschieht. Man geht von der Existenz einer sogenannten Primärnische aus, deren Besiedlung den Bakterien Schutz vor dem Immunsystem des Wirts bietet und sie möglicherweise sogar erst zur Invasion der roten Blutkörperchen befähigt. Als Primärnische werden einerseits Endothelzellen diskutiert, die ein bevorzugter Aufenthaltsort von *Bartonella spp.* zu sein scheinen, andererseits die hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Da hämatopoetische Stammzellen nicht ausschließlich an das Knochenmark gebunden sind, sondern auch in verschiedenen Geweben die Basis für extramedulläre Hämatopoese bilden, eignen sie sich hervorragend als Transportvehikel für pathogene Erreger (Kolb-Mäurer und Goebel 2003). Allerdings sind sie in der Regel auch besonders widerstandsfähig gegenüber bakteriellen Infektionen, zum Beispiel durch *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* und *Yersinia enterocolitica* (Kolb-Mäurer et al. 2002). *B. henselae* dagegen ist in der Lage, unreife (CD34 - positive) hämatopoetische Vorläuferzellen des Menschen zu infizieren und auch deren Differenzierung zu reifen Erythrozyten zu überstehen (Mändle et al. 2005). Ob dieser Mechanismus auch für die Invasion feline Erythrozyten gilt, ist bislang nicht bekannt. *B. henselae* ist zwar *in vitro* durchaus zur Invasion von Katzenerythrozyten in der Lage (Mehok et al. 1998), doch sie geschieht nicht effizient genug, um die große Anzahl intraerythrozytärer *B. henselae* zu erklären (Rolain et al. 2001).

### 2.1.3 Wichtige Vertreter der Gattung *Bartonella*

Die bekanntesten Mitglieder der Gattung sind die humanpathogenen *B. quintana*, *B. bacilliformis* und *B. henselae*. In Tabelle 2.1 sind die wichtigsten Informationen über diese drei Arten zusammengestellt.

Tabelle 2.1 Bekannteste Vertreter der Gattung *Bartonella* mit ihren jeweiligen Reservoir- und Endwirten, Vektoren und den Erkrankungen, die sie verursachen.

Erreger	Reservoir (Endwirt)	Arthropodenvektor	Erkrankung
<i>B. quintana</i>	Mensch (Mensch)	Körperlaus ( <i>Pediculus humanis</i> )	Trench Fever, Bazilläre Angiomasose, Endokarditis
<i>B. bacilliformis</i>	Mensch (Mensch)	Gnitzen ( <i>Lutzomyias verrucosum</i> )	Carrión-Krankheit: Oroya-Fieber bzw. Verruga peruana
<i>B. henselae</i>	Hauskatze (Mensch)	Katzenfloh ( <i>Ctenocephalides felis</i> )	Katzenkratzkrankheit, Bazilläre Angiomasose, Peliosis hepatis, Endokarditis

### *B. quintana*

*B. quintana* verursacht das sogenannte Schützengrabenfieber (Fünftagefieber, Trench Fever), welches zum ersten Mal in den läuseverseuchten Schützengräben des 1. Weltkriegs beschrieben wurde und dort etwa eine Million Menschen befiel.

Klassisches Schützengrabenfieber äußert sich durch plötzlich einsetzende Kopf- und Gliederschmerzen, typischerweise mit einer gesteigerten Schmerzempfindlichkeit der Schienbeine, sowie durch wiederkehrendes Fieber und Schwindelgefühle (Foucault et al. 2006). Insbesondere bei bestehender Vorschädigung der Herzklappen ist die Entstehung von Endokarditiden als Komplikationen einer *B. quintana* - Infektion beschrieben. Daneben verursacht *B. quintana*, ebenso wie *B. henselae*, Bazilläre Angiomatose (siehe S. 6). Da der Mensch für *B. quintana* nicht nur End- sondern auch Reservoirwirt ist, kann es darüber hinaus zu einer persistierenden Bakteriämie kommen, deren Dauer mit bis zu acht Jahren beschrieben wurde (Kostrzewski 1949).

Seit Mitte der 90er Jahre des zwanzigsten Jahrhunderts tritt Trench Fever wieder vermehrt auf, und zwar vorwiegend bei Obdachlosen und Menschen mit chronischem Alkoholmissbrauch sowie in Flüchtlingslagern (Spach et al. 1995; Foucault et al. 2006).

### *B. bacilliformis*

*B. bacilliformis* ist der Erreger der biphasischen Carrión-Krankheit, die heute noch in Teilen von Südamerika endemisch ist. Fieber und hämolytische Anämie kennzeichnen die akute Phase, das Oroya-Fieber, benannt nach einer Epidemie unter Bahnarbeitern an der Strecke Lima–La Oroya, die im 19. Jahrhundert viele tausend Todesopfer forderte. Etwa 10 % der Patienten, die die akute Phase überleben, entwickeln einige Wochen bis Monate später Umfangsvermehrungen in der Haut, die „Peruanischen Warzen“ (Verruga peruana). Diese bestehen aus Blutgefäßproliferaten, in denen mittels Warthin-Starry-Versilberung *B. bacilliformis* nachgewiesen werden kann. Der Beweis, dass es sich bei Oroya-Fieber und Verruga peruana um zwei Phasen derselben Krankheit handelt, gelang 1885 dem peruanischen Medizinstudenten Daniel Alcides Carrión. Im Selbstversuch ließ er sich mit Blut eines Patienten mit Verruga peruana inokulieren. Wenige Tage später entwickelte er Oroya-Fieber und starb (Garcia-Caceres und Garcia 1991). Für seine Selbstaufopferung im Dienste der Wissenschaft wird Carrión in Peru noch heute als Nationalheld verehrt.

### *B. henselae*

Im Gegensatz zu den humanspezifischen Arten *B. quintana* und *B. bacilliformis* handelt es sich bei *B. henselae* um einen Zoonoseerreger, der von seinem Reservoirwirt, der Hauskatze, durch Kratzen oder Beißen auf den Menschen übertragen wird (Koehler et al. 1994). Auch bei verschiedenen wildlebenden Klein- und Großkatzenarten sind Infektionen mit

## 2 Literaturübersicht

---

*B. henselae* inzwischen nachgewiesen. So zeigten Untersuchungen eine *B. henselae* - Seroprävalenz von 53 % bei Rotluchsen (*Felis rufus*) und 35 % bei Pumas (*Puma concolor*) in Kalifornien (Yamamoto et al. 1998). Molia und Mitarbeiter wiesen bei wildlebenden afrikanischen Löwen (*Panthera leo*) und Geparden (*Acinonyx jubatus*) das Vorliegen einer *B. henselae* - Bakteriämie nach (Molia et al. 2004). Die klinische Relevanz einer *B. henselae*-Infektion bei Klein- und Großkatzen ist noch unklar. Zumindest bei Leoparden (*Leopardus spp.*) und Jaguarundis (*Puma yagouaroundi*) scheint eine *B. henselae* - Bakteriämie jedoch nicht mit Veränderungen im Blutbild assoziiert zu sein (Guimaraes et al. 2010).

Bei *B. henselae* werden zwei Stämme unterschieden, die in unterschiedlichen geographischen Verbreitungsgebieten vorherrschen. Die Stämme vom Typ I (Houston) dominieren in Asien und dem Osten der Vereinigten Staaten (Boulouis et al. 2005), während in Europa überwiegend Stämme vom Typ II (Marseille) nachgewiesen werden (Fabbi et al. 2004). Unter Katzen wird der Erreger durch Flöhe übertragen (Chomel et al. 1996). Eine direkte Übertragung von *B. henselae* durch Katzenflöhe auf den Menschen wurde bisher nicht beschrieben.

Bei Menschen löst *B. henselae*, abhängig vom Immunstatus der Patienten, verschiedene Krankheitsbilder aus.

*B. henselae* - Infektionen bei immunkompetenten Menschen: An erster Stelle steht hier die 1950 von dem französischen Arzt Robert Debré (Debré et al. 1950) beschriebene **klassische Katzenkratzkrankheit** (Maladie des griffes des chats, Cat scratch disease), die allerdings erst 1993 durch Dolan dem kurz zuvor entdeckten Erreger *B. henselae* zugeordnet werden konnte (Dolan et al. 1993). Bei der klassischen Katzenkratzkrankheit, die bei rund 90 % der immunkompetenten Patienten mit einer *B. henselae* - Infektion auftritt (Arvand und Schäd 2006), bildet sich zunächst an der Eintrittspforte des Erregers eine kleine rote Papel. Sie ähnelt einem Insektenstich, wird aber weder von Juckreiz noch von Schmerzen begleitet. Tatsächlich wird diese Primärläsion von den Betroffenen meist übersehen. Sieben bis sechzig Tage später bildet sich die Sekundärläsion aus, eine lokale Lymphknotenschwellung im Abflussgebiet der Primärläsion. Die Lymphknotenschwellung kann mitunter beachtliche Ausmaße von fünf bis zwölf cm im Durchmesser annehmen, ist aber meist wenig schmerzhaft. In einigen Fällen kommt es zu einer Abszedierung des betroffenen Lymphknotens, was eine Eröffnung des Abszesses und eine antibiotische Behandlung erforderlich machen kann. Meist heilt die klassische Form der Katzenkratzkrankheit jedoch auch ohne Therapie nach einigen Wochen bis Monaten spontan aus (Sander 2003). Klinische Bedeutung erlangt sie damit in erster Linie als Differenzialdiagnose zu neoplastischen Lymphknotenschwellungen. Die Diagnose der Katzenkratzkrankheit wird jedoch schon bei der Erhebung der Anamnese

dadurch erschwert, dass die Betroffenen die plötzlich aufgetretene Lymphknotenschwellung nicht mit einem Wochen oder Monate vorher erfolgten Katzenbiss in Verbindung bringen.

Atypische Verläufe der Katzenkratzkrankheit sind bei immunkompetenten Patienten sehr selten. Das Okuloglanduläre Syndrom nach Parinaud ist ein Beispiel für eine solche **atypische Katzenkratzkrankheit**. Es handelt sich um eine granulomatöse Konjunktivitis und regionäre Lymphadenitis, die sich infolge der Infektion der Lidbindehäute durch *B. henselae* entwickelt. Im Unterschied zur klassischen Form geschieht das Einbringen des Erregers in die Augen jedoch in der Regel nicht durch Katzen, sondern durch die Patienten selbst (Jäckel et al. 2006). Ferner kann sich eine atypische Katzenkratzkrankheit in Meningitis und Enzephalitis oder einem systemischen (disseminierten) Verlauf äußern. Auch die atypischen Verlaufsformen der Katzenkratzkrankheit heilen meist innerhalb einiger Monate spontan und vollständig aus (Sander 2003).

Neben der klassischen und der atypischen Katzenkratzkrankheit gibt es weitere Ausprägungen von *B. henselae* - Infektionen bei immunkompetenten Menschen, die mitunter auch lebensbedrohliche oder gar tödliche Folgen haben können. So sind fatale Fälle von **Endokarditis** beschrieben, für die bereits bestehende Klappenvorschädigungen prädisponierend wirken (Hadfield et al. 1993). Darüber hinaus berichteten Wesseln und Mitarbeiter (2001) von einem gehäuftem Auftreten von plötzlichem Herztod bei schwedischen Orientierungsläufern, welches mit einer *B. henselae* - assoziierten **Myokarditis** in Verbindung gebracht wurde.

*B. henselae* - Infektionen bei immunsupprimierten Menschen: Im Unterschied zu der vergleichsweise harmlosen Katzenkratzkrankheit führt eine *B. henselae* - Infektion bei immunsupprimierten Patienten vermehrt zu systemischen Infektionsverläufen mit Osteolyse, Abszessen und Lungen- und Lebergranulomen (Kempf 2007). Eine Besonderheit der Infektion immunsupprimierter Menschen sind die **angioproliferativen Syndrome** Bazilläre Angiomatose und Peliosis hepatis.

**Bazilläre Angiomatose** ist gekennzeichnet durch knoten- oder plaqueartige Blutgefäßproliferate, die bevorzugt in der Haut, aber auch in den inneren Organen auftreten. Gazineo (2001) berichtet von einer Manifestation in Milz und Wirbelknochen, Slater und Min (1992) beschreiben eine polypoide Manifestation der Bazillären Angiomatose in der Bronchialschleimhaut. Ihr makroskopisches und histologisches Erscheinungsbild ist dem von Kaposi - Sarkomen sehr ähnlich und führt leicht zu Verwechslungen (Webster et al. 1992). Anders als das Kaposi - Sarkom ist die Bazilläre Angiomatose aufgrund ihrer infektiösen Ursache in der Regel behandelbar und spricht auf Antibiotika wie Erythromycin an. Lichtmikroskopisch

können mittels Warthin-Starry-Versilberung, aber auch mithilfe einer Giemsa-Färbung Endothel-assoziierte *B. henselae* bzw. *B. quintana* in den Läsionen nachgewiesen werden (Tsang et al. 1992).

Im Unterschied zu der Bazillären Angiomatose zeichnet sich **Peliosis hepatis** als angioproliferative Erkrankung der Leber nicht durch Umfangsvermehrungen, sondern durch blutgefüllte Hohlräume aus. Diese können im Durchmesser bis zu mehreren Millimetern groß werden und sind damit unter Umständen bereits mit bloßem Auge sichtbar. Anhand des lichtmikroskopischen Bildes und der vermuteten Pathogenese schlugen Yanoff und Rawson (1964) eine Unterscheidung zwischen zwei Ausprägungsformen der Peliosis hepatis vor: der phlebektatischen und der parenchymatösen Form. Bei der phlebektatischen Form wurde eine Aussackung der Zentralvenen der Leberläppchen für die Hohlraumbildung verantwortlich gemacht, während der parenchymatösen Form primär degenerative Ursachen, beispielsweise Kolliquationsnekrosen der Leber, zugeschrieben wurden. Zunächst ging man überwiegend von nicht-infektiösen Ursachen der Peliosis hepatis aus. Diese reichen von Azathioprin- oder Steroidtherapie (Degott et al. 1978; Wakabayashi et al. 1984) bis hin zu einer Langzeiteinnahme von oralen Verhütungsmitteln (van Erpecum et al. 1988). Überlegungen bezüglich einer infektiösen Ursache gingen in Richtung Tuberkulose (Zafranie et al. 1984). Aus heutiger Sicht erscheint durchaus denkbar, dass einige dieser in den 80er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts beschriebenen Fälle mit einer *B. henselae*-Infektion zusammenhängen, auf die zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht untersucht wurde.

Im Dezember 1990 stellten Perkocha und Mitarbeiter erstmals einen Zusammenhang zwischen Bazillärer Angiomatose und Peliosis hepatis her und diskutierten eine einheitliche Ätiologie der beiden Erkrankungen (Perkocha et al. 1990). Zeitgleich erforschte die Arbeitsgruppe um Relman den Erreger der Bazillären Angiomatose und stellte eine Verwandtschaft mit *Rochalimea (Bartonella) quintana* fest (Relman et al. 1990). Ebenfalls im Dezember 1990 beschrieben Slater und Mitarbeiter *B. henselae*, zu diesem Zeitpunkt allerdings noch namenlos, als ein neu entdecktes, anspruchsvolles Bakterium, welches Fieber und Bakteriämie bei zwei mit Humanem Immundefizienz Virus (HIV) infizierten Patienten verursachte (Slater et al. 1990). 1992 galt der Zusammenhang zwischen *B. henselae* und Bazillärer Angiomatose einerseits und Peliosis hepatis andererseits als erwiesen (Slater et al. 1992). Im Jahr 2000 wurde eine durch *B. henselae* verursachte Peliosis hepatis sogar bei einem Hund beschrieben (Kitchell et al. 2000).

Die Pathogenese der durch *B. henselae* induzierten Peliosis hepatis ist heute jedoch noch immer nicht abschließend geklärt. Wong und Mitarbeiter (2001) fanden Hinweise darauf,

dass hohe Konzentrationen von *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) bei der Entstehung von Peliosis hepatis eine Rolle spielen. Tatsächlich ist *B. henselae* in der Lage, die Ausschüttung von VEGF und anderen endothelialen Wachstumsfaktoren, wie Interleukin 8, zu induzieren. Wie von Riess und Mitarbeitern gezeigt wurde, geschieht dies durch eine Interaktion der Wirtszelle mit einem bestimmten Oberflächenprotein von *B. henselae*, dem *Bartonella* Adhäsion A (Riess et al. 2004). In der Wirtszelle wird dabei eine Signalkaskade ausgelöst, die zu einer Induktion von *Hypoxia Inducible Factor 1* und dadurch zu einer Ausschüttung von endothelialen Wachstumsfaktoren führt (Kempf et al. 2005).

## 2.2 *B. henselae* bei Katzen

### 2.2.1 Geographische Verbreitung

Infolge seiner Übertragung durch Katzenflöhe ist *B. henselae* vor allem in subtropischen Klimazonen weit verbreitet, die für die Stadien der Flohentwicklung günstige Bedingungen bieten. So ermittelte Fabbi bei flohbefallenen Katzen in Italien eine Seroprävalenz von etwa 12 %, wobei 60 % der seropositiven Katzen Antikörper gegen *B. henselae* Typ II (Marseille) aufwiesen (Fabbi et al. 2004). Im Gegensatz dazu wiesen lediglich 20 % der seropositiven Katzen Antikörper gegen Typ I (Houston) auf. Bei den übrigen 20 % der seropositiven Katzen wurden Antikörper gegen beide Typen nachgewiesen. Der Anteil der Katzen mit einer Bakteriämie durch *B. henselae* lag in dieser Untersuchung sogar bei 24 %.

Bei einer Studie aus der Schweiz lag dagegen die Seroprävalenz bei Katzen nur bei 8,3 % (Glaus et al. 1997). Dieser erhebliche Prävalenzunterschied ist einerseits sicherlich dem für Flöhe ungünstigeren mitteleuropäischen Klima geschuldet, andererseits aber auch der untersuchten Population: Während in der Studie von Fabbi streunende Katzen beprobt wurden, untersuchten Glaus und Mitarbeiter Katzen, die bei praktischen Tierärzten in der Schweiz vorgestellt wurden. Das Beispiel der beiden zitierten Studien veranschaulicht, dass die Verbreitung von *B. henselae* nicht nur von den klimatischen Bedingungen abhängt, sondern vor allem von Pflegezustand und Lebensraum der untersuchten Katzen.

### 2.2.2 Verbreitung von *B. henselae* innerhalb einer Katzenpopulation

Da die Übertragung des Erregers von Katze zu Katze durch Flöhe erfolgt, ist ein Befall mit Katzenflöhen für die Prävalenz von *B. henselae* von entscheidender Bedeutung (Chomel et al. 1996). Aufgrund des persistierenden und rezidivierenden Charakters der durch *B. henselae* hervorgerufenen Bakteriämie gilt dies auch, wenn der Ektoparasitenbefall schon einige Tage oder Wochen zurückliegt. So erklärt sich der teils erhebliche Unterschied in der Prävalenz von *B. henselae* - Infektionen zwischen streunenden und ehemals streunenden Katzen in Tierheimen auf der einen Seite und ihren privat gehaltenen Artgenossen auf der anderen Seite. In einer Berliner Untersuchung aus dem Jahr 2001 wiesen nur 1 % der privat gehaltenen



nen Katzen aus dem Patientengut der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität eine *B. henselae*-Bakteriämie auf, während 18,7 % der Katzen aus dem örtlichen Tierheim bakteriämisch waren (Arvand et al. 2001).

### 2.2.3 Bild einer *B. henselae* - Infektion bei Katzen

Eine Vielzahl von Untersuchungen hat sich bereits mit der Charakterisierung einer *B. henselae*-Infektion bei Katzen beschäftigt. Ihre Ergebnisse waren jedoch weitgehend ähnlich bis identisch. Bei allen **experimentellen Infektionen mit *B. henselae*** zeigten die inokulierten SPF Katzen eine langanhaltende, rezidivierende Bakteriämie, die von Abbot (1997) mit bis zu acht Monaten Dauer angegeben wurde. Zeitlich versetzt um einige Tage folgte die Serokonversion der Tiere, die ihren Höhepunkt vier bis acht Wochen nach der Infektion hatte und bis zu zwei Monate länger andauerte als die Bakteriämie (Greene et al. 1996; Abbott et al. 1997). Selbst auf dem Höhepunkt der Bakteriämie zeigten die Katzen dabei keinerlei klinische Symptome in den Studien von Abbot (1997), Regnery (1996), Kordick (Kordick et al. 1997) und Chomel (1996). Auch zeigten die Blutwerte der infizierten Katzen, abgesehen von der Bakteriämie, keine von der Norm abweichenden Befunde. Leichtes Fieber und ein geringfügig reduziertes Allgemeinbefinden beobachteten Yamamoto und Mitarbeiter (2002) bei Katzen, die intradermal mit einem aus einer bakteriämischen Katze gewonnenen Isolat von *B. henselae* inokuliert wurde. Ein humanes Isolat, das auf dieselbe Weise verabreicht wurde, führte dagegen zu keinerlei klinischen Erscheinungen. In einer anderen Studie kam es bei Einzeltieren zu milden neurologischen Symptomen (Kordick und Breitschwerdt 1997). Bei der experimentellen Infektion junger SPF Katzen durch Guptill und Mitarbeiter zeigten alle Tiere leichtes Fieber und Inappetenz sowie eine Vergrößerung der mandibularen und poplitealen Lymphknoten (Guptill et al. 1997). Schwerwiegendere klinische Symptome bei experimentell mit *B. henselae* infizierten Katzen wurden nur in einer einzigen Studie aus dem Jahr 1999 beschrieben: so berichtete O'Reilly von hohem Fieber, Inappetenz, Apathie und dem vermehrten Auftreten von neurologischen Symptomen, gepaart mit einer schmerzhaften Reaktion an der Inokulationsstelle. Er führte dies auf eine erhöhte Virulenz des *B. henselae*-Stammes LSU 16 zurück, den er für die Inokulation genutzt hatte (O'Reilly et al. 1999).

Nur in sehr wenigen der genannten Infektionsstudien wurden histologische Untersuchungen der Katzen durchgeführt. Wo dies doch geschah, stellten sich die Befunde weitgehend unspezifisch dar. So erwiesen sich die von Guptill beobachteten Lymphknotenschwellungen bei jungen SPF Katzen mit einer akuten *B. henselae*-Infektion als prominente lymphatische Hyperplasien. Auch die Milzen der infizierten Tiere zeigten eine gering- bis mittelgradige, lymphatische Hyperplasie sowie bei einer Katze vereinzelte Mikroabszesse. Eine andere Katze wies offenbar konfluierende, „nekrotisierende Granulome“ in einzelnen Lymphknoten auf, die dem Bild einer humanen Katzenkratzkrankheit ähnelten. Allerdings konnte in keiner

dieser Läsionen *B. henselae* dargestellt werden (Guptill et al. 1997). Chronisch infizierte SPF Katzen wiesen in einer Langzeitstudie von Kordick und Mitarbeitern darüber hinaus lymphozytäre und teils plasmazelluläre Entzündungen in Niere, Leber und Herzmuskel auf, welche von den Autoren weniger als spezifische Folge der *B. henselae* - Infektion, sondern vielmehr als unspezifische Folge einer hämatogenen Keimstreuung angesehen wurden (Kordick et al. 1999).

Im Vergleich zu den in Infektionsversuchen erhobenen Daten sind die Auswirkungen einer **natürlichen Infektion mit *B. henselae*** bei Katzen deutlich vielfältiger. So wurde der Erreger von Lappin und Mitarbeitern (2000) im Augenkammerwasser von Katzen mit Uveitis nachgewiesen. Glaus und Kollegen fanden einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer Infektion mit *B. henselae* und Harnwegsinfektionen (Glaus et al. 1997). Eine andere Arbeitsgruppe stellte dar, dass *B. henselae* nicht nur im Rahmen einer experimentellen Infektion, sondern auch bei natürlich infizierten Katzen zu einer Lymphadenopathie führen kann (Ueno et al. 1996). In der Studie von Ueno und Mitarbeitern ergaben sich auch erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen einer Infektion mit *B. henselae* und Gingivitis bzw. Stomatitis, die jedoch von einer anderen Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden konnten (Quimby et al. 2008).

### 2.2.4 Einfluss immunsuppressiver Koinfektionen

Es existieren nur wenige Daten bezüglich der möglichen Einflüsse einer Koinfektion mit Viren, die bei Katzen eine Immunsuppression verursachen. Eine Arbeitsgruppe in der Schweiz (Glaus et al. 1997) und eine japanische Arbeitsgruppe (Ueno et al. 1996) untersuchten neben der Seroprävalenz von *B. henselae* auch, ob eine Infektion mit Felinem Leukämievirus (FeLV) oder Felinem Immundefizienzvirus (FIV) vorlagen. Übereinstimmend fanden beide Gruppen, dass Katzen, bei denen serologisch eine Infektion mit *B. henselae* nachgewiesen wurde, genauso häufig mit FeLV und FIV infiziert waren wie *B. henselae* - negative Kontrollen. Während die Katzen in der japanischen Studie aber bei Koinfektion mit FIV und *B. henselae* signifikant vermehrt klinische Symptome, insbesondere Lymphknotenschwellung zeigten, wurde in der schweizerischen Studie kein Zusammenhang zwischen klinischer Symptomatik und *B. henselae* - Infektion bei gleichzeitiger FIV - Infektion beobachtet.

### 2.2.5 Peliosis hepatis bei Katzen

Anders als für Menschen wurde ein kausaler Zusammenhang zwischen einer *B. henselae* - Infektion und Peliosis hepatis für Katzen noch nicht gezeigt. Obwohl das Krankheitsbild bei Katzen analog dem des Menschen beschrieben ist (Torry und Walton 1975; Brown et al. 1994), existierten bisher keinerlei systematische Untersuchungen bezüglich möglicher infektiöser Ursachen einer Peliosis hepatis bei Katzen.

### 2.3 Diagnose einer *B. henselae* - Infektion

Es gibt eine Vielzahl von Möglichkeiten, eine *B. henselae* - Infektion zu diagnostizieren. Das folgende Kapitel soll einen Überblick über die verschiedenen Methoden geben.

#### 2.3.1 Direkte Nachweisverfahren

Kulturelle Anzucht: Im Falle einer Bakteriämie kann, sofern noch keine systemische Antibiose erfolgt ist, der Erreger aus dem Blut kultiviert und anschließend anhand von Kulturmorphologie und biochemischen Eigenschaften bzw. mittels PCR identifiziert werden. Auch aus Gewebeproben kann die Anzucht versucht werden, wobei sie aus Lymphknotengewebe von Patienten mit Katzenkratzkrankheit seltener gelingt als beispielsweise aus entzündlich veränderten Herzklappen bei *B. henselae* - assoziierter Endokarditis (La Scola und Raoult 1999). Generell gestaltet sich die kulturelle Anzucht schwierig, da *B. henselae* hohe Ansprüche an die Kultivierungsbedingungen stellt: so muss der mikroaerophile Erreger unter Zusatz von 5 % CO<sub>2</sub> auf Koch- oder Columbiabluthaltigen Nährböden bei 35 bis 37 °C angezüchtet werden (La Scola und Raoult 1999). Sein langsames Wachstum erfordert eine Kultivierungsphase von bis zu 120 Tagen. Dabei besteht eine hohe Überwucherungsgefahr durch schneller wachsende Keime (Kempf 2007). Die Verwendung von Isolator - Röhrchen, die zellwandauflösende Saponine enthalten, kann die Ausbeute der Blutkultur erheblich steigern, wobei dieser Effekt durch 24stündiges Einfrieren des Bluts vor Anlegen der Kultur noch einmal verstärkt wird (Brenner et al. 1997).

Polymerasekettenreaktion (PCR): Der schwierige und zeitraubende Nachweis mittels Blutkultur wurde in den letzten Jahren zunehmend verdrängt durch den direkten Nachweis mithilfe molekularbiologischer Methoden. Der Vorteil der PCR als Nachweismethode für *B. henselae* liegt in ihrer Geschwindigkeit bei hoher Sensitivität und Spezifität. Als Probe eignet sich sowohl frisches als auch formalinfixiertes und sogar in Paraffin eingebettetes Material, wobei bei letzterem die Nachweisempfindlichkeit etwa zehnfach reduziert ist (Qian et al. 2005). Sogar Eiter aus Lymphknotenabszessen kann zur Diagnose einer *B. henselae* - Infektion genutzt werden (Hansmann et al. 2005). Als Zielgene werden unter anderem das Citratsynthase (gltA)-Gen (Regnath et al. 1998; Margolis et al. 2003), die Riboflavin-Synthese (rib)-Gene (Bereswill et al. 1999), das Serinprotease A (htrA)-Gen (Anderson et al. 1994; Mouritsen et al. 1997) sowie Abschnitte der 16S-rDNA (Dauga et al. 1996) verwendet. Neben „einfachen“ PCR (30 bis 40 Zyklen, ein Primerpaar) werden dabei bevorzugt nested und semi-nested PCR-Protokolle eingesetzt, die in zwei Schritten ablaufen. Vorab wird hier ein Segment des Zielgens mit einem äußeren Primerpaar in 15 bis 25 Zyklen amplifiziert. Das Produkt dieser Reaktion wird dann in eine weitere PCR (30 bis 40 Zyklen) mit einem zweiten, inneren Primerpaar eingesetzt, dessen Zielsequenzen innerhalb des bereits ampfli-

fizierten Stückes aus dem ersten Schritt liegen. Im Falle der semi-nested PCR ist dabei entweder Vorwärts- oder Rückwärtsprimer des zweiten Schrittes mit dem des ersten Schrittes identisch, sodass insgesamt drei verschiedene Primer zum Einsatz kommen. In einer nested PCR werden jeweils zwei Vorwärts- und Rückwärtsprimer eingesetzt, also insgesamt vier verschiedene Primer.

Nested und semi-nested PCR bieten eine zusätzliche Steigerung der Nachweisempfindlichkeit gegenüber einer einfachen PCR. So ist die Empfindlichkeit einer (semi-)nested PCR etwa zehnfach höher als die einer Blutkultur und liegt bei einer Nachweisgrenze von etwa ein bis drei koloniebildenden Einheiten pro Probe (Roy et al. 2001) bzw. 0,5 pg bakterieller DNA (Mouritsen et al. 1997).

Quantitative PCR: Gegenüber den oben beschriebenen PCR-Methoden bietet die quantitative (Synonym: *Real-Time*) PCR die Möglichkeit, nicht nur eine qualitative Aussage über das Vorliegen von *B. henselae* im Probenmaterial zu treffen, sondern den Erreger auch gleichzeitig zu quantifizieren. Die Messung erfolgt auf der Basis von Fluoreszenz. Bei der Verwendung des Farbstoffes SYBR Green® beispielsweise steigt die Fluoreszenz proportional zur Produktmenge an, da sich der Fluoreszenzfarbstoff zwischen den Basen des amplifizierten Produktes einlagert (Zeaiter et al. 2003).

Spezialfärbungen: Gewebeproben, die für eine pathologische Untersuchung entnommen werden, können mittels Spezialfärbungen auf *B. henselae* untersucht werden. Dazu gehören die Warthin-Starry-Versilberung oder auch die Gimenez-Färbung (Warren et al. 1998; Bruneval et al. 2001). Solche Spezialfärbungen lassen sich im Rahmen der histologischen Routinediagnostik schnell und mit verhältnismäßig geringem Aufwand durchführen, allerdings sind sie nur im Falle eines positiven Ergebnisses aussagekräftig. Zudem sind sie keineswegs spezifisch. Zur Diagnosesicherung und zur Differenzierung einzelner *Bartonella* - Arten müssen zusätzlich molekularbiologische Methoden herangezogen werden.

Immunhistochemie: Eine immunhistochemische Untersuchung bietet gegenüber dem Einsatz von Spezialfärbungen eine höhere Sensitivität und Spezifität. Auf dem Markt sind monoklonale, gegen *B. henselae* gerichtete Antikörper erhältlich (Cheuk et al. 2006; Caponetti et al. 2009), aber auch polyklonale Antikörper werden eingesetzt (Lin et al. 2006). Weit verbreitet ist die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode), bei der ein zweiter, mit Biotin markierter Antikörper an die Primärantikörper bindet. Anschließend wird der Komplex aus Primär- und Sekundärantikörper, der an das gesuchte Epitop im Gewebe gebunden ist, mit einer Farbreaktion sichtbar gemacht. Hier kann zum Beispiel Diaminobenzol als Chromogen

verwendet werden, welches in Anwesenheit von Meerrettichperoxidase zu einem braunen Farbstoff umgesetzt wird.

### 2.3.2 Indirekte Nachweisverfahren

Immunfluoreszenztest (IFT): Für den serologischen Nachweis einer Infektion mit *B. henselae* stellt der Immunfluoreszenztest die Methode der Wahl dar. Dabei werden *B. henselae*-spezifische IgG im Patientenserum nachgewiesen und mittels eines fluoreszierenden Farbstoffes unter einem speziellen Mikroskop sichtbar gemacht. Ein IgG-Titer von  $\geq 1:200$  im IFT gilt als positiv für eine *Bartonella*-Infektion, ein Titer  $< 1:50$  als negativ. Titer zwischen diesen beiden Werten können auf eine *B. henselae*-Infektion im Frühstadium hinweisen, aber auch durch Kreuzreaktionen mit anderen Erregern verursacht und damit falsch-positiv sein. Eine serologische Befundung des *B. henselae*-spezifischen IgM-Titers ist in der Routinediagnostik bisher nicht etabliert (Kempf 2007).

Weitere serologische Tests: Andere serologische Tests, zum Beispiel ein *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) sind für die Diagnose einer *B. henselae*-Infektion derzeit nicht sinnvoll, da zu deren Sensitivität und Spezifität keine validierten Daten vorliegen (Kempf 2007).

## 2.4 Therapie von *B. henselae*-Infektionen bei Mensch und Katze

### 2.4.1 Therapie bei Menschen

In der Humanmedizin wird über die Wirksamkeit verschiedener antimikrobieller Chemotherapeutika bei *B. henselae*-Infektionen in vivo berichtet. So haben sich Makrolid-Antibiotika wie Azithromycin (Bass et al. 1998), Erythromycin und Clarithromycin (Gazineo et al. 2001) bewährt. Margileth berichtet von einem erfolgreichen therapeutischen Einsatz von Rifampin (Synonym: Rifampicin), Gentamicin und Ciprofloxacin. Unwirksam dagegen erscheinen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika wie Cephalosporine, Penicillin und Amoxicillin (Margileth 1992). Auch Doxycyclin und Clindamycin erwiesen sich als ungeeignet, ebenso wie Trimethoprim-Sulfonamide (Ridder et al. 2005).

Insgesamt gehört *B. henselae* als intrazelluläres Bakterium zu den therapeutisch schwer eliminierbaren Erregern und erfordert oft eine wochenlange und intensive antimikrobielle Chemotherapie. Die Lymphadenopathie einer klassischen Katzenkratzkrankheit wird dabei durch eine Antibiose weder qualitativ noch in ihrer Dauer beeinflusst (Spaulding und Hennesy 1960). So ist es kaum verwunderlich, dass eine gegen *B. henselae* gerichtete antimikrobielle Chemotherapie nur noch bei schweren, systemischen Verläufen der Katzenkratzkrankheit und bei immunsupprimierten Patienten empfohlen wird (Rolain et al. 2004). Für die

Therapie der Bazillären Angiomatose und Peliosis hepatis gilt dabei Erythromycin als Mittel der Wahl, welches allerdings über mehrere Wochen (Bazilläre Angiomatose), beziehungsweise Monate (Peliosis hepatis) eingenommen werden muss.

### 2.4.2 Therapie bei Katzen

Ähnliches gilt in der Tiermedizin. Im Hinblick auf die zunehmend bedenkliche Resistenzlage bei antimikrobiellen Chemotherapeutika empfiehlt die Arbeitsgruppe um Kordick, Katzen mit einer *B. henselae*-Bakteriämie nur im Ausnahmefall einer antibiotischen Behandlung zu unterziehen (Kordick et al. 1997). Eine solche Ausnahmeindikation könnte beispielsweise eine immunsuppressive Erkrankung des Katzenhalters sein, die bei Fortbestehen der Bakteriämie eine Abschaffung der Katze notwendig machen würde. In der genannten Studie hatten Kordick und Mitarbeiter die Wirksamkeit einer antimikrobiellen Chemotherapie bei 16 chronisch bakteriämischen Katzen untersucht, die sich auf natürlichem Wege mit *B. henselae* infiziert hatten. Es zeigte sich, dass lediglich bei einem Bruchteil der mit Enrofloxacin oder Doxycyclin behandelten Katzen eine dauerhafte Elimination von *B. henselae* aus dem Blut erfolgte. Die Enrofloxacintherapie war dabei der Gabe von Doxycyclin überlegen, allerdings in einer Dosierung, die weit über den Empfehlungen des Arzneimittelherstellers lag. Die Autoren der Studie führten dies auf die teilweise Verstoffwechslung des Enrofloxacins zu Ciprofloxacin zurück, welches auch in der Humanmedizin als wirksam gegenüber *B. henselae* gilt. Auch Kombinationstherapien mit Erythromycin und Doxycyclin sowie Doxycyclin mit Amoxicillin wurden als wirksam zur Reduktion und schließlich zur Elimination einer *B. henselae*-Bakteriämie beschrieben (Bergmans et al. 1996; Greene et al. 1996). Die Gabe von Enrofloxacin in einer niedrigeren, den Herstellerangaben entsprechenden Dosierung führte dagegen in einer anderen Untersuchung bei keiner der behandelten Katzen zu einer Beseitigung der Bakteriämie (Regnery et al. 1996). In allen an dieser Stelle zitierten Studien wurde die antimikrobielle Chemotherapie jeweils über mehrere Wochen durchgeführt.

### 2.5 *B. henselae* - Infektionen bei Hunden

Auch bei Hunden sind Infektionen mit *B. henselae* beschrieben. So berichten Mexas und Mitarbeiter (2002) von einer Dogge, einem Labrador und einem Rottweiler mit unklaren, chronischen Krankheitsgeschehen, bei denen schließlich eine *B. henselae*-Bakteriämie als mutmaßliche Ursache des klinischen Bildes identifiziert wurde. Eine andere Untersuchung berichtet von einem Basset mit granulomatöser Hepatitis, in dessen Lebergewebe *B. henselae* mittels PCR nachgewiesen wurde. Unter Therapie mit Azithromycin verbesserte sich sein klinischer Zustand (Gillespie et al. 2003). Ob und inwieweit *B. henselae* mit den klinisch beobachteten Erkrankungen der Hunde in den beiden geschilderten Studien tatsächlich in kausalem Zusammenhang stand, bleibt jedoch fraglich.

Unabhängig von ihrer klinischen Auswirkung ist jedoch schon alleine die Information, dass eine *B. henselae* - Infektion bei Hunden überhaupt vorkommt, durchaus bemerkenswert. Bislang wurde *B. henselae* als streng spezifisch in Bezug auf seinen Reservoirwirt angesehen. Möglicherweise stellen Hunde jedoch ein weiteres Reservoir für den Erreger dar. Diese Annahme wird gestützt durch den Nachweis von *B. henselae* - DNA in Blut und Lymphknoten von 15 Golden Retrievern im Jahr 2008 (Duncan et al.). Für die ursprüngliche Hypothese der Untersucher, eine *B. henselae* - Infektion sei mit der Entstehung maligner Lymphome bei dieser Hunderasse korreliert, fanden sich jedoch keine Anhaltspunkte. Für Aufregung sorgten Kitchell und Kollegen, die *B. henselae* - DNA im Jahr 2000 aus der Leber eines Golden Retrievers mit Peliosis hepatis amplifizierten (Kitchell et al. 2000). Allerdings wurde hier weder die Möglichkeit einer Bakteriämie untersucht, die ein falsch-positives Ergebnis der Leber hätte vortäuschen können, noch wurde eine nähere Eingrenzung der Lokalisation des Erregers in den Leberläsionen, beispielsweise mithilfe immunhistochemischer Färbungen vorgenommen. Auch konnten lichtmikroskopisch keine argyrophilen Strukturen in der Leber nachgewiesen werden. Bislang ist dieser Bericht über *B. henselae* - assoziierte Peliosis hepatis bei einem Hund der einzige seiner Art in der Literatur.

## 2.6 Immunsuppressive Virusinfektionen bei Katzen

### 2.6.1 Infektionen mit dem Felinen Leukämievirus (FeLV)

Das Feline Leukämievirus ist ein weltweit verbreitetes Gamma - Retrovirus, welches erstmals 1964 im Rahmen von Tumorübertragungsexperimenten in den Zellen eines malignen Lymphoms bei einer Katze beschrieben wurde (Jarrett et al. 1964a; Jarrett et al. 1964b). Katzen mit einer progressiven FeLV - Infektion scheiden das Virus im Speichel und Urin (Francis et al. 1977), aber auch mit der Milch (Hinshaw und Blank 1977) und im Kot aus (Gomes-Keller et al. 2009). Die Übertragung erfolgt daher vorwiegend horizontal bei engem Kontakt mit oronasaler Aufnahme des Virus, beispielsweise durch gegenseitiges Belecken oder gemeinsame Benutzung des Fress- und Trinkgeschirrs, sowie durch Bissverletzungen. Auch eine intrauterine und perinatale vertikale Übertragung des Virus ist beschrieben. Experimentelle Infektionen von trächtigen Katzen führten dabei zu einem Absterben der Früchte (Hardy et al. 1976). Unter natürlichen Bedingungen finden Infektionen mit den Virusstämmen FeLV-A, -B und -C sowie den Kombinationen -AB, -ABC und -AC statt. Infektionen der Kombination FeLV-BC kommen dagegen unter natürlichen Bedingungen nicht vor.

Abhängig von Immunstatus und Alter einer Katze bei der Erstinfektion sind vier verschiedene Verlaufsformen möglich: abortiv, regressiv, latent und progressiv (Torres et al. 2005). Sie werden diagnostisch unterschieden anhand der Kombination aus dem Vorhandensein von FeLV - Provirus, also in die Wirtszelle integriertem Virusgenom, und dem Nachweis von

## 2 Literaturübersicht

---

FeLV - Virusantigen. Virusantigen signalisiert die aktive Transkription des Virusgenoms in den infizierten Zellen und ist daher ein Merkmal einer produktiven Infektion. In Tabelle 2.2 sind die diagnostisch wichtigen Merkmale der vier verschiedenen Verlaufsformen einer FeLV - Infektion zusammengefasst.

Tabelle 2.2 Unterscheidung der vier Verlaufsformen einer FeLV Infektion anhand des Nachweises von FeLV - Provirus und -antigen mittels PCR bzw. Antigen-capture ELISA. Nach Torres et al. 2005.

	abortiver Verlauf	regressiver Verlauf	latenter Verlauf	progressiver Verlauf
Nachweis von FeLV - Provirus	-	+ → -	+	+
Nachweis von FeLV - Antigen	-	-	+ → -	+

Abortiver Verlauf: Katzen mit einem abortiven Infektionsverlauf zeigen weder eine Antigenämie noch kann bei ihnen jemals Provirus in Blutzellen oder in lymphatischen Geweben nachgewiesen werden. Ihr Immunsystem ist offenbar in der Lage, die FeLV - Infektion zu einem sehr frühen Zeitpunkt erfolgreich zu bekämpfen und infizierte Zellen vollständig zu eliminieren.

Regressiver Verlauf: Bei Katzen mit einem regressiven FeLV - Verlauf lassen sich dagegen vorübergehend geringe Mengen von Provirus in mononukleären Blutzellen und Knochenmark nachweisen, ohne dass es zu einer Antigenämie kommt. In dieser Phase sind sie nicht von Katzen mit einem latenten Verlauf zu unterscheiden, weshalb der Test nach einigen Wochen wiederholt werden sollte. Wird dabei kein Provirus mehr nachgewiesen, liegt ein regressiver Verlauf vor.

Latenter Verlauf: Katzen mit einer latenten FeLV - Infektion zeigen nur zu Beginn der Infektion für wenige Wochen eine transiente Antigenämie. Allerdings lässt sich bei ihnen dauerhaft eine gewisse Menge proviraler DNA in Blut, Knochenmark, Milz und Lymphknoten nachweisen. Bei einem Teil der Tiere ist, beispielsweise durch die Verabreichung von Kortikosteroiden, eine Reaktivierung des Virus mit Übergang in eine progressive Infektion möglich (Rojko et al. 1982). Dadurch stellen sie theoretisch ein Risiko für nichtinfizierte Katzen dar, die im selben Haushalt leben. Über Art und Ausmaß der tatsächlichen klinischen Bedeutung einer latenten FeLV - Infektion bei Katzen herrscht jedoch noch Uneinigkeit. So fanden sich in älteren Studien keine Hinweise auf klinische Erscheinungen bei latent FeLV - infizierten Katzen (Pedersen et al. 1984; Pacitti 1987). Dagegen zeigte eine neuere Untersuchung Hinweise auf eine Prädisposition solcher Katzen für verschiedene entzündliche Veränderungen wie Otitis und Enteritis, aber auch für nicht-entzündliche Veränderungen wie epitheliale Tumoren und Kardiomyopathie (Suntz 2007).



Progressiver Verlauf: Dieser ist durch eine produktive FeLV - Infektion gekennzeichnet, das heißt, in infizierten Zellen findet eine aktive Transkription des Virusgenoms statt. Entsprechend findet sich Virusantigen an der Oberfläche der infizierten Zellen. Bei dieser Verlaufsform kommt es zu einer persistierenden Antigenämie und einer hohen Proviruslast in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes, in Milz, Knochenmark und Lymphknoten. Zu Beginn der Infektion wird häufig eine massive Lympho- und Neutropenie beobachtet, die einerseits auf einer Zerstörung der Zellen im Rahmen der Virusreplikation, andererseits auch auf einer Knochenmarksdepression durch virale Proteine beruht. Bis zu 90 % der Katzen mit einer progressiven FeLV - Infektion sterben innerhalb von drei Jahren, beispielsweise an malignem Lymphom, aplastischer Anämie oder an sekundären und opportunistischen Infektionen infolge schwerwiegender Immunsuppression (Mullins und Hoover 1989).

Felines erworbenes Immunschwäche Syndrom (FAIDS): Hoover und Mitarbeiter beschrieben 1987 eine Virusvariante von FeLV, die bei 100 % der infizierten Katzen ein AIDS-ähnliches Syndrom auslöst (Hoover et al. 1987). Dabei erkrankte ein Teil der Katzen bereits nach drei Monaten an der akuten „Frühform“ von FAIDS, während andere Katzen erst ein bis zwei Jahre nach der Infektion die chronische „Spätform“ von FAIDS entwickelten. Beide Verlaufsformen einer Infektion mit dem FeLV/FAIDS-Virus eignen sich als Tiermodell menschlicher HIV-Infektionen.

Diagnose einer FeLV - Infektion: Progressive FeLV - Infektionen werden am lebenden Tier durch den Nachweis des p27-Kapsidproteins im Serum mittels Antigen-capture ELISA diagnostiziert. Latente Infektionen entgehen diesem Nachweis, da es hier nicht zu einer dauerhaften Antigenämie kommt. Im Rahmen der pathologisch-anatomischen Untersuchung am toten Tier kann provirale DNA mittels quantitativer PCR oder nested PCR nachgewiesen werden. Anstelle des Antigen-capture ELISA werden immunhistochemische Methoden verwendet, um Virusantigen und damit eine produktive Infektion nachzuweisen.

### **2.6.2 Infektionen mit dem Feline Immundefizienz Virus (FIV)**

Die Aufnahme des ebenfalls zu den Retroviren gehörenden Feline Immundefizienz Virus erfolgt im Unterschied zum FeLV in der Regel nicht oronasal, sondern über eine parenterale Übertragung von Speichel und Blut im Zusammenhang mit Biss- und Kratzverletzungen. Unkastrierte Kater mit Freigang, die über vier Jahre alt sind, sind besonders infektionsgefährdet, da sie am häufigsten in Kämpfe mit Artgenossen verwickelt werden (Courchamp et al. 1998). Nach einer ersten Virusvermehrung in den regionalen lymphatischen Geweben der Infektionsstelle kommt es innerhalb von wenigen Wochen zu einer Virämie. Diese kennzeichnet die erste der drei Phasen einer FIV - Infektion. Sie dauert einige Tage bis Wochen.

Klinisch äußert sich diese erste Infektionsphase meist in deutlichen, wenn auch wenig spezifischen Krankheitssymptomen. Neben Fieber und Mattigkeit werden häufig Stomatitis, Enteritis sowie eine generalisierte Lymphadenopathie beobachtet (Pedersen et al. 1989).

In der darauffolgenden „asymptomatischen Phase“ der FIV - Infektion erscheint die Katze klinisch gesund. Während die Virämie in dieser zweiten Phase durch eine starke humorale Immunantwort der Katze in Schach gehalten wird, vermehrt sich das Virus in den infizierten Geweben weiter und beginnt, zunächst unbemerkt, seine immunsuppressive Wirkung zu entfalten. Sie äußert sich in einer überproportionalen Abnahme von CD4+ T-Zellen (T-Helferzellen) im Vergleich zu den zytotoxischen CD8+ T-Zellen. Diese Abnahme ist einerseits auf eine Zerstörung der Zellen als direkte Folge der Infektion durch einen zytopathogenen Effekt des Virus, immunvermittelte Lyse und Apoptose zu erklären, andererseits auch auf eine verminderte Bereitstellung von CD4+ T-Zellen durch Knochenmark und Thymus zurückzuführen. Zudem zeigen die noch verbliebenen T-Lymphozyten funktionale Störungen. Aufgrund einer polyklonalen Stimulation von B-Zellen kommt es außerdem zu einer Hypergammaglobulinämie und einer vermehrten Bildung von Immunkomplexen. Obwohl die asymptomatische Phase mit bis zu sechs Jahren relativ lange andauern kann (Hofmann-Lehmann et al. 1997), folgt letztlich unweigerlich der Zusammenbruch des Immunsystems.

Eine erneute Virämie kennzeichnet den Eintritt in die dritte und letzte Phase („AIDS-ähnliche Phase“) der FIV-Infektion. In dieser wird das Krankheitsbild bestimmt durch sekundäre und opportunistische Infektionen, zunehmenden körperlichen Verfall und neurologische Erkrankungen (Pedersen et al. 1989).

Diagnose einer FIV - Infektion: Mithilfe der Untersuchung von Blutproben lässt sich eine FIV - Infektion eindeutig nachweisen. Am lebenden Tier steht dabei der Nachweis von Antikörpern gegen FIV mittels ELISA im Vordergrund, während in der Pathologie auf eine PCR zum Nachweis von Virusgenom in den Blutzellen zurückgegriffen werden muss (English et al. 1993).

### **2.6.3 Feline Parvovirose (feline Panleukopenie)**

Die feline Parvovirose ist eine weltweit vorkommende Infektionskrankheit, die durch das Feline Parvovirus (FPV) und, wenn auch wesentlich seltener, durch die eng verwandten Caninen Parvoviren (CPV) vom Typ 2a und 2b verursacht wird (Mochizuki et al. 1996; Truyen et al. 1996a). In Deutschland sind etwa 8 % der Parvovirose-Erkrankungen bei Katzen auf Infektionen mit CPV-2a oder CPV-2b zurückzuführen (Truyen et al. 1996b). Parvoviren sind kleine, unbehüllte DNA-Viren, die sich durch eine sehr hohe Widerstandskraft gegenüber Umwelteinflüssen auszeichnen. In vivo zeigen sie einen starken Tropismus zu einigen sich schnell teilenden Zellen. Die Infektion mit feline oder caninen Parvoviren erfolgt durch

oronasale Aufnahme, gefolgt von einer ersten Virusvermehrung in den Tonsillen, den retropharyngealen Lymphknoten, dem Thymus und den mesenterialen Lymphknoten. Nach dieser ersten Vermehrungsphase folgt die Virämiephase mit einer systemischen Verbreitung der Viren in alle lymphatischen Gewebe, das Knochenmark und die Epithelzellen des Dünndarms. Bei tragenden Katzen ist auch eine intrauterine Infektion der Fruchte möglich. Die Infektion der Fruchte betrifft dabei besonders stark die Purkinjzellschicht des Kleinhirns und führt zu einer Kleinhirnhypoplasie der Katzenwelpen (Schatzberg und Sharp 2003). Bei etwas älteren Tieren kommt es dagegen unter anderem zu einer katarrhalischen Enteritis mit großflächigen Verlusten von Darmepithel, da hier die sich schnell teilenden Kryptepithelzellen des Jejunums und Ileums infiziert werden (Parrish 1992). Im Knochenmark sind die Zellen der myeloischen Reihe besonders empfindlich gegenüber der Infektion mit FPV, sie gehen als erste Zellreihe zugrunde. Die Zellen der erythropoetischen Reihe sind dagegen erst bei hohen Infektionsdosen betroffen (Kurtzman et al. 1989). Dies führt, ebenso wie die Infektion der lymphatischen Gewebe mit Lymphozytolyse und Zelldepletion, zu dem charakteristischen, systemischen Mangel an Leukozyten, dem die feline Parvovirose ihren Namen „Panleukopenie“ verdankt. Der Verlauf der Infektion ist altersabhängig, mit schweren, perakuten bis akuten Verlaufsformen bei Katzenwelpen unter sechs Monaten. Ältere Tiere dagegen zeigen einen weniger schwerwiegenden, mitunter auch subklinischen Krankheitsverlauf. Klinisch dominiert neben einem gedämpften Allgemeinbefinden mit Anorexie und Fieber  $\geq 40\text{ }^{\circ}\text{C}$  eine deutliche Leukopenie bzw. Lymphopenie. Katzen mit einer Enteritis zeigen darüber hinaus Erbrechen und mehr oder weniger schweren, teils blutigen Durchfall (Parrish 1992).

Diagnose einer FPV - Infektion: Aufgrund ihres typischen Bildes ist ein Nachweis der feline Parvovirose bereits durch eine histologische Untersuchung möglich. Während im Knochenmark eine hochgradige zelluläre Depletion, teilweise auch mit fibrinoiden Nekrosen dominiert, beherrschen im Dünndarm massive, diffuse Kryptepithelnekrosen und eine hochgradige Depletion der Peyer'schen Platten das histologische Bild. Durch ein Absinken des Kryptenepithels in die depletierten Peyer'schen Platten hinein kommt es zu Kryptherniationen. Weiterhin ist das histologische Bild der Parvovirose durch sogenannte Kryptabszesse, also Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten in den Krypten gekennzeichnet. Molekularbiologisch lässt sich eine Infektion mit caninen oder feline Parvoviren mittels PCR im Knochenmark, in den lymphatischen Geweben und sogar im Kot nachweisen (Schunck et al. 1995).

### 2.7 Ziel der Untersuchung, Arbeitshypothesen

*B. henselae* - Infektionen bei Menschen können, je nach Immunstatus der Patienten, extrem unterschiedlich verlaufen. Derselbe Erreger, der bei immunkompetenten Menschen nahezu immer zu einer harmlosen, wenn auch unangenehmen Lymphadenopathie führt, kann bei immunsupprimierten Patienten lebensbedrohliche Erkrankungen wie die Bazilläre Angiomatose auslösen. Katzen dagegen zeigen meist, wenn überhaupt, nur die Symptome einer milden Allgemeininfektion mit transientem Fieber, Apathie und Inappetenz. Die Erreger-Wirt-Beziehung von *B. henselae* in Katzen ist bereits in sehr vielen Aspekten erforscht worden. Mögliche Wechselwirkungen einer Immunsuppression bei gleichzeitiger *B. henselae* - Infektion wurden bei Katzen jedoch bisher kaum beachtet, obwohl sich diese Fragestellung aus der vergleichenden Betrachtung des Krankheitsbildes bei Menschen ergibt. Der weitaus größte Teil der Erkenntnisse über *B. henselae* - Infektionen bei Katzen stammt aus experimentellen Studien an Laborkatzen. Systematische Untersuchungen an immunsupprimierten Katzen, die sich auf natürlichem Wege mit *B. henselae* infiziert haben, fehlen dagegen bisher.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen immunsuppressiven Erkrankungen und einer natürlich erworbenen *B. henselae* - Infektion bei Katzen zu charakterisieren. Folgende Arbeitshypothesen sollten dazu geprüft werden:

1. Die Prävalenz von *B. henselae* - Infektionen ist höher bei immunsupprimierten Katzen.
2. Eine *B. henselae* - Infektion zeigt bei immunsupprimierten Katzen einen unterschiedlichen Verlauf als bei immunkompetenten Katzen.

Ein solcher unterschiedlicher Verlauf könnte zum Beispiel vorliegen, wenn *B. henselae* auch bei immunsupprimierten Katzen Peliosis hepatis auslöste, oder wenn immunsupprimierte Katzen durch die *B. henselae* - Infektion für andere Erkrankungen prädisponiert wären.

Für die praktische Durchführung der Untersuchungen nach 1 und 2 ergab sich die Schwierigkeit, dass im Rahmen der pathologisch-anatomischen und -histologischen Diagnostik zwar morphologische Hinweise auf das Vorliegen einer Immunsuppression gewonnen werden können, funktionelle Tests der einzelnen Komponenten des Immunsystems jedoch postmortal nicht mehr möglich sind. Die Studie konzentrierte sich daher auf das Vorliegen von Koinfektionen mit den drei am weitesten verbreiteten Viren, die bei Katzen eine Immunsuppression bewirken können: FeLV, FIV und FPV.

## 2 Literaturübersicht

---

Die ursprünglichen Arbeitshypothesen 1 und 2 wurden wie folgt modifiziert:

1 (modifiziert): Die Prävalenz von *B. henselae* - Infektionen ist höher bei Katzen **mit einer FeLV-, FIV- oder FPV - Infektion.**

2 (modifiziert): Eine *B. henselae* - Infektion zeigt bei Katzen **mit einer FeLV-, FIV- oder FPV - Infektion** einen unterschiedlichen Verlauf als bei Katzen ohne diese Virusinfektionen.

## 3 Material und Methoden

Die in den Abschnitten 3.1 bis 3.6 dieses Kapitels beschriebenen Materialien und Methoden beziehen sich auf den prospektiven Teil der vorliegenden Arbeit. Ein kleinerer Teil der Studie, welcher der Untersuchung von Peliosis hepatis im Rahmen der Arbeitshypothese 2 diente, war retrospektiv gestaltet. Material und Methoden zu diesem Teil werden in Abschnitt 3.7 beschrieben.

### 3.1 Untersuchte Katzen

In den prospektiven Teil der Studie wurden 142 Katzen einbezogen. Darunter waren 139 Katzen aus dem Tierheim Berlin sowie zwei Katzen aus dem Tierheim in Zossen (Brandenburg). Daneben gelangte eine herrenlose Fundkatze mit dem Habitus eines Streuners über die Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin zur Einsendung. Es handelte sich durchweg um verendete oder euthanasierte Tiere, die während des Erhebungszeitraums von Oktober 2006 bis November 2008 zur pathologischen Untersuchung an das Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin übersandt wurden. Die Aufnahme in die Studie erfolgte kontinuierlich und unabhängig von Signalement, klinischen oder pathologisch-anatomischen bzw. -histologischen Diagnosen. Einziges Kriterium für die Aufnahme in die Studie war die Herkunft der Katze aus einem Tierheim bzw. ihre Vorgeschichte als Streuner. Alle Angaben zu Signalement, Herkunft, Anamnese und Vorbehandlungen der Tiere wurden den Untersuchungsaufträgen der einsendenden Tierärzte entnommen.

Die Sektion der Katzen erfolgte gemäß der Sektionsanleitung des Instituts für Tierpathologie der Freien Universität Berlin in der Fassung von Juni 2006.<sup>1</sup> Die pathologisch-anatomischen und -histologischen Diagnosen wurden durch die diensthabenden Sekanten und den jeweiligen Sektionsdienstleiter erhoben.

#### 3.1.1 Probenspektrum

Von allen eingesandten Katzen wurden umfangreiche Organ- und Gewebeproben zur immunhistochemischen und molekularbiologischen Untersuchung entnommen. Das Probenspektrum umfasste folgende Gewebe:

- |                                 |                    |
|---------------------------------|--------------------|
| 1. Mandibulare Lymphknoten      | 5. Leber           |
| 2. Retropharyngeale Lymphknoten | 6. Milz            |
| 3. Popliteale Lymphknoten       | 7. Peripheres Blut |
| 4. Tonsillen                    | 8. Knochenmark     |

---

<sup>1</sup> [http://www.vetmed.fu-berlin.de/einrichtungen/institute/we12/studium/sonstige\\_materialien/212sektionsbericht.pdf](http://www.vetmed.fu-berlin.de/einrichtungen/institute/we12/studium/sonstige_materialien/212sektionsbericht.pdf)

### 3.1.2 Probenentnahme

Die Probenentnahme erfolgte mit einem sterilen Besteck. Alle Gewebeprobe außer Blut wurden in der Mitte geteilt, wobei eine Hälfte für die immunhistochemische Untersuchung unverzüglich in 10%igem Formalin fixiert und die andere Hälfte für die PCR in sterilen 2 ml Reaktionsgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht) bei -20 °C asserviert wurde.

Die Entnahme der Lymphknoten fand unmittelbar nach dem Häuten des Tieres statt, während alle übrigen Organproben im Anschluss an den Sektionsgang entnommen wurden. Paarig angelegte Organe (Tonsillen, Lymphknoten) wurden bilateral entnommen und anschließend wie beschrieben jeweils geteilt. Etwa 200 µl Blut wurden aus dem Herzen entnommen und unverzüglich eingefroren. Wo eine Blutentnahme aus dem Herzen aufgrund einer intrakardialen Euthanasie nicht möglich war, wurden Blutgerinnsel aus den großen Körpervenen entnommen. Von Leber, Milz und Knochenmark wurden jeweils etwa 1,5 x 1,0 x 1,0 cm große Gewebestücke entnommen. Die zur immunhistologische Untersuchung vorgesehen Proben wurden im Anschluss an eine zwölfstündige Formalinfixierung in einem Einbettautomaten (Tissue -Tek® VIP, Sakura Finetek Germany GmbH, Heppenheim) entwässert und in Paraffin eingebettet (siehe Tabelle 3.1). Anschließend wurden die Paraffinblöcke bis zu ihrer Verwendung bei Raumtemperatur gelagert. Sofern tiefgekühlte Proben nicht innerhalb von zwei Wochen untersucht werden konnten, erfolgte ihre längerfristige Lagerung bei -80 °C.

Tabelle 3.1 Ablauf der Entwässerung und Paraffineinbettung von Gewebeproben für die immunhistochemische Untersuchung im Tissue-Tek® VIP.

	<b>Medium</b>	<b>Dauer</b>	<b>Temperatur</b>
1	Formalin 10 %	60 min	40 °C
2	Wasser	50 min	40 °C
3	Ethanol 70 %	50 min	40 °C
4	Ethanol 80 %	50 min	40 °C
5	Ethanol 90 %	50 min	40 °C
6	Ethanol 90 %	50 min	40 °C
7	Ethanol 100 %	50 min	40 °C
8	Ethanol 100 %	50 min	40 °C
9	Xylol	50 min	40 °C
10	Xylol	50 min	40 °C
11	Paraffin	50 min	60 °C
12	Paraffin	50 min	60 °C
13	Paraffin	50 min	60 °C
14	Paraffin	50 min	60 °C

### 3.1.3 DNA - Extraktion aus tiefgekühlten Gewebeproben

Die DNA - Extraktion aus den tiefgekühlten Gewebeproben der Katzen erfolgte mithilfe eines kommerziellen Kits (QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden). Das Protokoll des Herstellers wurde dabei je nach Art des Gewebes geringfügig modifiziert.

Lymphknoten, Tonsillen, Knochenmark: Diese vergleichsweise bindegewebsarmen Gewebe wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 200 µl Lysispuffer ATL und 20 µl Proteinase K (beides Qiagen) unter Zugabe von 200 µl phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, eigene Herstellung) bei 56 °C und 1400 rpm über Nacht in einem Schüttelblock vollständig verdaut (Thermomixer Compact, Eppendorf, Hamburg). Die Zugabe von PBS steigerte dabei die Effizienz des Verdauens erheblich, ohne dass gleichzeitig mehr Puffer ATL oder Proteinase K eingesetzt werden mussten.

Leber, Milz: Der hohe Bindegewebsanteil von Leber und insbesondere Milz machten die Homogenisierung dieser Gewebeproben vor dem Verdau erforderlich. Dazu wurden sie in gefrorenem Zustand mit 200 µl PBS in ein spezielles Reaktionsgefäß (Lysis Matrix D, MP Biomedicals, Eschwege) übertragen. Anschließend wurden die Gewebeproben in einem Homogenisator (Precellys 24, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bei 6800 rpm für 30 Sekunden zerkleinert. Nach kurzer Zentrifugation wurde nun der Überstand abgenommen und auf ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen. Wenn die Konsistenz der Gewebesuspension es nicht zuließ, mindestens 180 µl abzunehmen, wurden erneut 180 µl PBS hinzugegeben und nach kurzem Vortexen der nun verdünnte Überstand vollständig abpipettiert. Anschließend wurden dem Überstand 200 µl Lysispuffer ATL sowie 20 µl Proteinase K zugegeben und die Proben bis zur vollständigen Lyse (etwa 2 bis 3 Stunden) in einem 56 °C warmen Schüttelblock bei 1400 rpm inkubiert.

Peripheres Blut: Die Proben des peripheren Blutes wurden mit jeweils 250 µl Lysispuffer AL sowie 25 µl Proteinase K (beides Qiagen) versetzt und nach kräftigem Vortexen für etwa eine halbe Stunde oder bis zur vollständigen Zellauflösung bei 56 °C mit 1400 rpm geschüttelt.

Im Anschluss an den Gewebeverdau wurden die Proben von Lymphknoten, Tonsillen, Milz, Leber und Knochenmark mit 250 µl Lysis Buffer AL versetzt, kräftig gemischt und für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zusatz von jeweils 250 µl 100%igem, vergälltem Ethanol. Anschließend wurden 750 µl des mit Ethanol versetzten Lysets auf eine Trennsäule übertragen und diese mit rund 17982 x g zentrifugiert.



## 3 Material und Methoden

---

Bei allen folgenden Zentrifugationsschritten wurde eine relative Zentrifugalbeschleunigung von 17982 x g beibehalten. Nach zwei Waschschrinen mit den Puffern AW 1 und AW 2 (beides Qiagen) wurde die DNA von den Säulen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß hinein eluiert. Statt des vom Hersteller empfohlenen Elutionspuffers wurden 100 µl hochreines, DNase und RNase freies Wasser als Elutionsmittel verwendet (Ultra pure Water, Biochrom AG, Berlin). Für Blutproben betrug die Inkubationsdauer des Wassers auf den Säulen 5 min bei Raumtemperatur. Bei allen anderen Gewebeproben wurden die Säulen dagegen mit zweimal 50 µl Wasser für 3 min bzw. 1 min inkubiert und zwischen den beiden Elutionsschritten einmal zentrifugiert. Das Eluat wurde bis zu der anschließenden Konzentrationsbestimmung auf Eis gekühlt.

### 3.1.4 Bestimmung der DNA - Konzentration im Eluat

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte spektralphotometrisch (NanoDrop® ND-1000, peqlab, Erlangen) aus 2 µl Eluat. Neben der Konzentrationsmessung [ng/µl] der enthaltenen DNA ermöglichte das Gerät eine Einschätzung der Qualität und Reinheit der DNA. Als ausreichend rein für die nachfolgenden Untersuchungen wurden DNA -Präparationen mit einem A 280/260-Quotient von mindestens 1,7 sowie einem A 260/230-Quotienten von mindestens 1,3 angesehen. Die Eluate wurden im Anschluss an die Messung bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

## 3.2 Nested PCR zum Nachweis von *B. henselae*

### 3.2.1 Primer

htrA-Gen: Zum Nachweis von *B. henselae* - DNA in den Organproben der Katzen wurden zwei nested PCR-Ansätze, nachfolgend bezeichnet mit Ansatz C bzw. D, mit Zielsequenzen auf dem Gen für die Serinprotease htrA (*high temperature requirement A*) gewählt. Alle acht Primer wurden anhand der Sequenz des htrA-Gens (GenBank Nr. L20127) von *Rochalimea (B.) henselae* entworfen und mittels Primer3<sup>2</sup>, einer im Internet verfügbaren Software, überprüft und modifiziert. Die Primersynthese erfolgte durch die Firma biomers.net GmbH (Ulm). Bei der Primerauswahl wurde bewusst auf kurze Amplifikate von unter 200 Basenpaaren (bp) Länge geachtet, um auch DNA aus formalinfixiertem, paraffineingebettetem Probenmaterial bearbeiten zu können. So amplifizierte das äußere Primerpaar des Ansatzes C ein 163 bp großes DNA-Fragment zwischen Nukleotidposition 1209 und 1372 des htrA-Gens, im Bereich der von Anderson und Mitarbeitern publizierten Primer CAT1 / CAT2 (Anderson et al. 1994). htrA 3+, der äußere Vorwärtsprimer, ist eine modifizierte Variante des Primers CAT1. Das innere Primerpaar amplifizierte ein 82 bp langes Fragment zwischen den Basen-

---

<sup>2</sup> [http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)

### 3 Material und Methoden

positionen 1250 und 1332. Die Zielsequenzen von Ansatz D lagen weiter *upstream* auf dem Gen, zwischen Basenposition 511 und 693. Das äußere Primerpaar erbrachte ein 182 bp langes Amplifikat, das innere Paar umfasste ein Fragment von 93 bp Länge zwischen den Basenpositionen 580 und 677. Die Sequenzen der vier inneren und der vier äußeren Primer für das htrA-Gen von *B. henselae* sind in Tabelle 3.2 wiedergegeben.

Tabelle 3.2 Primersequenzen und -positionen zum Nachweis des htrA-Gens von *B. henselae* (GenBank Nr. L20127)

Primer	Sequenz (5'-3')	Basenposition (Start)
<b>Ansatz C</b>		
htrA 3+ (außen)	gtgcgtaattaccgatcca	1209
htrA 4- (außen)	ccaaactcctaagggtactagtttc	1372
htrA 1+ (innen)	ctggatcaaggcaggtgatg	1250
htrA 2- (innen)	gcaatacgcttgctagatcac	1332
<b>Ansatz D</b>		
htrA 5- (außen)	gcgtaactgtgccatcaga	511
htrA 6+ (außen)	ccagatcaacatcccttgaaa	693
htrA 7+ (innen)	tttgcaacgttcgcatagact	580
htrA 8- (innen)	cagaaatcacatgattattggtcac	677

gltA-Gen: Zur Verifikation der Ergebnisse wurden alle mit den Ansätzen C und D positiv getesteten Proben einmal wiederholt und zusätzlich einer zweiten nested PCR unterzogen, die im Falle eines positiven Ergebnisses ebenfalls noch einmal in einem unabhängigen Durchlauf wiederholt wurde. Die zweite PCR amplifizierte ein 675 bp (äußere Primer) bzw. 354 bp (innere Primer) langes Fragment des Gens der Citratsynthase gltA (GenBank Nr. L38987). Die für das gltA-Gen verwendeten Primer wurden einer Publikation von Regnath und Mitarbeitern entommen (Regnath et al. 1998). Ihre Sequenzen und Basenpositionen sind in der Tabelle 3.3 aufgeführt.

Tabelle 3.3 Primersequenzen und -positionen zum Nachweis des gltA-Gens von *B. henselae* (GenBank Nr. L38987)

Primer	Sequenz (5'-3')	Basenposition (Start)
gltA f1 (außen)	ggccccaaactcttgccgctatg	504
gltA r1 (außen)	cagccgacactgcgtgctaattg	1178
gltA f2 (innen)	atgcctaaaaatgttacaaga	813
gltA r2 (innen)	cgtgctaattgcaaaaagaac	1166

### 3 Material und Methoden

---

Nur Ergebnisse, die sowohl mit den beiden htrA-Ansätzen als auch mit dem gltA-Ansatz positiv und reproduzierbar waren, flossen als endgültig positive Ergebnisse in die statistische Auswertung ein.

#### 3.2.2 Durchführung der nested PCR

htrA-Gen: Der erste Schritt der nested PCR (25 Zyklen) wurde mit den äußeren Primerpaaren von Ansatz C bzw. D durchgeführt. Im zweiten Schritt (35 Zyklen) kamen die jeweils inneren Primerpaare zum Einsatz.

Zunächst wurden in zwei auf Eis gekühlten 1,5 ml Reaktionsgefäßen die Reaktionsmischungen für Ansatz C und D erstellt. Tabelle 3.4 gibt die Zusammensetzungen der Reaktionsmischungen für Schritt 1 und 2 wieder.

Tabelle 3.4 Zusammensetzung der Reaktionsmischung pro PCR-Ansatz für ersten und zweiten Amplifikationsschritt der nested PCR für das htrA-Gen.

	<b>1. Schritt</b>	<b>2. Schritt</b>
5x GoTaq® Flexi Puffer	10 µl	10 µl
dNTP-Mix (je 2 mmol/µl)	5 µl	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (c = 25 mmol/µl)	4 µl	4 µl
Vorwärts Primer (c = 100 pmol/µl)	1 µl htrA 3+ / htrA 6+	1 µl htrA 1+ / htrA 7+
Rückwärts Primer (c = 100 pmol/µl)	1 µl htrA 4- / htrA 5-	1 µl htrA 2- / htrA 8-
Go Taq® Flexi Polymerase	0,2 µl (1 Unit)	0,2 µl (1 Unit)
Ultra pure H <sub>2</sub> O	18,8 µl	27,8 µl
[Template]	10 µl	1 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	50 µl	50 µl

Als Template eingesetzt wurden im ersten Schritt generell 250 ng DNA aus Blutproben und 350 ng DNA aus den übrigen Gewebeproben der Katzen in 10 µl hochreinem Wasser (Biochrom AG). Für den ersten Amplifikationsschritt der nested PCR wurde zuerst die Proben-DNA in die gekühlten PCR-Gefäße vorgelegt und danach die Reaktionsmischung zugegeben. Im zweiten Amplifikationsschritt war die Reihenfolge umgekehrt: je 1 µl des PCR Produkts aus dem ersten Schritt wurde unverdünnt in die vorgelegte Reaktionsmischung pipettiert. Die PCR-Gefäße wurden in beiden Schritten über den gesamten Zeitraum der Arbeiten auf Eis gekühlt. In beiden Schritten wurden Negativkontrollen mitgeführt, bestehend aus der vollständigen Reaktionsmischung ohne Zugabe von Template - DNA. Erst nachdem alle PCR-Gefäße mit Template und Reaktionsmischung versehen und fest verschlossen worden

### 3 Material und Methoden

---

waren, wurden 9 pg DNA aus hydrolysierten *B. henselae* als Positivkontrolle in das dafür vorgesehene PCR-Gefäß gegeben. Die Tabelle 3.5 gibt die Reaktionsbedingungen im Thermocycler (T 3000, Biometra, Göttingen) wieder.

Tabelle 3.5 Reaktionsablauf im Thermocycler mit Reaktionstemperaturen, -zeiten sowie Anzahl der Zyklen in der nested PCR (htrA-Gen).

		<b>1. Schritt</b>	<b>2. Schritt</b>
1.	Initiale Denaturierung (94 °C)	5 min	5 min
2.	Denaturierung (94 °C)	30 sec	30 sec
3.	Primer Anbindung (58 °C)	30 sec	30 sec
4.	Primer Verlängerung (72 °C)	90 sec	90 sec
	Anzahl Wiederholungen Schritt 2-4	24	34
5.	Abschließende Fragmentverlängerung (72 °C)	10 min	10 min

gltA-Gen: Auch die nested PCR zum Nachweis des gltA-Gens von *B. henselae* lief weitgehend wie oben beschrieben ab. Lediglich die Zusammensetzung der Reaktionsmischung unterschied sich geringfügig, da hier nur halb so viel MgCl<sub>2</sub> und ein Viertel der Primermenge eingesetzt wurde, also 50 mmol MgCl<sub>2</sub> und jeweils 25 pmol der Primer. Die Annealingtemperatur des ersten Amplifikationsschritts (25 Zyklen) betrug 65 °C statt 58 °C.

#### 3.2.3 Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

Im Anschluss an die PCR wurden die Amplifikate in einem 2,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Dabei wurden jeweils 10 µl PCR Produkt mit 3 µl glycerinhaltigem Ladebuffer (Roti®-Load DNA-small, Roth, Karlsruhe) auf das Gel aufgebracht. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das mit 1%igem Ethidiumbromid gefärbte Gel unter UV-Licht betrachtet (UV Transilluminator 2000, Biorad, München) und mithilfe einer speziellen Software (Quantity One 1-D Analysis Software) fotografiert und digital beschriftet.

#### 3.2.4 Nachweisgrenzen der nested PCR

Die Nachweisgrenzen der PCR für htrA und gltA wurden anhand einer geometrischen Verdünnungsreihe von 10<sup>6</sup> bis 0,1 Koloniebildenden Einheiten (KBE) schonend hitzedeaktivierter, jedoch nicht hydrolysiertes *B. henselae* bestimmt. Die Verdünnungsreihe wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Volkhard Kempf, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe - Universität, Frankfurt am Main. Zunächst wurde die bakterielle DNA mittels QiaAmp DNA Mini Kit isoliert (Qiagen). Dies erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers zur DNA - Präparation aus Bakterienkolonien. Anschließend wurde von acht Verdünnungsstufen zwischen 0,001 und 1000 KBE jeweils eine einfache PCR (35 Zyklen, äußere Primerpaare) und eine nested PCR wie beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden die Pro-

### 3 Material und Methoden

dukte in einem 2,8%igen Agarosegel wie beschrieben mittels Elektrophorese aufgetrennt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Ergebnisse für die beiden Ansätze des htrA-Gens sind in der Abbildung 3.1 dargestellt. Als positiver Nachweis wurde das Vorliegen einer deutlich sichtbaren, spezifischen Bande in der erwarteten Molekülgröße gewertet.

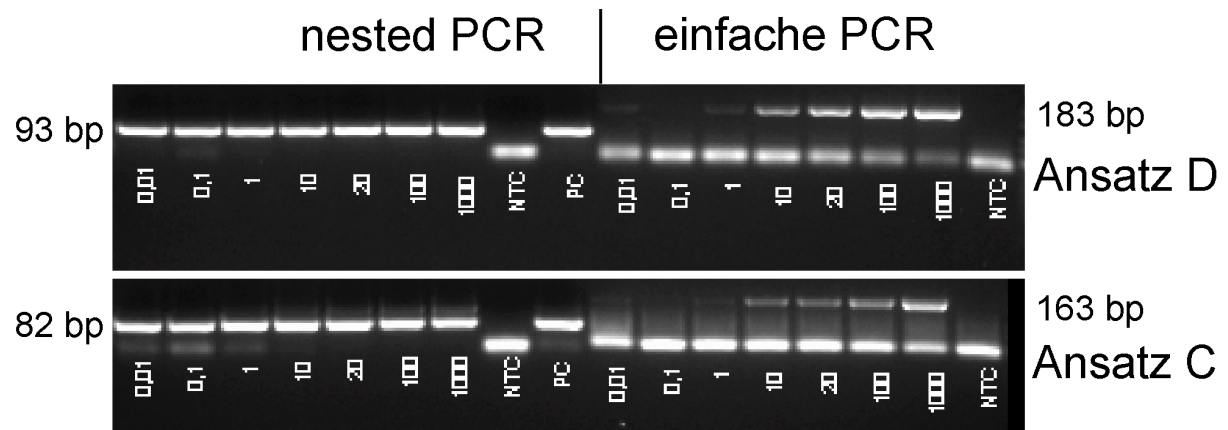


Abb. 3.1 Vergleich der Nachweisgrenzen der einfachen PCR vs. nested PCR für das htrA-Gen von *B. henselae*. Hier: Elektrophorese der Amplifikate aus einfacher PCR bzw. nested PCR einer geometrischen Verdünnungsreihe hitzedeaktivierter, nicht-hydrolysiertes *B. henselae*. PC = Positivkontrolle, NTC = Negativkontrolle.

Die Tabelle 3.6 fasst die Ergebnisse aus der Abbildung 3.1 für die Ansätze des htrA-Gens sowie für die PCR des gltA-Gens von *B. henselae* zusammen.

Tabelle 3.6. Vergleich der Nachweisgrenzen einer einfachen PCR mit einer nested PCR für die Gene htrA und gltA von *B. henselae* anhand einer geometrischen Verdünnungsreihe hitzedeaktivierter *B. henselae*.

KBE eingesetzt	Ergebnis der einfachen PCR (htrA-, gltA-Gen)	Ergebnis der nested PCR (htrA-Gen)	Ergebnis der nested PCR (gltA-Gen)
0,001	-	-	+
0,01	-	+	+
0,1	-	+	+
1	-	+	+
10	+	+	+
20	+	+	+
100	+	+	+
1000	+	+	+

Grundsätzlich waren die nested PCR-Ansätze um mindestens drei Zehnerpotenzen empfindlicher im Nachweis von *B. henselae* - DNA als die einfachen PCR-Ansätze. Der Nachweis für das *gltA*-Gen war mittels nested PCR nochmals um eine Zehnerpotenz empfindlicher als für das *htrA*-Gen.

#### 3.2.5 Vorversuch: Einfluss von Autolyse

Ein Teil der Katzen befand sich zum Zeitpunkt der Beprobung in einem Zustand fortgeschrittener Autolyse. Um mögliche falsch-negative Ergebnisse in den durch Autolyse und Fäulnis beeinträchtigten Tierkörpern auszuschließen, wurde in einem Vorversuch geprüft, ob und wie stark der qualitative Nachweis von *B. henselae* - DNA mittels PCR durch Autolyse beeinflusst wurde.

Dazu wurden 8 ml frisches Katzenvollblut unmittelbar nach der Entnahme mit  $9 \times 10^5$  KBE hydrolysierten *B. henselae* vermischt. Die hydrolysierten *B. henselae* wurden freundlicherweise von Dr. Mardjan Arvand, Universität Rostock, zur Verfügung gestellt. Das geronnene und mit *B. henselae* versetzte Blut wurde in 28 Aliquots von jeweils 250  $\mu$ l aufgeteilt. Dadurch ergab sich eine Konzentration von  $1,1 \times 10^5$  KBE hydrolysierter *B. henselae* pro ml Blut bzw. ein Gehalt von  $2,8 \times 10^4$  KBE pro aliquotierter Probe. Dieser Wert befindet sich im Bereich der in der Literatur für bakteriämische Katzen angegebenen Werte, die bei bis zu  $10^6$  KBE/ml liegen (O'Reilly et al. 1999). Als Negativkontrolle dienten 250  $\mu$ l des Vollbluts derselben Katze, welches unmittelbar nach der Blutabnahme abgefüllt wurde und zu keinem Zeitpunkt in Kontakt mit *B. henselae* - DNA kam.

Die DNA - Präparation des ersten Aliquots („Nullprobe“) erfolgte innerhalb der ersten Stunde des Experiments wie in Kapitel 3.1.3 für peripheres Blut beschrieben. Jeweils neun Aliquots wurden bei Raumtemperatur (etwa 20 °C) bzw. bei 4 °C für bis zu zehn Tage aufbewahrt, drei weitere Aliquots wurden für bis zu 10 Tage bei -20 °C tiefgefroren. Die Tabelle 3.7 fasst die unterschiedlichen Lagerungsdauern und -temperaturen dieser 21 Aliquots noch einmal zusammen.

### 3 Material und Methoden

---

Tabelle 3.7 Vorversuch zum Einfluss von Autolyse auf die Nachweisbarkeit von *B. henselae* - DNA mittels PCR. Hier: Lagerung von 21 Aliquots Katzenblut nach Zugabe von hydrolysierten *B. henselae* von 1 h bis 10 d bei -20 °C bis +20 °C. Im Anschluss erfolgte die Präparation der DNA und Untersuchung der Proben mittels nested PCR für das htrA-Gen wie beschrieben. In Klammern: Nummern der Aliquots.

Lagerungsdauer	+20 °C	+4 °C	-20 °C
1 h	(1)	(10)	
4 h	(2)	(11)	
12 h	(3)	(12)	
24 h	(4)	(13)	(19)
48 h	(5)	(14)	
3 d	(6)	(15)	
4 d	(7)	(16)	(20)
6 d	(8)	(17)	
10 d	(9)	(18)	(21)

Die übrigen sechs Aliquots Katzenvollblut, versetzt mit *B. henselae* - DNA, wurden einem Wechsel von Raum- und Tiefkühltemperatur ausgesetzt, um die Bedingungen zu simulieren, denen ein Teil der zu beprobenden Katzen erwartungsgemäß im Vorfeld der Sektion ausgesetzt sein würden. Insbesondere die Tierkörper von kleinen Haustieren werden häufig in der einsendenden Tierarztpraxis zunächst in einer Tiefkühltruhe gelagert, um dann mehr oder weniger gefroren zur Tierpathologie übersendet zu werden. Dort angekommen muss zunächst das vollständige Auftauen des Tierkörpers abgewartet werden, bevor die eigentliche Sektion stattfinden kann.

Um den Einfluss dieses Einfrierens und Auftauens auf die Nachweisbarkeit von *B. henselae* - DNA beurteilen zu können, wurden drei Aliquots für eine Woche eingefroren und anschließend für bis zu vier Tage bei Raumtemperatur gelagert. Drei weitere Aliquots wurden zuvor für einen Tag bei Raumtemperatur aufbewahrt, dann eingefroren und ebenfalls für bis zu vier Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt. In der Tabelle 3.8 sind die unterschiedlichen Lagerungsbedingungen der sechs Aliquots noch einmal zusammengefasst.

### 3 Material und Methoden

Tabelle 3.8 Vorversuch zum Einfluss von Autolyse auf die Nachweisbarkeit von *B. henselae* - DNA mittels PCR. Hier: Lagerung von sechs Aliquots Katzenblut nach Zugabe von hydrolysierten *B. henselae* für bis zu 13 Tage im Wechsel zwischen -20 °C und +20 °C. Anschließend erfolgte die Präparation der DNA und Untersuchung der Probe mittels nested PCR.

Aliquot-Nr.		-20 °C		+20 °C	
(22)	erst →	8 d	dann →	1 d	
(23)	erst →	8 d	dann →	2 d	
(24)	erst →	8 d	dann →	4 d	
Aliquot-Nr.		+20 °C		-20 °C	+20 °C
(25)	erst →	1 d	dann →	8 d	dann → 1 d
(26)	erst →	1 d	dann →	8 d	dann → 2 d
(27)	erst →	1 d	dann →	8 d	dann → 4 d

Bei allen Aliquots erfolgte nach Abschluss ihrer Lagerung unverzüglich die Extraktion und spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung der DNA wie für peripheres Blut in Kapitel 3.1.3 beschrieben. Anschließend wurde mit 50 ng Template DNA eine nested PCR für die Ansätze C und D des *htrA*-Gens durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.2). Hier zeigte sich, dass bei allen Aliquots der Versuchsanordnung außer der Negativkontrolle übereinstimmend in zwei unabhängigen Durchläufen *B. henselae* - DNA amplifizierbar war.

Schlussfolgerungen aus dem Vorversuch: Der qualitative Nachweis von *B. henselae* - DNA wurde durch die teilweise oder vollständig ungekühlte Lagerung des geronnenen Katzevollbluts nicht merklich beeinflusst. Selbst die Aliquots, die sechs oder sogar zehn Tage bei Raumtemperatur gelagert wurden, wiesen noch ausreichend intakte *B. henselae* - DNA auf, um einen positiven Nachweis mittels nested PCR zu ermöglichen. Auch die kombinierten Lagerungsbedingungen aus einem Wechsel von Raum- und Tiefkühltemperatur beeinflussten die Nachweisbarkeit von *B. henselae* nicht sichtlich.

### 3.3 Nachweis von *B. henselae* - Antigen im Gewebe

Alle Katzen, bei denen ein oder mehrere Gewebeproben in der PCR einen positiven Nachweis für *B. henselae* erbrachten, wurden zusätzlich einer immunohistochemischen Untersuchung unterzogen. Als Untersuchungsmaterial wurden dabei formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Proben derjenigen Organe ausgewählt, die bereits in der PCR positiv getestet wurden. Katzen, bei denen *B. henselae* in der PCR lediglich im Blut nachgewiesen wurde, wurden mit Leber, Milz und den mandibularen Lymphknoten in die immunohistochemische Untersuchung einbezogen.



### 3.3.1 Antikörper

Erstantikörper: Als Erstantikörper wurde ein affinitätschromatografisch aufgereinigtes Kaninchen-Immunglobulin G (IgG) verwendet, welches gegen *Bartonella* Adhesin A (BadA), ein Oberflächenprotein von *B. henselae*, gerichtet war. Das Anti-BadA-IgG wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Volkhard Kempf, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe - Universität, Frankfurt am Main. Der Erstantikörper wurde im Verhältnis 1:5000 mit PBS verdünnt, dem 2 % bovines Serumalbumin zugesetzt war.

Zweitantikörper: Als Zweitantikörper wurde biotinyliertes Ziegen-anti-Kaninchen-IgG eingesetzt (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Dieses wurde im Verhältnis 1:200 mit reinem PBS verdünnt.

### 3.3.2 Durchführung der immunhistochemischen Untersuchung

In der Vorbereitung der immunhistochemischen Untersuchung wurden mithilfe eines Mikrotoms (HM 335E, Microm GmbH, Walldorf) 2-3 µm dicke Präparate erstellt und auf beschichtete Objektträger aufgezogen (Star Frost® adhäsiv, Knittel Glasbearbeitung, Braunschweig). Anschließend wurden die Präparate über Nacht bei 37 °C getrocknet und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

Für die immunhistochemische Untersuchung wurden die Präparate zunächst mit Xylole entparaffinisiert und in einer absteigenden Alkoholreihe gewässert. Endogene Peroxidasen wurden gehemmt durch eine 30-minütige Inkubation von 3 % Wasserstoffperoxid in Methanol (beides Roth, Karlsruhe). Die Antigendemaskierung erfolgte bei 37 °C in einer 0,1%igen Lösung von Pronase E (AppliChem GmbH, Darmstadt) in PBS für 12 min. Anschließend wurden die Objektträger in Coverplates montiert (Shandon Coverplate™, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich). Mit einer 20%igen Lösung von Ziegennormalserum in PBS unter Zusatz von 0,2 % bovinem Serumalbumin wurden während einer Inkubationszeit von 30 min unspezifische Bindungsstellen blockiert. Pro Präparat wurden dann 100 µl Erstantikörper zugegeben, die über Nacht bei 4 °C einwirkten. Am nächsten Tag wurden die Präparate mit PBS gespült und die unspezifischen Bindungsstellen erneut mit Ziegennormalserum und bovinem Serumalbumin blockiert, diesmal mit einer Einwirkzeit von nur 15 min. Danach wurden die Präparate mit je 100 µl Zweitantikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Spülen wurde das ABC - Reagenz zugegeben (Vector Laboratories), welches 30 Minuten lang einwirkte. Die Sichtbarmachung der Reaktion erfolgte durch 3'3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) als Chromogen. Dazu wurden vier DAB-Puffertabletten (Merck, Darmstadt) in 180 ml destilliertem Wasser gelöst. Nach Zugabe von 16 µl 30%igem Wasserstoffperoxid wurden die Präparate für acht Minuten in der DAB-

### 3 Material und Methoden

---

Lösung gefärbt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalan nach Meyer für drei Minuten, mit einer zehnminütigen Phase zum Bläuen. Nach dem Durchlaufen einer aufsteigenden Alkoholreihe zum Wasserentzug wurden die Präparate mit einem xylohaltigen Medium eingedeckt (Eindeckautomat: Leica CV3030, Nussloch). Die Konzentrationen der ab- und aufsteigenden Alkoholreihen sind in Tabelle 3.9 dargestellt.

Tabelle 3.9. Übersicht der absteigenden Alkoholreihe zur Entparaffinisierung und Wässerung bzw. der aufsteigenden Alkoholreihe zur Entwässerung der Gewebeschnitte im Rahmen der immunhistologischen Untersuchung. Pro Stufe wurden die Gewebsschnitte 3 min lang bei Raumtemperatur inkubiert.

<b>Absteigende Reihe</b>	Xylol	Xylol	100 % Ethanol	100 % Ethanol	96 % Ethanol	96 % Ethanol	70 % Ethanol
<b>Aufsteigende Reihe</b>	70 % Ethanol	96 % Ethanol	96 % Ethanol	100 % Ethanol	100 % Ethanol	Xylol	

#### 3.3.3 Kontrollen

Für jedes untersuchte Präparat wurde ein Nachfolgeschnitt als Negativkontrolle mitgeführt. Bei diesem wurde statt des anti-BadA-Antikörpers affinitätschromatographisch aufgereinigtes Kaninchen-IgG als Erstantikörper verwendet, das gegen ec10r, ein equines Protein, gerichtet war. Das Anti-ec10r-IgG wurde von der Firma Eurogentec (Belgien) hergestellt.

Präparate von einem Block formalinfixierter und in Paraffin eingebetteter Verozellen in Agar dienten als zusätzliche Negativkontrolle, während ein entsprechender Block mit *B. henselae*-infizierten Verozellen die Positivkontrolle lieferte. Dazu wurden die Verozellen bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 644 x g für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in 500 µl verflüssigten Agars mit einer Temperatur von 37 °C resuspendiert. Nach dem Erstarren in der Spitze eines 50 ml Falconröhrchens wurde der so gewonnene Agarkegel für 24 Stunden in 10%igem Formalin fixiert und anschließend mittels eines Automaten in Paraffin eingebettet (Tissue - Tek® VIP).

### 3.4 Nachweis immunsuppressiver Virusinfektionen

#### 3.4.1 PCR

Geprüft werden sollte, ob bei Katzen mit einer FeLV-, FIV- oder FPV - Infektion häufiger eine *B. henselae* - Infektion vorliegt (Hypothese 1) und ob diese Infektion bei ihnen anders verläuft, als in der Kontrollgruppe (Hypothese 2). Alle Katzen wurden mittels PCR auf diese drei Erreger getestet. Die Zusammensetzung der Reaktionsmischungen sowie die methodischen Abläufe entsprachen denen der PCR zum Nachweis von *B. henselae*. Die Primer wurden von der Firma biomers.net GmbH (Göttingen) hergestellt. Als Template eingesetzt wurden

### 3 Material und Methoden

jeweils 2 µl der Proben DNA - Lösung. In Tabelle 3.10 sind alle Daten zu den Primern und Annealingtemperaturen für die PCR - Untersuchungen auf FeLV, FIV und FPV zusammengefasst.

Tabelle 3.10. Primersequenzen, Annealingtemperaturen, Amplikonposition und -länge der PCR-Untersuchungen auf FeLV (GenBank L25632), FIV (GenBank NC.001482) und FPV (GenBank GQ169552).

Primer	Sequenz (5'-3')	Position (Start)	Annealingtemperatur [°C]	Länge Amplikon
<b>FeLV</b>				
f1 (vorwärts)	ttactcaagtatgttcccatg	2107	55	182 bp
r1 (rückwärts)	aggtcgaactctggtcaact	2290	55	
f2 (vorwärts)	cttgaggccaagaacagtta	2187	57,2	104 bp
<b>FIV</b>				
E1+ (vorwärts)	ccacaatatgtagcacttgacc	430	56	583 bp
E2- (rückwärts)	gggtactttctggcttaagggtg	1012	56	
N4- (rückwärts)	taatggtctgggagcatcag	678	56	249 bp
<b>FPV</b>				
1A+ (vorwärts)	cattgggcttaccaccattt	838	55	185 bp
2- (rückwärts)	cattgggcttaccaccattt	1757	55	

Nachweis von FeLV - Provirus: Zum Nachweis von FeLV wurde eine semi-nested PCR verwendet, deren Zielgen die U3 Region des LTR - Abschnitts des FeLV - Provirus war. Die nötigen Primersequenzen wurden Publikationen von Suntz (2007) und der Arbeitsgruppe um Jackson (Jackson et al. 1993) entnommen. Als Untersuchungsmaterial diente Knochenmark.

Nachweis von FIV - Provirus: Das Vorliegen einer FIV - Infektion wurde mittels einer semi-nested PCR an Blut getestet. Zielsequenz war das gag-Protein Gen des FI - Virus. Die Primersequenzen nach English und Mitarbeitern (1993) wurden dabei mithilfe von Primer3 modifiziert (siehe S. 26).

Nachweis einer FPV - Infektion: Das Vorliegen einer feline Parvovirose wurde aufgrund ihres typischen histologischen Bildes, insbesondere in Dünndarm, Knochenmark und den lymphatischen Geweben, nachgewiesen. Zur Diagnosesicherung wurde zusätzlich eine einfache PCR (35 Zyklen) durchgeführt, deren Primer einer Publikation von Schatzberg und Mitarbeitern (2003) entnommen und mittels Primer3 modifiziert wurden. Zielsequenz war das

VP2 Gen des Felinen Parvovirus. Da dieses auch für canine Parvoviren konserviert ist, wurden Infektionen mit CPV 2a und 2b ebenfalls erfasst. Obwohl theoretisch denkbar ist, dass einige der an Parvovirose erkrankten Katzen mit CPV 2a oder 2b infiziert waren, erfolgte auf dieser Ebene keine weitere Aufschlüsselung der Virusstämme, da für die hier untersuchte Fragestellung nicht die Infektionserreger selbst, sondern das von ihnen verursachte Krankheitsbild der felinen Parvovirose als entscheidend angesehen wurde. Zur Vereinfachung der Darstellung schließt der Ausdruck „FPV - Infektion“, soweit nicht ausdrücklich anders bezeichnet, im Folgenden sowohl Infektionen mit felinen als auch caninen Parvoviren ein, sofern sie bei den betroffenen Katzen die typischen Erscheinungen der felinen Parvovirose verursachen. Als Untersuchungsmaterial für die PCR zum Nachweis einer FPV - Infektion dienten Knochenmark und Lymphknoten.

Kontrollen: In jedem PCR Durchgang wurden im ersten und zweiten Amplifikationsschritt Negativkontrollen ohne Template - DNA mitgeführt. Als Positivkontrolle für den Nachweis von FeLV diente 50 ng DNA aus dem Knochenmark einer Katze mit einer progressiven FeLV - Infektion, die bereits klinisch durch einen p27-Antigen-capture ELISA diagnostiziert worden war. Die Katze wies ein multizentrisches, malignes Lymphom auf. Im Tumorgewebe wurde mittels immunhistochemischer Untersuchung FeLV - Antigen nachgewiesen (siehe Kapitel 3.4.2). Als Positivkontrolle für den Nachweis einer FIV - Infektion mittels PCR dienten 4 pg genomischer FIV - DNA aus der Zellkultur. Die DNA wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Marina Meli, Vetsuisse Fakultät, Universität Zürich. Für den Nachweis von FPV wurden 50 ng DNA aus den retropharyngealen Lymphknoten einer Katze als Positivkontrolle verwendet. Bei diesem Tier war eine Parvovirusinfektion pathologisch-anatomisch und -histologisch diagnostiziert und mittels PCR verifiziert worden.

#### **3.4.2 Nachweis von FeLV - Antigen**

Zur Unterscheidung zwischen latenten und progressiven Verläufen der festgestellten FeLV - Infektionen wurde bei allen Katzen, bei denen ein positiver Nachweis von FeLV - Provirus im Knochenmark vorlag, eine immunhistochemische Untersuchung des Knochenmarks auf gp70-Antigen durchgeführt. Das gp70-Antigen ist ein Hüllprotein des Felinen Leukämievirus, welches bei Vorliegen einer produktiven Infektion im Rahmen des progressiven Infektionsverlaufs an der Zelloberfläche infizierter Zellen exprimiert wird. Bei einem latenten Infektionsverlauf kommt es nicht zur Transkription der proviralen DNA, ein FeLV - Antigennachweis liefert in diesem Fall ein negatives Ergebnis.

Die Durchführung der immunhistochemischen Untersuchung auf gp70 erfolgte im Ablauf weitgehend analog zu der immunhistochemischen Untersuchung auf das BadA-Antigen von *B. henselae* (siehe Kapitel 3.3.2), allerdings geschah die Antigendemaskierung hier mithilfe

von Hitzeeinwirkung in der Mikrowelle. Dazu wurden die Präparate in einem 10 mM Citratpuffer (eigene Herstellung) für 12 min in einem haushaltsüblichen Mikrowellengerät bei 560 W erhitzt. Als Erstantikörper wurde ein monoklonaler Antikörper aus der Maus (MCA 1897, Serotec) in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt, als Zweitantikörper diente biotinyliertes Ziege-anti-Maus-IgG (Vector Laboratories) in einer Verdünnung von 1:200.

Für jedes untersuchte Präparat wurde ein Nachfolgeschnitt des gleichen Blocks als Negativkontrolle mitgeführt. Für die Negativkontrollen wurde eine Mischung aus gereinigten Maus-IgG aus Prä-Immunsereen in der Verdünnung 1:200 als Erstantikörper eingesetzt (Mouse Super Sensitive™ Negative Control, BioGenex, San Ramon, CA, USA). Als Positivkontrolle diente ein Präparat aus Tumorgewebe der progressiv FeLV - infizierten Katze mit dem multi-zentrischen, malignen Lymphom, deren Knochenmark auch als Positivkontrolle für die PCR genutzt wurde.

### **3.5 Zusammenhang zwischen interstitieller Nephritis und einer *B. henselae* - Infektion**

Die lymphoplasmazelluläre, interstitielle Nephritis wurde als mögliche Indikatorerkrankung zur Unterstützung der Hypothese 2 herangezogen, da sie vergleichsweise häufig auftritt und experimentell bei chronischer Bartonellose beobachtet wurde (Kordick et al. 1999). Zudem beobachteten Glaus und Mitarbeiter (1997), ein gehäuftes Auftreten von Harnwegserkrankungen bei *B. henselae* - seropositiven Katzen. Im Rahmen der vollständigen pathologisch-anatomischen und -histologischen Untersuchung wurde das Vorliegen einer lymphoplasmazellulären, interstitiellen Nephritis rein qualitativ anhand Hämatoxylin und Eosin gefärbter, histologischer Präparate beurteilt und anschließend mittels Kreuztabellen und dem zweiseitigen, exakten Test nach Fisher ausgewertet.

### **3.6 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Daten aus dem in Kapitel 3.1 bis 3.5 beschriebenen prospektiven Teil der vorliegenden Arbeit geschah mithilfe folgender Programme: Die Berechnung von Häufigkeiten sowie die Erstellung von 2 x 2 Kontingenztafeln (Kreuztabellen) wurde mit SPSS 16.0 durchgeführt. Anhand der Kreuztabellen wurden zweiseitige (*two-tailed*), exakte Tests nach Fisher bzw. Chi Quadrat Tests durchgeführt. Für beide Testarten wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  zugrunde gelegt. Die zweiseitigen, exakten Tests nach Fisher wurden von der Internetsoftware langsrud.com berechnet<sup>3</sup>, die Berechnung der Chi Quadrat Tests erfolgte mit SPSS 16.0. Weiterhin wurde eine loglineare Regression (Modell Poisson) der drei Parameter *B. henselae* - Infektion vs. FeLV - Infektion vs. Parvovirusinfek-

---

<sup>3</sup> [www.langsrud.com/stat/Fishertest.htm](http://www.langsrud.com/stat/Fishertest.htm)

tion mit SPSS 16.0 berechnet. Abschließend wurden 95%-Konfidenzintervalle für die in der vorliegenden Studie ermittelten Häufigkeiten der untersuchten Infektionskrankheiten mit Bi-AS™ für Windows bestimmt und die dazugehörige Grafik mit SPSS 16.0 erstellt.

### **3.7 Zusammenhang zwischen Peliosis hepatis und einer *B. henselae* - Infektion**

Neben der lymphoplasmazellulären, interstitiellen Nephritis wurde auch Peliosis hepatis als mögliche Indikatorerkrankung zur Unterstützung der Hypothese 2 herangezogen. Diese Erkrankung kommt bei Katzen nicht selten vor, doch Untersuchungen über einen kausalen Zusammenhang mit *B. henselae* und/oder mit einer Immunsuppression fehlten bisher. Ob ein solcher Zusammenhang vorlag, sollte in diesem retrospektiven Teil der vorliegenden Arbeit in zwei Schritten geprüft werden. Zunächst wurde mittels PCR und immunhistochemischer Untersuchung geprüft, ob *B. henselae* bei Katzen mit Peliosis hepatis, wie bei Mensch und Hund beschrieben, im betroffenen Lebergewebe nachweisbar waren. Im Falle positiver Ergebnisse sollte das Vorliegen immunsuppressiver Erkrankungen aller Katzen mit Peliosis hepatis ermittelt und mögliche statistische Zusammenhänge mittels Kontingenztafeln dargestellt werden. Aufgrund ihres retrospektiven Ansatzes konnten in dieser Teiluntersuchung im Allgemeinen lediglich Hinweise auf das Vorliegen möglicher immunsuppressiver Zustände erhoben werden, nicht jedoch der Status der Katzen im Hinblick auf eine FeLV-, FIV-, oder FPV - Infektion.

#### **3.7.1 Untersuchungsmaterial**

Als Untersuchungsmaterial dienten Gewebeproben von 26 Katzen mit Peliosis hepatis. Die Gewebeproben stammten jeweils zur Hälfte aus dem Institut für Tierpathologie der Freien Universität Berlin und dem Institut für Veterinärpathologie der Universität Zürich. Es handelte sich um formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Material aus den Jahren 1998 bis 2008. Die vollständigen Sektionsberichte zu diesen Katzen wurden den Sektionstagebüchern der beiden Institute entnommen und in Bezug auf Signalement, Todesursachen und mögliche immunsuppressive Krankheitsgeschehen ausgewertet.

#### **3.7.2 DNA - Extraktion aus paraffineingebettetem Lebergewebe**

Von jeder Katze wurde ein Paraffinblock mit Lebergewebe ausgewählt, in dem die kavernösen Läsionen der Peliosis hepatis besonders stark ausgeprägt waren. Von jedem der Blöcke wurden drei 5 µm dicke Schnitte in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt, Nümbrecht) entparaffinisiert. Den Schnitten wurde dafür zunächst 1 ml Xylol zugegeben. Anschließend wurden sie kräftig gevortext und für 1 min bei 17982 x g zentrifugiert. Nach der Abnahme des Überstands wurde der Vorgang einmal mit Xylol und zwei weitere Male mit 100%igem, ver-

gälltem Ethanol wiederholt. Eventuell vorhandene Reste von Alkohol verdampften während der anschließenden 20-minütigen Inkubation der geöffneten Reaktionsgefäße bei 37 °C. Das trockene Pellet wurde nun in 200 µl Tissue lysis Puffer ATL (Qiagen) unter Zugabe von 20 µl Proteinase K (Qiagen) resuspendiert und bis zur vollständigen Lyse bei 56 °C und 1400 rpm in einem Schüttelblock inkubiert. Die weitere Vorgehensweise für die DNA-Extraktion entsprach in allen Punkten der bereits für tiefgekühlte Gewebeproben beschriebenen Methode.

#### 3.7.3 Nachweis des htrA-Gens

Anschließend wurde eine nested PCR mit den Ansätzen C und D für das htrA-Gen von *B. henselae* durchgeführt. Die Zusammensetzung der Reaktionsmischung sowie die Programmierung der Thermocycler entsprachen dem Vorgehen für tiefgekühlte Gewebeproben (siehe Kapitel 3.2.2). Pro Probe wurden im ersten Amplifikationsschritt 900 ng Template-DNA eingesetzt. Um eine Hemmung der PCR durch die hohe Konzentration an Template-DNA auszuschließen, wurde jeder PCR-Ansatz nach Zugabe von Reaktionsmischung und Template - DNA in zwei Aliquots zu je 25 µl aufgeteilt. Eine Hälfte der Aliquots wurde nun mit 50 ng DNA aus hydrolysierten *B. henselae* bestückt, anschließend durchliefen alle Aliquots die Amplifikation wie bereits beschrieben. Nur Proben, bei denen das mit *B. henselae* - DNA versetzte Kontrollaliquot eine positive Bande zeigte, wurden in die Auswertung aufgenommen.

#### 3.7.4 Nachweis des pap31-Gens

Die Ergebnisse der htrA-PCR wurden mit einer weiteren *B. henselae* - spezifischen PCR bestätigt. Zielsequenz dieser PCR war ein 277 bp großes Fragment des Gens für pap31 (GenBank Nr. AF001274), ein Oberflächenprotein von *B. henselae*, dem eine bedeutende Rolle in der Erreger-Wirt-Interaktion zugeschrieben wird (Dabo et al. 2006). Die Primer wurden einer Publikation von Zeaiter und Mitarbeitern entnommen (Zeaiter et al. 2002). Die Reaktionsmischung dieser PCR unterschied sich in ihrer Zusammensetzung nur in der Menge der eingesetzten Primer (12,5 pmol statt 100 pmol) und der Magnesiummenge (50 mmol statt 100 mmol) von der Reaktionsmischung für den Nachweis des htrA-Gens. Die Annealingtemperatur der pap31-PCR (35 Zyklen) lag bei 54 °C. Die Tabelle 3.11 gibt die Sequenzen und Basenpositionen der für den Nachweis von pap31 genutzten Primer wieder.

Tabelle 3.11 Primersequenzen und -positionen für die PCR-Untersuchung auf das pap31-Gen von *B. henselae* (GenBank Nr. AF001274).

Primer	Sequenz (5'-3')	Position (Start)
pap1 (vorwärts)	ttctaggagtgaaccgat	437
pap2 (rückwärts)	gaaacaccaccagcaacata	713

#### 3.7.5 Nachweis von felinem EF1-alpha

Um fixations- und alterungsbedingte negative Einflüsse auf die Amplifizierbarkeit der aus den Paraffinblöcken gewonnenen DNA auszuschließen, wurde von jeder Leberprobe zusätzlich eine PCR für felines EF1-alpha (GenBank Nr. AY712790) durchgeführt. EF1-alpha, ein *Housekeeping* Gen, kommt in jeder Körperzelle vor und war daher in großer Menge in dem Probenmaterial enthalten. Die Primer für felines EF1-alpha wurden mithilfe der Primer3 Software entworfen (siehe S. 26). Sie amplifizierten ein Fragment, welches mit nur 68 bp Länge ähnlich groß war wie die Ampflikate der nested PCR für das htrA-Gen. Mit Ausnahme der gewählten Primer entsprachen das PCR-Protokoll und die Reaktionsmischung der PCR für EF1-alpha (35 Zyklen) denen des zweiten Schritts der htrA-Ansätze, bei einer Template - DNA Menge von 900 ng und einer Annealingtemperatur von 61 °C. In Tabelle 3.12 sind die Sequenzen und Basenpositionen der für den Nachweis von felinem EF1-alpha verwendeten Primer dargestellt.

Tabelle 3.12 Sequenzen und Basenpositionen der Primer für den PCR-Nachweis von felinem EF1-alpha (GenBank Nr. AY712790).

Primer	Sequenz (5'-3')	Position (Start)
EF1 $\alpha$ + (vorwärts)	caaaaatgaccaccaatgg	1007
EF1 $\alpha$ - (rückwärts)	ggcctggatgggtcaggata	1074

#### 3.7.6 Immunhistochemische Untersuchung auf BadA-Antigen

Die immunhistochemische Untersuchung der Lebern mit Peliosis hepatis auf *B. henselae* - Adhesin A wurde wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben durchgeführt. Als Erstantikörper wurde BadA-spezifisches, aufgereinigtes Kaninchen-IgG in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt. Nachfolgeschnitte des gleichen Paraffinblocks wurden als Negativkontrollen für jedes Präparat mit anti-ec10r-Kaninchen-IgG in der selben Verdünnung inkubiert. Biotinyliertes Ziege-anti-Kaninchen-IgG (Vector Laboratories) diente als Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:200. Als Positivkontrolle wurden humane Lymphknotenpräparate von Patienten mit Katzenkratzkrankheit verwendet, in denen *B. henselae* - DNA bereits mittels PCR nachgewiesen worden war. Die Lymphknotenpräparate wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Christoph Thorns, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck. Zusätzlich wurden die bereits beschriebenen Paraffinpräparate von *B. henselae* - infizierten, in Agar eingebetteten Verozellen als Positiv- bzw. Präparate von nichtinfizierten Verozellen als Negativkontrolle mitgeführt.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Sektionsbefunde

Die 142 untersuchten Katzen umfassten 70 männliche und 72 weibliche Tiere. Zwischen kastrierten und unkastrierten Tieren wurde dabei nicht unterschieden. Die Katzen waren zwischen zwei Wochen und 18 Jahre alt, mit einem mittleren Alter von 48 Monaten und einem medianen Alter von zwölf Monaten. Von vier Katzen (2,8 %) war das Alter nicht bekannt. Für die statistische Auswertung wurden zwei Altersgruppen gebildet. Eine Altersgruppe umfasste die bis zu zwölf Monate alten Katzen (71 Tiere, 50 %), die zweite Altersgruppe beinhaltete die 67 Katzen (47,2 %), die älter als zwölf Monate waren. In der Sektion und nachfolgenden histologischen Untersuchung ergaben sich zunächst keine nennenswerten Unterschiede in den pathologischen Bildern der FeLV-, FIV- oder FPV - infizierten Katzen mit oder ohne *B. henselae* - Infektion. Die Hauptbefunde der Sektion sowie die Daten zu vorliegenden Infektionen mit FeLV, FIV oder FPV sind in der Tabelle 4.2 für alle *B. henselae* - positiven Katzen zusammengefasst.

### 4.2 Nachweis einer Infektion mit *B. henselae*

#### 4.2.1 Nachweis mittels nested PCR

Bei elf von 142 Katzen war der Nachweis von *B. henselae* - DNA in einer oder mehreren Gewebeproben erfolgreich. Dieses Ergebnis war in jedem der insgesamt drei verschiedenen nested PCR-Ansätze (zweimal htrA-Gen, einmal gltA-Gen) identisch und konstant reproduzierbar. Daraus ergibt sich ein Anteil von 7,7 % *B. henselae* - infizierten Katzen in der gesamten Stichprobe. Mithilfe von BiAS™ für Windows wurde, ausgehend von dem Schätzwert 7,7 %, ein 95%-Konfidenzintervall mit einer Untergrenze von 4,4 % und einer Obergrenze von 14,3 % ermittelt. In einer früheren Studie einer anderen Arbeitsgruppe (Arvand et al. 2001) ergab sich für eine Stichprobe von Katzen aus demselben Tierheim ein Schätzwert von 18,7 % mit einer Obergrenze von 28,0 % und einer Untergrenze von 11,5 % für das 95%-Konfidenzintervall. Die Überschneidung der 95%-Konfidenzintervalle für die in der vorliegenden Studie ermittelten und der von Arvand und Mitarbeitern gefundenen Prävalenz von *B. henselae* ist in Abbildung 4.1 graphisch dargestellt.

Am häufigsten wurde *B. henselae* - DNA in Blutproben nachgewiesen (acht der elf Katzen), gefolgt von den Tonsillen (drei Katzen) und den poplitealen Lymphknoten (drei Katzen). Bei zwei Katzen wurde *B. henselae* in der Milz nachgewiesen und bei je einer Katze in den mandibularen bzw. den retropharyngealen Lymphknoten oder im Knochenmark. Von den acht Katzen, die eine Bakteriämie zeigten, ließ sich der Erreger nur bei zwei Katzen auch in

## 4 Ergebnisse

anderen Gewebeproben nachweisen. Lediglich bei drei Katzen war *B. henselae* überhaupt in mehr als einem Probengewebe (inklusive Blut) nachzuweisen. Statistisch bestand bei den Katzen kein signifikanter Zusammenhang zwischen einer *B. henselae* – Infektion und Geschlecht ( $p = 0,126$ ) bzw. Alter ( $p = 0,392$ ), wie mithilfe des zweiseitigen, exakten Tests nach Fisher ermittelt wurde.

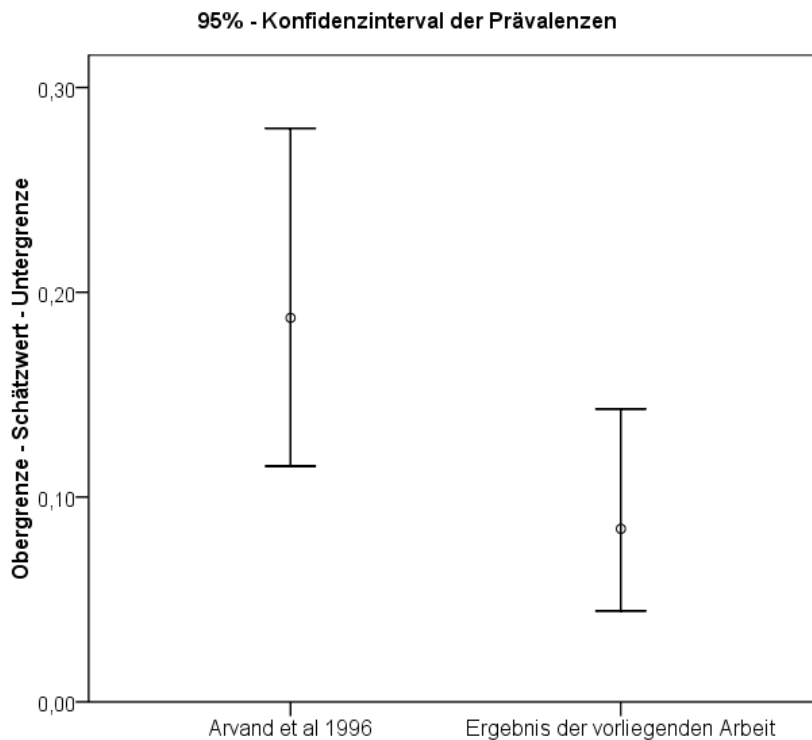


Abb. 4.1 Darstellung der 95%-Konfidenzintervalle der ermittelten und in der Literatur beschriebenen Prävalenzen für *B. henselae* - Infektionen bei Tierheimkatzen in Berlin.

### 4.2.2 Nachweis mittels immunhistochemischer Untersuchung

Nur drei der elf in der PCR positiv auf *B. henselae* getesteten Katzen (Nr. 1, 3 und 5 in der Tabelle 4.2) wurden auch positiv auf *B. henselae* - Antigen getestet. Dies entspricht, bezogen auf die gesamte Stichprobe, einer Prävalenz von 2,1 %, statt des in der PCR ermittelten Werts von 7,7 %. Damit erwies sich der immunhistochemische Nachweis einer *B. henselae* - Infektion als deutlich weniger empfindlich als die nested PCR.

Die Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung erfolgte rein qualitativ. Ein feingranuliertes bis konfluierendes, zytoplasmatisches Signal wurde als positiver Befund gewertet. Bei den immunhistochemisch positiv auf *B. henselae* getesteten Tieren wurde das BadA-Antigen durchweg in vereinzelt, histiozytären Zellen in lymphatischen Geweben nachgewiesen, und zwar in den poplitealen Lymphknoten (Katze Nr. 1 in der Tabelle 4.2), der Milz (Katze Nr. 5) sowie in Tonsillen und Milz (Katze Nr. 3). Die Katze Nr. 4, bei der *B. henselae* -

DNA mittels PCR in den Tonsillen nachgewiesen wurde, war in der immunhistochemischen Untersuchung negativ. Auch die sechs Katzen mit einer *B. henselae* - Bakteriämie waren im immunhistochemischen Nachweis (Leber, Milz, Mandibularlymphknoten) negativ.

### 4.3 Nachweis von Infektionen mit FeLV, FIV und FPV

Alle Katzen in der vorliegenden Studie wurden auf eine Infektion mit den drei wichtigsten Viren getestet, die bei Katzen eine Immunsuppression verursachen können: FeLV, FIV und FPV.

#### 4.3.1 FeLV - Infektion

Bei sechs von 142 Katzen (4,2 %) wurde in einem ersten Untersuchungsschritt FeLV - Provirus mittels semi-nested PCR im Knochenmark nachgewiesen. Vier dieser Katzen (Nr. 1, 2, 6 und 7 in der Tabelle 4.2) waren gleichzeitig mit *B. henselae* infiziert, wobei bakterielle DNA bei Ihnen in Blut und / oder Lymphknoten bzw. Tonsillen nachgewiesen wurde (siehe Tabelle 4.2). Für die 2 x 2 Kontingenztafel FeLV- vs. *B. henselae* - Infektion ergab der zweiseitige, exakte Test nach Fisher einen Wert von  $p = 0,00028$ . Dieser Wert liegt erheblich unterhalb des in der vorliegenden Arbeit definierten Signifikanzniveaus von  $p < 0,05$ .

Um bei den sechs FeLV - infizierten Katzen zwischen latenten und progressiven FeLV - Verlaufsformen differenzieren zu können, wurden Knochenmark, Milz und mandibulare Lymphknoten dieser Tiere in einem zweiten Schritt auf das FeLV-Hüllprotein gp70 immunhistochemisch untersucht. Vier Katzen (2,8 %, bezogen auf die ganze Stichprobe) erwiesen sich als latent mit FeLV infiziert: bei ihnen wurde zwar FeLV - Provirus im Knochenmark nachgewiesen, aber kein gp70-Antigen. Zwei der 142 Katzen (1,4 %) zeigten eine progressive FeLV-Infektion, hier waren sowohl Provirusnachweis als auch gp70-Antigennachweis positiv. Drei der vier Katzen mit einer latenten FeLV - Infektion wiesen gleichzeitig eine Infektion mit *B. henselae* auf (Katzen Nr. 1, 2 und 6), aber nur eine der beiden Katzen mit einer progressiven FeLV - Infektion (Katze Nr. 7).

#### 4.3.2 FIV - Infektion

Von insgesamt 20 Katzen lag keine verwertbare Blutprobe vor. Da Blut das geeignetste Gewebe für den Nachweis einer FIV - Infektion mittels PCR darstellt, wurde bei den 20 Tieren ohne verwertbare Blutprobe auf eine Erhebung des FIV - Status verzichtet. Um die Ergebnisse der Untersuchung nicht zu verzerren, gingen die fehlenden Werte nicht in die statistische Auswertung ein. Vier (3,3 %) der 122 Katzen, deren Blut untersucht wurde, erwiesen sich in der PCR als FIV - infiziert. Keine der FIV - positiven Katzen war gleichzeitig mit *B. henselae* infiziert, die beiden Merkmale FIV- und *B. henselae* - Infektion waren also

voneinander unabhängig ( $p = 1$ ). Ein Zusammenhang zwischen vermehrten klinischen Erscheinungen bei gleichzeitiger FIV - und *B. henselae* - Infektion, wie von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben, konnte damit weder bestätigt noch widerlegt werden (Ueno et al. 1996). Eine der vier FIV - positiven Katzen befand sich in der ersten Phase der Infektion, dem Lymphadenopathie - Stadium. Sie zeigte pathologisch-anatomisch und -histologisch eine massive, generalisierte, folliculäre und parafolliculäre Hyperplasie der lymphatischen Gewebe, welche laut Vorbericht bereits seit mehreren Wochen bestand. Die drei weiteren FIV - infizierten Katzen befanden sich offenbar in der zweiten, asymptomatischen Phase der Infektion, da sie weder Anzeichen einer Lymphadenopathie noch der sekundären und opportunistischen Infektionen zeigten, welche die dritte, terminale Phase einer FIV - Infektion kennzeichnen.

### 4.3.3 FPV - Infektion

Mittels histologischer Untersuchung und PCR wurde bei 62 von 142 Katzen eine Parvovirusinfektion diagnostiziert (43,7 %). Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen deckten sich dabei zu 100 % mit den Ergebnissen der PCR auf FPV.

Nur vier der 62 Katzen mit einer Parvovirusinfektion waren gleichzeitig mit *B. henselae* infiziert. Es bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen einer FPV - Infektion und einer Infektion mit *B. henselae* ( $p = 0,756$ ).

### 4.3.4 Statistische Auswertung mittels log-linearer Regression

Die Kombination der drei Merkmale *B. henselae* - Infektion, FeLV - Infektion und FPV - Infektion bei den Katzen wurde mithilfe einer log-linearen Regression nach dem Modell Poisson ausgewertet. Dabei wurden standardisierte Residualwerte nach Pearson für alle möglichen Kombinationen dieser Merkmale gebildet. Standardisierte Residuen  $> 2$  wurden als auffällig betrachtet. Für die Kombination aus einem positiven Ergebnis für *B. henselae* und FeLV und einem negativen Ergebnis für FPV ergab sich ein standardisierter Residualwert von  $sr = 5,351$ . Dies entspricht einer überzufälligen Häufung dieser Kombination. Die Nullhypothese, diese drei Merkmale seien voneinander unabhängig, kann somit abgelehnt und der statistisch signifikante Zusammenhang zwischen einer *B. henselae* - und einer FeLV - Infektion auch mit diesem zusätzlichen statistischen Verfahren eindeutig belegt werden.

## 4.4 Zusammenhang zwischen interstitieller Nephritis und einer *B. henselae* - Infektion

Lymphoplasmazelluläre, interstitielle Nephritis gehört zu den Läsionen, die im Zusammenhang mit chronischer feliner Bartonellose beschrieben wurden (Kordick et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit bestand jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen

## 4 Ergebnisse

---

interstitieller Nephritis und einer *B. henselae* - Infektion. Von den 142 untersuchten Katzen zeigten 36 (25,4 %) eine lymphoplasmazelluläre, interstitielle Nephritis, doch nur bei fünf dieser 36 Tiere wurde *B. henselae* - DNA in Blut oder inneren Organen nachgewiesen. Bezogen auf die ganze Stichprobe von 142 Katzen waren die beiden Merkmale „interstitielle Nephritis liegt vor“ und „*B. henselae* - Infektion liegt vor“ im exakten Test nach Fisher voneinander unabhängig ( $p = 0,111$ ). Auch für die Gruppen der FeLV-, oder FPV - infizierten Katzen konnte mittels Chi Quadrat - Test kein Zusammenhang zwischen einer *B. henselae* - Infektion und interstitieller Nephritis dargestellt werden ( $p = 0,540$  bzw.  $p = 0,561$ ). Da sich in der Gruppe der FIV - infizierten Katzen keine *B. henselae* - positiven Tiere befanden, war in dieser Gruppe die Unabhängigkeit von *B. henselae* - Infektion und interstitieller Nephritis bereits gegeben. In der Tabelle 4.1 sind die Ergebnisse der statistischen Tests für die Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen interstitieller Nephritis und *B. henselae* - Infektion für die einzelnen Gruppen noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 4.1 Untersuchung der Unabhängigkeit von interstitieller Nephritis und *B. henselae* - Infektion bei FeLV- und FPV - infizierten Katzen sowie in der gesamten Stichprobe;

a) Exakter Test nach Fisher, b) Chi Quadrat - Test

<b>Untersuchte Gruppe</b>	<b>Ergebnis des statistischen Tests</b>
Gesamte Stichprobe (n=142)	$p = 0,111$ <sup>a)</sup>
FeLV - positive Katzen (latent + progressiv infiziert)	$p = 0,540$ <sup>b)</sup>
FPV - positive Katzen	$p = 0.561$ <sup>b)</sup>

Zusammenfassend ergaben sich keine Hinweise auf eine Eignung der lymphoplasmazellulären, interstitiellen Nephritis als Indikatorerkrankung zur Unterstützung der Hypothese 2.

## Zusammenhang zwischen Peliosis hepatis und einer *B. henselae*-Infektion

Auswertung der Sektionsbefunde: Von den 26 Katzen mit Peliosis hepatis waren 14 männlich und zwölf weiblich. Die Tiere waren zwischen zwei und 20 Jahre alt, mit einem medianen Alter von 15 Jahren. Sechs Katzen waren aufgrund einer hypertrophen Kardiomyopathie verendet bzw. euthanasiert worden. Bei sechs Tieren stellten maligne Neoplasien den Hauptbefund der Sektion dar. Zwei weitere Katzen litten an einer Kombination aus hypertropher Kardiomyopathie und Tumorerkrankung. Vier Katzen zeigten mehr oder weniger ausgedehnte eitrig bis nekrotisierende Entzündungsgeschehen (Bronchopneumonie, Gingivitis, Hepatitis), eine Katze litt an Feliner infektiöser Peritonitis und drei Katzen waren aufgrund einer Ruptur der peliotischen Zysten in der Leber in die Bauchhöhle hinein verblutet. Zwei weitere Tiere waren an Herz-Kreislauf-Versagen mit unklarer Ursache verendet. Von einer Katze lagen keinerlei Daten vor. Keine der 26 Katzen wies eine feline Parvovirose auf. Eine Erhebung des FIV - und FeLV - Status der Tiere war aufgrund des sehr eingeschränkten verfügbaren Probenspektrums in diesem retrospektiv ausgelegten Teil der Studie nicht möglich. Weitere Krankheitszustände, die mit einer Immunsuppression einhergehen können, beispielsweise Kachexie, wurden bei keinem Tier diagnostiziert.

Nachweis einer *B. henselae* - Infektion: In keiner der Lebergewebeproben der 26 Katzen mit Peliosis hepatis ließ sich *B. henselae* - DNA mittels nested PCR für das htrA-Gen oder einfacher PCR für das pap31-Gen nachweisen. Dagegen erbrachte eine einfache PCR zum Nachweis von felinem EF1-alpha mit einer ähnlichen Amplikonlänge, wie die der gesuchten Produkte, bei allen 26 Proben ein positives Ergebnis (Abb. 4.2). Auch die Kontrollaliquots jedes Probenansatzes, die zusätzlich mit 50 ng *B. henselae* - DNA versehen wurden, zeigten positive Banden trotz des Einsatzes von 900 ng Template-DNA.

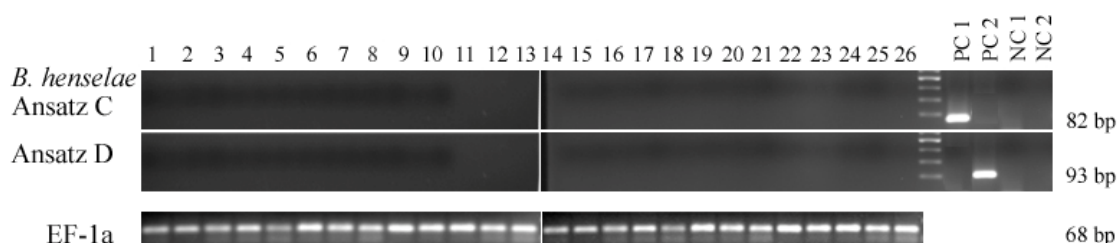


Abb. 4.2 Darstellung der PCR-Ergebnisse der Untersuchung von 26 Lebern mit Peliosis hepatis auf *B. henselae* - DNA und felines EF-1 $\alpha$  nach Gelelektrophorese der Amplifikate. PC 1 / 2 = Positivkontrollen des ersten bzw. zweiten Amplifikationsschritts, NC 1 / 2 = Negativkontrollen.

## 4 Ergebnisse

---

In keiner der Lebergewebeproben der 26 untersuchten Katzen mit Peliosis hepatis wurde *B. henselae* - Antigen immunhistochemisch nachgewiesen. Dagegen zeigten sowohl die als Positivkontrollen mitgeführten Lymphknotenpräparate von Patienten mit Katzenkratzkrankheit kräftige, zytoplasmatische Signale, als auch die formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten *B. henselae* - infizierten Verozellen in Agar.

Da in keiner der untersuchten Gewebeproben mit Peliosis hepatis *B. henselae* - DNA oder -Antigen nachgewiesen wurde, wurde auf eine statistische Auswertung der Ergebnisse dieses Teils der Untersuchung verzichtet.

Tabelle 4.2 Signalement, Sektionsbefunde und Ergebnisse der Untersuchungen auf FeLV-, FIV- und FPV-Infektion der elf in der PCR positiv auf *B. henselae* - DNA getesteten Katzen. IHC = immunohistochemische Untersuchung, LK = Lymphknoten, FeLV = Felines Leukämievirus, FIV = Felines Immundefizienzvirus, FPV = Felines Parvovirus, gp70 = Oberflächenantigen von FeLV zum Nachweis einer produktiven FeLV - Infektion.

Tier-Nr.	Geschlecht, Alter [Monate]	Gewebeproben mit einem positiven Nachweis von <i>B. henselae</i> mittels PCR	...bzw. IHC	Vorliegen einer FeLV – Infektion und Verlaufsfom der Infektion	Vorliegen einer FIV- oder FPV-Infektion	Hauptbefund der Sektion bzw. Todesursache
1	♂, 96	Popliteale LK	Popliteale LK	latent (Provirus + / gp70 -)	keine	Hypertrophe Kardiomyopathie
2	♂, 108	Blut	negativ	latent (Provirus + / gp70 -)	keine	Enterisches Leiomyom, Ileus
3	♂, 3	Popliteale LK, Tonsillen, Milz, Blut	Tonsillen, Milz	keine	keine	Urolithiasis, Hydronephrose, Kachexie
4	♂, n.a.	Tonsillen	negativ	keine	FPV	Nekrotisierende Enteritis
5	♀, 3	Milz, Knochenmark	Milz	keine	FPV	Nekrotisierende Rhinitis, Knochenmarksnekrosen
6	♂, 4	Blut	negativ	latent (Provirus + / gp70 -)	FPV	Nekrotisierende Rhinitis und Enteritis



Fortführung der Tabelle 4.2: Signalement, Sektionsbefunde und Ergebnisse der Untersuchungen auf FeLV-, FIV- und FPV - Infektion der elf in der PCR positiv auf *B. henselae* - DNA getesteten Katzen. IHC = immunhistochemische Untersuchung, LK = Lymphknoten, FeLV = Felines Leukämievirus, FIV = Felines Immundefizienzvirus, FPV = Felines Parvovirus, gp70 = Oberflächenantigen von FeLV zum Nachweis einer produktiven FeLV - Infektion.

Tier-Nr.	Geschlecht, Alter [Monate]	Gewebeprobe mit einem positiven Nachweis von <i>B. henselae</i> mittels PCR	...bzw. IHC	Vorliegen einer FeLV-Infektion und Verlaufsfom der Infektion	Vorliegen einer FIV- oder FPV-Infektion	Hauptbefund der Sektion bzw. Todesursache
7	♂, >12	Tonsillen, Blut, mandibulare, retropharyngeale, popliteale LK	negativ	progressiv (Provirus + / gp70 +)	keine	Chronische Myokarditis, hypertrophe Kardiomyopathie
8	♂, 144	Blut	negativ	keine	keine	Bilaterale, chronische, interstitielle Nephritis (Schrumpfnieren), Urämie
9	♀, 36	Blut	negativ	keine	keine	Epilepsie
10	♀, 5	Blut	negativ	keine	FPV	Nekrotisierende Enteritis
11	♂, 96	Blut	negativ	keine	keine	Eitrig-nekrotisierende Bronchopneumonie

## 5 Diskussion

Aus der Humanmedizin ist bekannt, dass eine Infektion mit *B. henselae* je nach Immunstatus der Patienten sehr unterschiedlich verlaufen kann. Immunkompetente Patienten erkranken meist an der relativ harmlosen Katzenkratzkrankheit, einer regionären Lymphadenopathie nach Biss- oder Kratzverletzung durch eine infizierte Katze, welche von selbst wieder ausheilt. Immunsupprimierte, beispielsweise HIV-positive Patienten erkranken dagegen vermehrt an schweren, systemischen Verläufen der Katzenkratzkrankheit. Zudem können diese Patienten lebensgefährliche Blutgefäßproliferationen in der Haut und in den inneren Organen entwickeln. Ob ein solcher vom Immunstatus abhängiger, unterschiedlicher Verlauf auch für die feline Bartonellose zutrifft, ist dagegen nicht bekannt. Auch liegen nur sehr wenige Daten vor, aus denen bei Katzen mögliche Einflüsse immunsuppressiver Koinfektionen auf eine natürlich erworbene *B. henselae* - Infektion abgeleitet werden können, da sich die Mehrzahl der vorhandenen Studien auf experimentelle Infektionen bei Laborkatzen stützt.

Die vorliegende Arbeit hatte daher zum Ziel, systematisch Prävalenz und Verlauf einer natürlich erworbenen *B. henselae* - Infektion bei Katzen mit immunsuppressiven Virusinfektionen zu untersuchen und zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurde eine Katzenpopulation untersucht, von der aus einer früheren Studie eine hohe *B. henselae* - Prävalenz bekannt war (Arvand et al. 2001) und in der auch mit dem gehäuften Auftreten immunsuppressiver Virusinfektionen gerechnet werden konnte. Dabei stützte sich die Untersuchung auf die drei wichtigsten Viren, die bei Katzen eine Immunsuppression bewirken können: FeLV, FIV und FPV.

Zunächst wurde die Hypothese 1 geprüft, Katzen mit FeLV-, FIV- oder FPV - Infektionen seien häufiger mit *B. henselae* infiziert, als Katzen ohne diese Virusinfektionen. Diese Hypothese konnte lediglich für FeLV unterstützt werden. Katzen mit einer FeLV-Infektion waren signifikant häufiger mit *B. henselae* infiziert, als Katzen ohne FeLV - Infektion ( $p = 0,00028$ ). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der beiden Studien anderer Arbeitsgruppen, die sich in der Vergangenheit mit einem möglichen Zusammenhang zwischen FeLV, FIV und *B. henselae* beschäftigt haben: Weder in der Studie von Glaus und Mitarbeitern (1997) noch in der Arbeit von Ueno und Kollegen (1996) waren FeLV - positive Katzen signifikant häufiger mit *B. henselae* infiziert, als die FeLV - negativen Kontrollen. Allerdings erfolgte die Untersuchung auf FeLV in den beiden genannten Studien mittels p27-Antigen-capture ELISA anhand von Blut, wodurch nur progressive Verlaufsformen einer FeLV - Infektionen erfasst wurden. Im Falle der vorliegenden Arbeit wurden jedoch durch den Nachweis von FeLV - Provirus im Knochenmark auch latente Infektionen erfasst.

Überraschenderweise zeigten drei der vier Katzen, die sowohl mit FeLV als auch mit *B. henselae* infiziert waren, eine *latente* FeLV - Infektion.

Dieses Ergebnis ist aus zwei Gründen bemerkenswert: Einerseits bedeutet es, dass die auf das Vorliegen einer tatsächlichen Immunsuppression gestützte ursprüngliche Arbeitshypothese 1 (siehe Kapitel 2.7) damit nicht unterstützt werden kann, da latente FeLV - Infektionen im Unterschied zu progressiven Infektionen in der Regel keine Immunsuppression verursachen. Zum anderen könnte dieses Ergebnis dazu beitragen, die bis heute ungeklärte klinische Bedeutung latenter FeLV - Infektionen zu erhellen. Obwohl es erste Hinweise auf einen Zusammenhang mit verschiedenen bakteriellen und parasitären Infektionskrankheiten gibt (Suntz 2007), wird in Bezug auf die klinische Bedeutung einer latenten FeLV - Infektion meist nur die Möglichkeit einer Reaktivierung und des damit verbundenen Infektionsrisikos anderer im Haushalt lebender Katzen angeführt (Pacitti 1987).

Wie erklärt sich also die beobachtete Korrelation zwischen FeLV - und *B. henselae* - Infektion, wenn nicht durch eine Immunsuppression? Gibt es Gemeinsamkeiten in der Pathogenese der beiden Infektionskrankheiten, die einen solchen Zusammenhang erklären könnten? Ja, solche Gemeinsamkeiten gibt es.

Zunächst der Übertragungsweg: *B. henselae* wird durch Flöhe von Katze zu Katze übertragen (Chomel et al. 1996). Auch für FeLV, das in der Regel durch den direkten Kontakt mit infizierten Körperflüssigkeiten oder Körperausscheidungen übertragen wird, ist eine Übertragung durch Flöhe inzwischen bewiesen (Vobis et al. 2003).

In der Pathogenese der beiden Infektionskrankheiten bestehen ebenfalls Parallelen. *B. henselae* infiziert pluripotente Stammzellen (CD34 - positive, hämatopoetische Vorläuferzellen) und gelangt infolge deren Differenzierung in die Erythrozyten des Wirts. Dabei übersteht der Erreger nicht nur die verschiedenen Differenzierungsschritte der Erythropoese, sondern vermehrt sich während dieser Zeit auch intrazellulär. Für humane hämatopoetische Vorläuferzellen wurde dieser Zusammenhang *in vitro* durch Mändle und Mitarbeiter (2005) gezeigt. Ausgereifte menschliche Erythrozyten können von *B. henselae* dagegen nicht infiziert werden. Mändle und Mitarbeiter führen diese Beobachtung auf die den ausgereiften Erythrozyten fehlende Expression von CD29 (Beta1-Integrin) zurück, einem Oberflächenprotein, welches von hämatopoetischen Vorläuferzellen in großer Menge exprimiert wird.

Für Katzen ist zwar bekannt, dass *B. henselae* direkt in die roten Blutkörperchen eindringen kann (Mehok et al. 1998), allerdings geschieht die Invasion sehr langsam und erscheint insgesamt nicht effizient genug, um die hohe Zahl intraerythrozytärer Bartonellen zu erklären, die bei bakteriämischen Katzen beobachtet werden (Rolain et al. 2001). Der Widerspruch zwischen ineffizienter Invasion einerseits und hoher Zahl intraerythrozytärer *B. henselae* andererseits könnte durch eine Infektion hämatopoetischer Vorläuferzellen der Katzen, analog zu den Erkenntnissen bei Menschen, erklärt werden. In der Diskussion um die Primäri-

sche einer *B. henselae* - Infektion wäre dies gleichzeitig einen Hinweis zugunsten der hämatopoetischen Stammzellen als möglicher Primärnische. Erste Anhaltspunkte, die diese Annahmen stützen, finden sich in der vorliegenden Studie durch den Nachweis von *B. henselae* - DNA im Knochenmark einer Katze (Nr. 5 in der Tabelle 4.2). Eine genauere Bestimmung von Art und Differenzierungsgrad der infizierten Zellen erfolgte aber nicht.

Nicht nur *B. henselae*, sondern auch FeLV kann Knochenmarksstammzellen infizieren. Feline Leukämieviren vom Stamm C (FeLV-C) hemmen dabei über eine FeLV-C-Zelloberflächenrezeptor (FLVCR) vermittelte Hämintoxizität gezielt Vorläuferzellen der Erythropoese und verursachen aplastische Anämien bei den betroffenen Katzen (Abkowitz et al. 1987; Quigley et al. 2004). Der FLVCR - Rezeptor ist ein Transporterprotein an der Zelloberfläche, welches Hämin aus dem Zytoplasma exportiert. Bei den erythroiden Vorläuferzellen im Stadium *colony-forming units-erythroid* (CFU-E) ist FLVCR besonders stark exprimiert. Wird er gehemmt, kommt es zu einer intrazellulären Häminanhäufung und die Zelle geht zugrunde. Aber auch FeLV-A, der häufigste Virustyp bei natürlichen FeLV - Infektionen, zeigt einen Tropismus zu hämatopoetischen Vorläuferzellen. In einer Studie von Dean und Mitarbeitern (1992), die FeLV-A mit einem Anämie-induzierenden FeLV-C verglichen, waren acht Tage nach einer experimentellen Infektion beide Virustypen in rund 58 % der erythroiden und rund 51 % der lymphoiden Vorläuferzellen im Knochenmark der untersuchten Katzen nachzuweisen. Die Autoren postulierten, dass FeLV-A und -C einen gleich starken Tropismus zu hämatopoetischen Vorläuferzellen aufweisen, der jedoch nur im Falle einer Infektion mit dem Virusstamm C zum Tode der erythropoetischen Zielzellen führe.

Sowohl für *B. henselae* als auch für FeLV liegen also starke Anhaltspunkte dafür vor, dass sie hämatopoetische Vorläuferzellen als Zielzellen nutzen. Obwohl ihre Invasion der Zielzellen, soweit bisher bekannt, über unterschiedliche Rezeptoren vermittelt wird, liegt die Vermutung nahe, dass die Infektion durch einen Erreger dem anderen den Weg bereitet. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete, signifikante Abhängigkeit zwischen *B. henselae*- und (latenten) FeLV - Infektionen könnte also auch dadurch zu erklären sein, dass die Integration der proviralen DNA von FeLV hämatopoetische Vorläuferzellen für eine Infektion mit *B. henselae* prädisponiert oder ihnen die Elimination des bakteriellen Erregers erschwert.

Art und Ausmaß dieser möglichen Interaktion von *B. henselae* und FeLV auf der Ebene ihrer mutmaßlichen gemeinsamen hämatopoetischen Zielzellen bleibt der Klärung in zukünftigen Studien vorbehalten. So könnte beispielsweise in einem nächsten Schritt untersucht werden, ob und inwieweit die Infektion der Zielzellen durch FeLV zu einer verstärkten Expression von Beta1-Integrinen an der Zelloberfläche führt, die wiederum von *B. henselae* als Rezeptoren genutzt werden.

Im Gegensatz zu FeLV bestand für FIV - Infektionen kein statistischer Zusammenhang mit einer *B. henselae* - Infektion ( $p = 1$ ). Dies entspricht dem Ergebnis der bereits zitierten Studien von Glaus bzw. Ueno und Mitarbeitern, in denen jeweils kein Zusammenhang zwischen den Prävalenzen von *B. henselae* - und FIV - Infektionen festgestellt werden konnte (Ueno et al. 1996; Glaus et al. 1997). Tatsächlich hat FIV mit *B. henselae* wenig gemeinsam. Eine Übertragung von FIV über Flöhe wurde noch nie bewiesen. Ähnlich wie HIV gehört FIV möglicherweise zu den Viren, bei denen keinerlei Übertragung über belebte Vektoren stattfindet (Day et al. 2008). Auch infiziert FIV keine hämatopoetischen Vorläuferzellen (Linenberger et al. 1991), ebensowenig wie HIV Knochenmarksstammzellen infiziert (Molina et al. 1990).

Auch eine Infektion mit FPV, dem dritten hier untersuchten Virus mit einer immunsuppressiven Wirkung bei Katzen, hatte keinen Einfluss auf die Prävalenz einer *B. henselae* - Infektion ( $p = 0,756$ ), obwohl die Gruppengröße der FPV - infizierten Katzen mit insgesamt 62 von 142 Tieren (43,7 %) die der anderen untersuchten Virusinfektionen deutlich überwog. In der Gruppe der FPV - infizierten Katzen waren jedoch nur vier mit *B. henselae* infiziert. Dies könnte auf das Alter der Tiere und den Verlauf der Parvovirose bei ihnen zurückzuführen sein. So hatten die überwiegend sehr jungen Katzen, auch aufgrund des in dieser Altersgruppe typischen akuten bis perakuten Verlaufs einer Parvovirose, womöglich noch keine Gelegenheit, sich mit *B. henselae* zu infizieren.

Insgesamt blieb die in der vorliegenden Studie ermittelte Prävalenz einer *B. henselae* - Infektion mit 7,7 % erheblich hinter der erwarteten, von Arvand und Mitarbeitern (2001) ermittelten Prävalenz von 18,7 % zurück, obwohl hier ebenfalls Katzen aus dem Tierheim Berlin untersucht wurden. Betrachtet man allerdings die 95%-Konfidenzintervalle der ermittelten Prävalenzen, ergeben sich Überschneidungen zwischen den beiden Studien (Abb. 4.1). Geht man nun davon aus, dass sich die wahre Prävalenz mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% im Rahmen dieser Konfidenzintervalle befindet, so sind die Ergebnisse der vorliegenden Studie nicht so weit von denen der Studie aus 2001 entfernt, wie der reine Vergleich der Mittelwerte vermuten lässt. Die beobachteten Unterschiede mögen zum einen auf eine vermehrte Floh-bekämpfung oder -prophylaxe bei den in der vorliegenden Studie beprobten Katzen zurückzuführen sein, durch die naturgemäß auch die Übertragung einer *B. henselae* - Infektion innerhalb der Population eingeschränkt bzw. verhindert wird. Zum anderen wurden in den beiden Arbeiten unterschiedlich gewählte Stichproben der Katzenpopulation im Tierheim untersucht: Während Arvand und Mitarbeiter lebende Katzen unmittelbar nach deren Aufnahme im Tierheim beprobten, stellten verendete oder euthanasierte Katzen, die bereits unterschiedlich lange im Tierheim gelebt hatten, das Untersuchungsmaterial der vorliegenden Arbeit dar. So ist durchaus denkbar, dass einige der hier untersuchten Katzen ihre

*B. henselae* - Infektion bereits überwunden hatten. Zudem konnte den Katzen postmortal nur eine einzelne Blutprobe entnommen werden, sodass womöglich diejenigen Katzen falsch-negativ diagnostiziert wurden, die sich zum Zeitpunkt des Todes in einer abakteriämischen Phase einer *B. henselae* - Infektion befanden. In diesem Fall hätte die Diagnose ihrer Infektion nur durch zwei oder mehr aufeinander folgende Blutuntersuchungen erfolgen können. Ein durch saisonale Einflüsse relativ zu niedriges Ergebnis kann dagegen weitgehend ausgeschlossen werden, da die Probennahme einen Zeitraum von 26 Monaten umfasste (Oktober 2006 bis November 2008). Während dieser Zeit wurden die Proben kontinuierlich von allen Katzen entnommen, die aus dem Tierheim zur Sektion überwiesen wurden. Ebenso kann ein falsch-niedriges Ergebnis durch methodische Einflüsse, insbesondere durch unsachgemäße Lagerung der beprobten Tierkörper im Vorfeld der Probennahme, weitgehend ausgeschlossen werden. In einem Vorversuch zum Einfluss von Autolyse anhand von geronnenem Katzensvollblut war selbst unter Lagerungsbedingungen mit extremen Temperaturschwankungen sowie bei einer Lagerung bei Raumtemperatur für bis zu zehn Tage die Nachweisbarkeit der zugesetzten *B. henselae* - DNA mittels nested PCR nicht sichtlich beeinträchtigt. Einschränkend sei jedoch angemerkt, dass dem im Vorversuch untersuchten Vollblut mit  $9 \times 10^5$  KBE eine recht hohe Zahl hydrolysiertes *B. henselae* zugesetzt wurde. Dadurch ergab sich in eine Erreger-Konzentration von  $1,1 \times 10^5$  KBE/ml Vollblut. Bei Katzen, die experimentell mit *B. henselae* infiziert wurden, sind zwar Werte von  $8 \times 10^5$  KBE/ml Blut (Roy et al. 2001) bis hin zu mehr als  $10^6$  KBE/ml Blut beschrieben (O'Reilly et al. 1999), doch insbesondere bei natürlich infizierten Katzen kommen auch wesentlich niedrigere Erregerkonzentrationen vor. So lag in einer Studie die in der Blutkultur ermittelte *B. henselae* - Konzentration bei natürlich infizierten Katzen zwischen 1 und 18 000 KBE/ml (Fabbi et al. 2004). Insbesondere wenn sich die Ausgangslast an *B. henselae* am Rande der Nachweisgrenze bewegt, lässt sich daher ein nachteiliger Einfluss von Autolyse auf den Nachweis von *B. henselae* - DNA nicht mit letzter Sicherheit ausschließen.

Wären in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung zur Ermittlung der Prävalenz zugrunde gelegt worden, so hätte sich lediglich eine Prävalenz von 2,1 % statt der durch PCR ermittelten 7,7 % ergeben. Die deutlich geringere Nachweisempfindlichkeit der immunhistochemischen Untersuchung auf *B. henselae* im Vergleich zur PCR war jedoch zu erwarten und wurde in jüngster Zeit ebenfalls durch eine andere Arbeitsgruppe bestätigt (Caponetti et al. 2009).

Die Prävalenzen von FeLV und FIV entsprachen weitgehend den für Deutschland aus der Literatur bekannten Werten. In der vorliegenden Studie betrug die Prävalenz latenter FeLV - Infektionen 2,8 % (vier von 142 Tieren). Von Pedersen und Mitarbeitern (1984) wird sie mit

2 % angegeben. Eine neuere Untersuchung, deren Daten, wie auch in der vorliegenden Studie, an seziierten Katzen erhoben wurden, geht allerdings von bis zu 50 % latenten FeLV - Infektionen aus (Suntz 2007). In der zitierten Arbeit waren Katzen aus Tierheimen signifikant häufiger betroffen als Katzen aus privaten Haushalten. Der enorme Unterschied zu der in der vorliegenden Arbeit ermittelten und der von Suntz angegebenen Prävalenz könnte zumindest zum Teil in dem Alter der untersuchten Katzen begründet sein. In der Studie von Suntz war das mediane Alter der Katzen mit 24 Monaten deutlich höher als in der vorliegenden Arbeit (12 Monate), wodurch die Tiere mehr Gelegenheit hatten, sich mit FeLV zu infizieren. Progressiv FeLV - infiziert waren bei Suntz 8,6 % der untersuchten Katzen, bei Pedersen (1984) 3,6 % und in der vorliegenden Arbeit 1,4 %.

Für FIV - Infektionen ermittelte die molekularbiologische Untersuchung der Blutproben von 122 Katzen eine Prävalenz von 3,3 % (vier von 122 Tieren). In der Literatur sind Werte von 2,3 % (Hartmann und Hinze 1991) bis 8,4 % (Fuchs et al. 1994) angegeben. Stärker noch als für FeLV ist eine negative Beeinflussung der FIV - Prävalenz in der vorliegenden Studie durch das meist geringe Alter der Katzen denkbar. Grundsätzlich ist das Risiko einer FIV - Infektion am höchsten für unkastrierte Kater mit Freigang in einem Alter von mehr als vier Jahren (Courchamp et al. 1998). Da im vorliegenden Fall die Hälfte der Katzen ein Jahr alt oder jünger waren und überdies in den beteiligten Tierheimen männliche wie weibliche Katzen zeitnah nach ihrer Aufnahme kastriert werden, ist die hier ermittelte FIV - Prävalenz keinesfalls als repräsentativ anzusehen.

Die exakte Prävalenz von FPV - Infektionen in Deutschland lässt sich anhand der Literatur kaum ermitteln. Lediglich über den Anteil der Katzen mit Parvovirose, die auf Infektion mit den caninen Varianten 2a und 2b zurückgeht (Truyen et al. 1996b) existieren Studien. In der vorliegenden Arbeit wiesen 62 von 142 (43,7 %) der untersuchten Katzen eine Parvovirose auf. Eine Aufschlüsselung, ob diese im einzelnen auf eine Infektion mit FPV oder mit CPV 2a/2b zurückzuführen war, erfolgte hier jedoch nicht, da nicht der Erreger, sondern das Krankheitsbild der Parvovirose als maßgeblich für die Fragestellung der vorliegenden Studie angesehen wurde.

Zusammenfassend lässt sich also zunächst festhalten, dass die Hypothese 1, Katzen mit FeLV-, FIV- oder FPV - Infektion seien gleichzeitig häufiger mit *B. henselae* infiziert, nicht grundsätzlich unterstützt werden kann. Vielmehr scheint dieser Sachverhalt lediglich auf FeLV - Infektionen zuzutreffen, unabhängig davon, ob sie latent oder progressiv verlaufen. Dieses Ergebnis mag zu einem besseren Verständnis der klinischen Bedeutung latenter FeLV - Infektionen bei Katzen beitragen, die bisher noch weitgehend unklar ist.

Es fanden sich keine Anhaltspunkte, die die Hypothese 2, eine *B. henselae* - Infektion verlaufe anders bei Katzen mit gleichzeitiger FeLV-, FIV- oder FPV - Infektion, unterstützten.

Tatsächlich gab es keine nennenswerten Unterschiede zwischen den pathologischen Befunden der FeLV-, FIV- oder FPV - infizierten Katzen, ob mit oder ohne *B. henselae* - Infektion. In Anlehnung an die Studien durch Glaus und Mitarbeiter (1997) sowie Kordick und Mitarbeiter (1999), die bei Katzen mit einer *B. henselae* - Infektion vermehrt Harnwegserkrankungen bzw. interstitielle Nephritis beobachteten, wurde das Vorliegen einer interstitiellen Nephritis als Indikatorerkrankung zur Unterstützung der zweiten Hypothese definiert. Weder für die gesamte Stichprobe noch für die Gruppen der FeLV- und FPV - infizierten Katzen ergab sich anhand des Chi Quadrat- bzw. Fisher's exaktem Test ein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen einer *B. henselae* - Infektion und interstitieller Nephritis. Die Gruppe FIV - positiver Katzen wies keine *B. henselae* - infizierten Tiere auf, daher wurde die Unabhängigkeit von *B. henselae* - Infektion und interstitieller Nephritis für diese Gruppe angenommen.

Die zweite Hypothese wurde zusätzlich anhand einer retrospektiven Untersuchung von 26 Katzen mit Peliosis hepatis überprüft, da aus der Humanmedizin ein kausaler Zusammenhang zwischen dieser Erkrankung und einer Infektion mit *B. henselae* bei immunsupprimierten Patienten bekannt ist. Hier konnte jedoch, unabhängig vom Immunstatus der untersuchten Katzen, nicht einmal ein möglicher Zusammenhang mit einer *B. henselae* - Infektion aufgezeigt werden. Tatsächlich wurde in keiner der Lebergewebeproben der 26 Katzen *B. henselae* - DNA oder - Antigen mittels PCR bzw. immunhistochemischer Untersuchung nachgewiesen.

Eine denkbare Ursache für dieses überraschende Ergebnis ist eine mögliche Zersetzung der bakteriellen DNA infolge Formalinfixierung und Paraffineinbettung bzw. infolge der teilweise jahrzehntelangen Lagerung der Gewebeproben. Dagegen spricht allerdings die in allen Proben erfolgreiche Amplifikation eines EF1-alpha Fragments, welches ähnlich groß war wie das Zielfragment der *B. henselae* - PCR. Auch eine Hemmung der PCR durch die mit 900 ng sehr hohe Menge an Template - DNA pro PCR-Ansatz wurde ausgeschlossen, da die Amplifikation in den mit 50 ng *B. henselae* - DNA versehenen Kontrollaliquots jedes Probenansatzes einwandfrei funktionierte. Ein falsch-negatives Ergebnis der immunhisto-chemischen Untersuchung aufgrund methodischer Fehler kann ebenfalls weitgehend ausgeschlossen werden: In allen mitgeführten Positivkontrollen, also den in Paraffin eingebetteten, *B. henselae* - infizierten Verozellen in Agar sowie den Lymphknotenpräparaten von Patienten mit Katzenkratzkrankheit, wurde das BadA-Antigen immunhistochemisch nachgewiesen. Eine weitere mögliche und dabei wahrscheinlichere Ursache für das negative Ergebnis aller 26 Proben in Bezug auf *B. henselae* ist das hohe Alter der untersuchten Katzen (Median: 15 Jahre). Da jede Reinfektion mit *B. henselae* die serologische Immunantwort verstärkt und die Dauer einer Bakteriämie verringert oder sie sogar verhindert, sinkt die Wahrscheinlichkeit einer *B. henselae* - Bakteriämie mit zunehmendem Alter der Katzen (Greene et al. 1996).



Zudem handelte es sich bei den Katzen mit Peliosis hepatis überwiegend um Tiere aus privaten Haushalten. Obwohl im Einzelnen aufgrund des retrospektiven Aufbaus dieses Untersuchungsabschnitts keine Daten zu früheren oder aktuellen Flohbefällen oder Tierheimaufenthalten erhoben werden konnten, ist die Wahrscheinlichkeit einer *B. henselae* - Bakteriämie im Allgemeinen bei privat gehaltenen Katzen geringer als bei Katzen aus Tierheimen (Arvand et al. 2001).

Weder im Hinblick auf interstitielle Nephritis noch auf Peliosis hepatis ergaben sich also Befunde, welche die zweite Hypothese, eine *B. henselae* - Infektion verlaufe unterschiedlich bei Katzen mit immunsuppressiven Erkrankungen bzw. einer FeLV-, FIV- oder FPV - Infektion, unterstützen konnten.

## 6 Zusammenfassung

### Einfluss immunsuppressiver Virusinfektionen auf eine natürlich erworbene Infektion mit *Bartonella henselae* bei Katzen

Alexandra U. Buchmann

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die mögliche Beeinflussung der Prävalenz und des Verlaufs von *Bartonella (B.) henselae* - Infektionen bei natürlich infizierten Katzen durch immunsuppressive Virusinfektionen zu untersuchen. Dazu wurden in einer prospektiven Studie zwischen Oktober 2006 und November 2008 Gewebeproben von 142 verendeten oder euthanasierten Katzen aus zwei deutschen Tierheimen entnommen und mittels PCR und Immunhistochemie auf Infektionen mit *B. henselae* getestet. Alle Katzen wurden zusätzlich einer vollständigen pathologisch-anatomischen und -histologischen Untersuchung unterzogen. Darüber hinaus wurde der Infektionsstatus der Tiere in Bezug auf die drei wichtigsten Viren bestimmt, die bei Katzen immunsuppressive Krankheitsbilder hervorrufen: das Feline Leukämievirus (FeLV), das Feline Immundefizienzvirus (FIV) sowie das Feline Parvovirus (FPV).

*B. henselae* wurde mittels nested Polymerasekettenreaktion (PCR) in Blut und/oder Knochenmark, peripheren Lymphknoten, Tonsillen und Milz von elf Katzen nachgewiesen. Daraus ergab sich eine *B. henselae* - Prävalenz von 7,7 % in der untersuchten Stichprobe. Als Zielgene für die Untersuchung mittels PCR dienten das Gen für die Serinprotease htrA (GenBank Nr. L20127) sowie das Gen der Citratsynthase gltA von *B. henselae* (GenBank Nr. L38987). Die immunhistochemische Untersuchung desselben Probenspektrums auf *Bartonella* Adhesin A (BadA) erbrachte dagegen lediglich eine *B. henselae* - Prävalenz von 2,1% (3 von 142 Katzen). Für FeLV erfolgte zum einen der Nachweis von proviraler DNA mittels semi-nested PCR im Knochenmark, zum anderen der Nachweis von viralem Oberflächenantigen (gp70) in Knochenmark, Milz und mandibularen Lymphknoten. Die immunhistochemische Untersuchung auf gp70-Antigen war notwendig, um zwischen latenten und progressiven FeLV - Infektionen differenzieren zu können. FeLV - Provirus wurde bei sechs Katzen nachgewiesen (Prävalenz: 4,2 %). Vier dieser sechs Katzen waren gleichzeitig mit *B. henselae* infiziert, darunter drei, die lediglich eine latente FeLV - Infektion zeigten (Provirus positiv / gp-70 negativ). Statistisch ergab sich mittels zweiseitigem, exaktem Test nach Fisher ein signifikanter Zusammenhang zwischen FeLV - und *B. henselae* - Infektionen ( $p = 0,00028$ ). Dieser Zusammenhang ist möglicherweise auf Wechselwirkungen der beiden Erreger an deren gemeinsamen Zielzellen, den hämatopoetischen Stammzellen, zurückzuführen. Auch der beiden Erregern gemeinsame Übertragungsweg über Flöhe könnte hier eine Rolle spielen. Bislang hatten Studien anderer Arbeitsgruppen keinen Zusammenhang

zwischen Infektionen mit FeLV und mit *B. henselae* aufzeigen können.

Eine Infektion mit FIV wurde mittels semi-nested PCR anhand von peripherem Blut bei vier von 122 Katzen (3,2 %) ermittelt. Keine dieser Katzen war jedoch gleichzeitig mit *B. henselae* infiziert. Von 20 Katzen lag keine verwertbare Blutprobe vor, sodass diese Tiere nicht auf eine FIV - Infektion untersucht werden konnten. Bei 62 von 142 Katzen (43,7 %) wurde histologisch und mittels PCR eine Parvovirusinfektion nachgewiesen. Als Untersuchungsmaterial für die PCR dienten hier Knochenmark und periphere Lymphknoten. Im zweiseitigen, exakten Test nach Fisher ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen einer Infektion mit *B. henselae* und FIV ( $p = 1,0$ ) oder FPV ( $p = 0,756$ ), ebenso wenig wie mit Alter ( $p = 0,392$ ) oder Geschlecht ( $p = 0,126$ ).

Neben der möglichen Beeinflussung der Prävalenz von *B. henselae* -Infektionen durch FeLV, FIV oder FPV wurde untersucht, ob sich der Verlauf einer *B. henselae* - Infektion durch Koinfektion mit den genannten Viren verändert. Die vollständige pathologisch-anatomische und -histologische Untersuchung aller Katzen lieferte jedoch keine Hinweis auf einen solchen Zusammenhang. Darüber hinaus wurden Peliosis hepatis und lymphoplasmazelluläre, interstitielle Nephritis als Indikatorerkrankungen für einen solchen Zusammenhang definiert und untersucht. Insgesamt 36 (25,4%) der 142 untersuchten Katzen zeigten eine lymphoplasmazelluläre, interstitielle Nephritis, wobei lediglich fünf dieser Katzen mit *B. henselae* infiziert waren. Bezogen auf die gesamte Stichprobe ergab sich damit mittels zweiseitigem, exaktem Test nach Fisher kein signifikanter Zusammenhang zwischen interstitieller Nephritis und einer Infektion mit *B. henselae* ( $p = 0,111$ ). Auch für die Gruppe der FeLV - infizierten Katzen zeigte sich im Chi-Quadrat-Test kein signifikanter Zusammenhang mit einer *B. henselae* - Infektion ( $p = 0,540$ ), ebenso wenig wie für die Gruppe der FPV - infizierten Katzen ( $p = 0,561$ ). Da in der Gruppe der FIV - infizierten Katzen keine Tiere gleichzeitig mit *B. henselae* infiziert waren, war hier die Unabhängigkeit der Merkmale „*B. henselae* - Infektion“ und „interstitielle Nephritis“ bereits gegeben. Auch die zweite untersuchte Indikatorerkrankung, Peliosis hepatis, erbrachte keinen Hinweis auf den unterschiedlichen Verlauf einer *B. henselae* - Infektion infolge immunsuppressiver Virusinfektionen. Tatsächlich wurde bei keiner der 26 Katzen mit Peliosis hepatis in diesem retrospektiven Teil der Untersuchung *B. henselae* - DNA oder -Antigen im Lebergewebe nachgewiesen. Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, als *B. henselae* bei Mensch und Hund als Erreger der Peliosis hepatis gilt. Ursächlich für das hier ermittelte negative Ergebnis könnte das hohe Alter der Katzen mit Peliosis hepatis sein. Denkbar, wenn auch weniger wahrscheinlich, sind zudem negative Einflüsse der Formalinfixierung und der Lagerung auf das verwendete Probenmaterial.

Zusammenfassend bleibt hervorzuheben, dass in der vorliegenden Studie die Prävalenz von *B. henselae* - Infektionen bei Katzen erhöht war, die gleichzeitig mit FeLV infiziert waren, jedoch unabhängig davon, ob es sich dabei um latente oder progressive Verlaufsformen ei-

## 6 Zusammenfassung

---

ner FeLV - Infektion handelte. Dieses Ergebnis mag zu einem besseren Verständnis der klinischen Bedeutung latenter FeLV - Infektionen bei Katzen beitragen, die bisher noch weitgehend unklar ist. Infektionen mit FIV und FPV hatten keinen Einfluss auf die Prävalenz von *B. henselae* - Infektionen. Hinweise auf eine Beeinflussung des Verlaufs einer *B. henselae* - Infektion durch FeLV, FIV oder FPV ergaben sich dagegen nicht.

## 7 Summary

### Influence of immunosuppressive viral infections on natural *Bartonella henselae* infection in cats

Alexandra U. Buchmann

From October 2006 to November 2008, 142 cats from animal shelters were necropsied and tested for *Bartonella (B.) henselae*, *Feline leukemia virus (FeLV)*, *Feline immunodeficiency virus (FIV)* and *Feline panleukopenia virus (FPV)*. 11 cats (7.7%) tested positive for *B. henselae* by nested PCR from blood and/or bone marrow, peripheral lymph nodes, tonsils, liver or spleen. Of these, three also tested positive for *B. henselae* by immunohistochemistry. FeLV provirus was detected by semi-nested PCR in bone marrow from six cats (4.2%), four of which also had *B. henselae* infection. Of these coinfecting cats, three had latent FeLV infection, defined as lack of immunohistochemically detectable gp70 antigen - expression with concurrent proviral DNA in the bone marrow. FIV was detected in four cats (2.8%) by semi-nested PCR from blood but none of these were positive for *B. henselae*. FPV infection was determined in 62 cats (43.7%) histologically and by PCR from bone marrow and lymph nodes. Three of these also tested positive for *B. henselae*. Fisher's exact test revealed a significant association only between *B. henselae* and FeLV infection ( $p = 0.00028$ ) but not with FIV ( $p = 1.0$ ) or FPV infection ( $p = 0.756$ ), age ( $p = 0.392$ ) or sex ( $p = 0.126$ ). We conclude that latent FeLV infection may predispose cats for *B. henselae* infection. Histopathology and immunohistochemistry for *B. henselae* failed to identify lesions that could be specifically attributed to *B. henselae* infection. Peliosis hepatis and lymphoplasmacytic, interstitial nephritis had previously been suggested as indicators for a possible different course of *B. henselae* infection due to coinfection with FeLV, FIV or FPV, but there was no significant association between interstitial nephritis and *B. henselae* infection either in the whole group ( $p = 0,111$ ) or in the groups infected with FeLV ( $p = 0,540$ ), FIV ( $p = 1$ ) or FPV ( $p = 0,561$ ). *B. henselae* DNA or antigen was not detected in either of the liver specimens from 26 cats with hepatic peliosis, suggesting that unlike in dogs and humans, peliosis hepatis in cats may not be associated with *B. henselae* infection.

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Bekannteste Vertreter der Gattung *Bartonella* mit ihren jeweiligen Reservoir- und Endwirten, Vektoren und den Erkrankungen, die sie verursachen. (S. 3)

Tabelle 2.2 Unterscheidung der vier Verlaufsformen einer FeLV Infektion anhand des Nachweises von FeLV - Provirus und -antigen mittels PCR bzw. Antigen-capture ELISA. Nach Torres et al. 2005. (S.16)

Tabelle 3.1 Ablauf der Entwässerung und Paraffineinbettung von Gewebeproben für die histologische und immunhistochemische Untersuchung im Tissue-Tek® VIP. (S. 23)

Tabelle 3.2 Primersequenzen und -positionen zum Nachweis des htrA-Gens von *B. henselae* (GenBank Nr. L20127). (S. 26)

Tabelle 3.3 Primersequenzen und -positionen zum Nachweis des gltA-Gens von *B. henselae* (GenBank Nr. L38987). (S. 26)

Tabelle 3.4 Zusammensetzung der Reaktionsmischung pro PCR-Ansatz für ersten und zweiten Amplifikationsschritt der nested PCR zum Nachweis des htrA-Gens von *B. henselae*. (S. 27)

Tabelle 3.5 Reaktionsablauf im Thermocycler mit Reaktionstemperaturen, -zeiten sowie Anzahl der Zyklen in der nested PCR für das htrA-Gen von *B. henselae*. (S. 28)

Tabelle 3.6 Vergleich der Nachweisgrenzen einer einfachen PCR mit einer nested PCR für die Gene htrA und gltA von *B. henselae* anhand einer geometrischen Verdünnungsreihe hitze-deaktivierter *B. henselae*. (S. 29)

Tabelle 3.7 Vorversuch zum Einfluss von Autolyse auf die Nachweisbarkeit von *B. henselae* -DNA mittels PCR. Hier: Lagerung von 21 Aliquots Katzenblut nach Zugabe von hydrolysierten *B. henselae* von 1 h bis 10 d bei -20 °C bis +20 °C. Anschließend erfolgte jeweils die Präparation der DNA und Untersuchung der Proben mittels nested PCR für das htrA-Gen wie beschrieben. In Klammern: Nummern der Aliquots (S. 31)

Tabelle 3.8. Vorversuch zum Einfluss von Autolyse auf die Nachweisbarkeit von *B. henselae*-DNA mittels PCR. Hier: Lagerung von 6 Aliquots Katzenvollblut nach Zugabe von hydrolysierten *B. henselae* für bis zu 13 Tage im Wechsel zwischen -20 °C und +20 °C. Anschließend erfolgte die Präparation der DNA und Untersuchung der Proben mittels nested PCR. (S. 32)

## 8 Tabellenverzeichnis

---

Tabelle 3.9 Übersicht der absteigenden Alkoholreihe zur Entparaffinisierung und Wässerung bzw. der aufsteigenden Alkoholreihe zur Entwässerung der Gewebeschnitte im Rahmen der immunhistologischen Untersuchung. Pro Stufe wurden die Gewebsschnitte 3 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. (S. 34)

Tabelle 3.10 Primersequenzen, Annealingtemperaturen, Amplikonposition und -länge der PCR - Untersuchungen auf FeLV (GenBank L25632), FIV (GenBank NC.001482) und FPV (GenBank GQ169552). (S. 35)

Tabelle 3.11 Primersequenzen und -positionen für den PCR-Nachweis des pap31-Gens von *B. henselae* (GenBank Nr. AF001274). (S. 39)

Tabelle 3.12 Sequenzen und Basenpositionen der Primer für den PCR-Nachweis von feline EF1-alpha (GenBank Nr. AY712790). (S. 40)

Tabelle 4.1 Untersuchung der Unabhängigkeit von interstitieller Nephritis und *B. henselae* - Infektion bei FeLV- und FPV - infizierten Katzen sowie in der gesamten Stichprobe; a) Exakter Test nach Fisher, b) Chi Quadrat - Test. (S. 45)

Tabelle 4.2 Signalement, Sektionsbefunde und Ergebnisse der Untersuchungen auf FeLV-, FIV- und FPV-Infektion der elf in der PCR positiv auf *B. henselae* getesteten Katzen.

IHC = immunhistochemische Untersuchung, LK = Lymphknoten, FeLV = Felines Leukämievirus, FIV = Felines Immundefizienzvirus, FPV = Felines Parvovirus, gp70 = Oberflächenantigen von FeLV zum Nachweis einer produktiven FeLV - Infektion (S. 48 f).

## 9     **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 3.1 Vergleich der Nachweisgrenzen der einfachen PCR vs. nested PCR für das htrA-Gen von *B. henselae*. Hier: Elektrophorese der Amplifikate aus einfacher PCR bzw. nested PCR einer geometrischen Verdünnungsreihe hitzedeaktivierter, nicht-hydrolysierter *B. henselae*. PC = Positivkontrolle, NTC = Negativkontrolle. (S. 29)

Abb. 4.1 Darstellung der 95%-Konfidenzintervalle der ermittelten und in der Literatur beschriebenen Prävalenzen für *B. henselae* - Infektionen in der hier untersuchten Katzenpopulation. (S. 42)

Abb. 4.2 Darstellung der PCR-Ergebnisse der Untersuchung von 26 Lebern mit Peliosis hepatis auf *B. henselae* - DNA und felines EF-1 $\alpha$  nach Gelelektrophorese der Amplifikate. PC 1 / 2 = Positivkontrollen des ersten bzw. zweiten Amplifikationsschritts, NC 1 / 2 = Negativkontrollen. (S. 46)



## 10 Literaturverzeichnis

- Abbott, R. C., B. B. Chomel, R. W. Kasten, K. Floyd-Hawkins, Y. Kikuchi, J. E. Koehler and N. C. Pedersen (1997). Experimental and natural infection with *Bartonella henselae* in domestic cats. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 20(1): 41-51
- Abkowitz, J. L., R. D. Holly and C. K. Grant (1987). Retrovirus-induced feline pure red cell aplasia. Hematopoietic progenitors are infected with feline leukemia virus and erythroid burst-forming cells are uniquely sensitive to heterologous complement. *J. Clin. Invest.* 80(4): 1056-1063
- Anderson, B. E., K. Sims, R. L. Regnery, L. Robinson, M. J. Schmidt, S. Goral, C. Hager and K. Edwards (1994). Detection of *Rochalimea henselae* DNA in specimens from cat scratch disease patients by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32(4): 942-948
- Arvand, M., A. J. Klose, D. Schwartz-Porsche, H. Hahn and C. Wendt (2001). Genetic variability and prevalence of *Bartonella henselae* in cats in Berlin, Germany, and analysis of its genetic relatedness to a strain from Berlin that is pathogenic for humans. *J. Clin. Microbiol.* 39(2): 743 - 746
- Arvand, M. and S. G. Schäd (2006). Isolation of *Bartonella henselae* DNA from the peripheral blood of a patient with cat scratch disease up to 4 months after the cat scratch injury. *J. Clin. Microbiol.* 44(6): 2288-2290
- Bass, J. W., B. C. Freitas, A. D. Freitas, C. L. Sisler, D. Chan, J. M. Vincent, D. A. Person, J. R. Claybaugh, R. R. Wittler, M. E. Weisse, R. L. Regnery and L. N. Slater (1998). Prospective randomized double blind placebo-controlled evaluation of azithromycin for treatment of cat-scratch disease. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 17(6): 447-452
- Bereswill, S., S. Hinkelmann, M. Kist and A. Sander (1999). Molecular analysis of riboflavin synthesis genes in *Bartonella henselae* and use of the *ribC* gene for differentiation of *Bartonella* species by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37(10): 3159-3166
- Bergmans, A. M. C., E. G. J. Hulskotte, C. M. A. de Jong, G. van Amerongen, A. D. M. E. Osterhause and L. M. Shouls (1996). Experimental infection of cats and macaques with *Bartonella henselae*: Kinetics of bacteremia and efficacy of antibiotic treatment in cats. Inaugural dissertation. Universität Utrecht
- Birtles, R. J., T. G. Harrison, N. A. Saunders and D. H. Molyneux (1995). Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45(1): 1-8

- Boulouis, H.-J., C.-c. Chang, J. B. Henn, R. W. Kasten and B. B. Chomel (2005). Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Vet. Res.* 36: 383-410
- Brenner, D. J., S. P. O'Connor, H. H. Winkler and A. G. Steigerwald (1993). Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb. nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb. nov., and to remove the family Bartonellaceae from the order Rickettsiales. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43(4): 777-786
- Brenner, S. A., J. A. Rooney, P. Manzewitsch and R. L. Regnery (1997). Isolation of *Bartonella (Rochalimea) henselae*: Effects of methods of blood collection and handling. *J. Clin. Microbiol.* 35(3): 544-547
- Brown, P. J., J. P. Henderson, P. Galloway, H. O'Dair and J. M. Wyatt (1994). Peliosis hepatis and telangiectasis in 18 cats. *J. Small Anim. Pract.* 35(2): 73-77
- Bruneval, P., J. Choucair, F. Paraf, J. P. Casalta, D. Raoult, F. Scherchen and J. L. Mainardi (2001). Detection of fastidious bacteria in cardiac valves in cases of blood culture negative endocarditis. *J. Clin. Pathol.* 54(3): 238-240
- Caponetti, G. C., L. Pantanowitz, S. Marconi, J. M. Havens, L. W. Lamps and C. N. Otis (2009). Evaluation of immunohistochemistry in identifying *Bartonella henselae* in cat-scratch disease. *Am. J. Clin. Pathol.* 131(2): 250-256
- Cheuk, W., A. K. C. Chan, M. C. K. Wong and J. K. C. Chan (2006). Confirmation of Diagnosis of Cat Scratch Disease by Immunohistochemistry. *Am. J. Surg. Pathol.* 30(2): 274-275
- Chomel, B. B., R. W. Kasten, K. Floyd-Hawkins, B. Chi, K. Yamamoto, J. Roberts-Wilson, A. N. Gurfield, R. C. Abbott, N. C. Pedersen and J. E. Koehler (1996). Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J. Clin. Microbiol.* 34(8): 1952-1956
- Courchamp, F., N. G. Yoccoz, M. Artois and D. Pontier (1998). At-risk individuals in Feline immunodeficiency virus epidemiology: evidence from a multivariate approach in a natural population of domestic cats (*Felis catus*). *Epidemiol. Infect.* 121(1): 227-236
- Dabo, S. M., A. W. Confer, B. E. Anderson and S. Gupta (2006). *Bartonella henselae* pap31, an extracellular matrix adhesin, binds the fibronectin repeat III13 module. *Infect. Immun.* 74(5): 2513-2521
- Dauga, C., I. Miras and P. A. D. Grimont (1996). Identification of *Bartonella henselae* and *B. quintana* 16S rDNA sequences by branch- genus- and species-specific amplification. *J. Med. Microbiol.* 45(3): 192-199
- Day, T., N. Mideo and S. Alizon (2008). Why is HIV not vector-borne? *Evolutionary Applications* 1(1): 17-27

- Dean, G. A., P. M. Groshek, J. I. Mullins and E. A. Hoover (1992). Hematopoietic target cells of anemogenic subgroup C versus nonanemogenic subgroup A Feline leukemia virus. *Journal of Virology* 66(9): 5561-5568
- Debré, R., M. Lamy, M.-L. Jammet, L. Costil and P. Mozziconacci (1950). La maladie des griffes de chat. *Bull. Mem. Soc. Med. Hop. Paris* 66: 76-79
- Degott, C., B. Rueff, H. Kreis, A. Duboust, F. Potet and J. P. Benhamou (1978). Peliosis hepatis in recipients of renal transplants. *Gut* 19(8): 748-753
- Dolan, M. J., M. T. Wong, R. L. Regnery, J. H. Jorgensen, M. Garcia, J. Peters and D. Drehner (1993). Syndrome of *Rochalimea henselae* adenitis suggesting cat scratch disease. *Ann. Intern. Med.* 118(5): 331-336
- Duncan, A. W., H. S. Marr, A. J. Birkenheuer, R. G. Maggi, L. E. Williams, M. T. Correa and E. B. Breitschwerdt (2008). *Bartonella* DNA in blood and lymph nodes of Golden Retrievers with lymphoma and in healthy controls. *J. Vet. Intern. Med.*(22): 89-95
- English, R. V., C. M. Johnson, D. H. Gebhard and M. B. Tompkins (1993). In vivo lymphocyte tropism of Feline immunodeficiency virus. *J. Virol.* 67(9): 5175-5186
- Fabbi, M., L. De Giuli, M. Tranquillo, R. Bragoni, M. Casiraghi and C. Genchi (2004). Prevalence of *Bartonella henselae* in Italian stray cats: Evaluation of serology to assess the risk of transmission of *Bartonella* to humans. *J. Clin. Microbiol.* 41(1): 264-268
- Foucault, C., P. Brouqui and D. Raoult (2006). *Bartonella quintana* characteristics and clinical management. *EID Journal* 12(2): 217-223
- Francis, D. P., M. Essex and W. D. Hardy, Jr. (1977). Excretion of Feline leukaemia virus by naturally infected pet cats. *Nature* 269(5625): 252-254
- Fuchs, A., L. Binzel and M. Lonsdorfer (1994). Epidemiology of FeLV and FIV infection in the Federal Republic of Germany. *Tierarztl. Prax.* 22(3): 273-277
- Garcia-Caceres, U. and F. U. Garcia (1991). Bartonellosis. An immunodepressive disease and the life of Daniel Alcides Carrión. *Am. J. Clin. Pathol.* 95(4 Suppl 1): 558-566
- Gazineo, J. L. D., B. M. Trope, J. P. Maceira, S. B. May, J. M. C. d. O. Coelho, J. S. Lambert and S. A. Nogueira (2001). Bacillary angiomatosis: Description of 13 cases reported in five reference centers for AIDS treatment in Rio de Janeiro, Brazil. 43(1): 1-6
- Gillespie, T. N., R. J. Washabau, M. H. Goldschmidt, J. M. Cullen, A. R. Rogala and E. B. Breitschwerdt (2003). Detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* DNA in hepatic specimens from two dogs with hepatic disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222(1): 47-51
- Glaus, T., R. Hoffmann-Lehmann, C. E. Greene, B. Glaus, C. Wolfensberger and H. Lutz (1997). Seroprevalence of *Bartonella henselae* infection and correlation with disease status in cats in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 35(11): 2883-2885

- Gomes-Keller, M. A., E. Gonczi, B. Grenacher, R. Tandon, R. Hofman-Lehmann and H. Lutz (2009). Fecal shedding of infectious Feline leukemia virus and its nucleic acids: a transmission potential. *Vet. Microbiol.* 134(3-4): 208-217
- Greene, C. E., M. McDermott, P. H. Jameson, C. L. Atkins and A. M. Marks (1996). *Bartonella henselae* infection in cats: Evaluation during primary infection, treatment and rechallenged infection. *J. Clin. Microbiol.* 34(7): 1682-1685
- Guimaraes, A. M., P. E. Brandao, W. Moraes, S. Kiihl, L. C. Santos, C. Filoni, Z. S. Cubas, R. R. Robes, L. M. Marques, R. L. Neto, M. Yamaguti, R. C. Oliveira, J. L. Catao-Dias, L. J. Richtzenhain, J. B. Messick, A. W. Biondo and J. Timenetsky (2010). Detection of *Bartonella* spp. in neotropical felids and evaluation of risk factors and hematological abnormalities associated with infection. *Vet. Microbiol.* 142(3-4): 346-351
- Guptill, L., L. Slater, C. C. Wu, T. L. Lin, L. T. Glickman, D. F. Welch and H. HogenEsch (1997). Experimental infection of young specific pathogen-free cats with *Bartonella henselae*. *J. Infect. Dis.* 176(1): 206-216
- Hadfield, T. L., R. Warren, M. Kass, E. Brun and M. D. Levy (1993). Endocarditis caused by *Rochalimea henselae*. *Hum. Pathol.* 24(10): 1140-1141
- Hansmann, Y., S. DeMartino, Y. Piémont, N. Meyer, P. Mariet, R. Heller, D. Christmann and B. Jaulhac (2005). Diagnosis of cat scratch disease with detection of *Bartonella henselae* by PCR: A study of patients with lymph node enlargement. *J. Clin. Microbiol.* 43(3): 3800-3806
- Hardy, W. D., Jr., P. W. Hess, E. G. MacEwen, A. J. McClelland, E. E. Zuckerman, M. Essex, S. M. Cotter and O. Jarrett (1976). Biology of Feline leukemia virus in the natural environment. *Cancer Res.* 36(2.2): 582-588
- Hartmann, K. and K. Hinze (1991). Epidemiology and clinical aspects of FIV infection in Bavaria. *Tierarztl. Prax.* 19(5): 545-551
- Hinshaw, V. S. and H. F. Blank (1977). Isolation of Feline leukemia virus from clinical specimens. *Am. J. Vet. Res.* 38(1): 55-57
- Hofmann-Lehmann, R., E. Holznagel, P. Ossent and H. Lutz (1997). Parameters of disease progression in long-term experimental feline retrovirus (Feline immunodeficiency virus and Feline leukemia virus) infections: hematology, clinical chemistry, and lymphocyte subsets. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4(1): 33-42
- Hoover, E. A., J. I. Mullins, S. L. Quackenbush and P. W. Gasper (1987). Experimental transmission and pathogenesis of immunodeficiency syndrome in cats. *Blood* 70(6): 1880-1892
- Jäckel, M. C., T. Glock and A. Künster (2006). Okuloglanduläres Syndrom nach Parinaud. Seltene Differenzialdiagnose des "roten Auges". *HNO* 1(54): 37-40

- Jackson, M. L., D. M. Haines, S. M. Meric and V. Misra (1993). Feline leukemia virus detection by immunohistochemistry and polymerase chain reaction in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue from cats with lymphosarcoma. *Can. J. Vet. Res.* 57(4): 269-276
- Jarrett, W. F., E. M. Crawford, W. B. Martin and F. Davie (1964a). A Virus-Like Particle Associated with Leukemia (Lymphosarcoma). *Nature* 202: 567-569
- Jarrett, W. F., W. B. Martin, G. W. Crichton, R. G. Dalton and M. F. Stewart (1964b). Transmission Experiments with Leukemia (Lymphosarcoma). *Nature* 202: 566-567
- Kempf, V. A., M. Lebedziejewski, K. Alitalo, J. H. Walzlein, U. Eehalt, J. Fiebig, S. Huber, B. Schutt, C. A. Sander, S. Muller, G. Grassl, A. S. Yazdi, B. Brehm and I. B. Autenrieth (2005). Activation of hypoxia-inducible factor-1 in bacillary angiomatosis: evidence for a role of hypoxia-inducible factor-1 in bacterial infections. *Circulation* 111(8): 1054-1062
- Kempf, V. A. J. (2007). *Bartonella* - Infektionen des Menschen: Neue Erkrankungen durch einen alten Erreger. *Der Mikrobiologe* 17(5): 171-180
- Kitchell, B. E., T. M. Fan, D. Kordick, E. B. Breitschwerdt, G. Wollenberg and C. A. Lichtensteiner (2000). Peliosis hepatis in a dog infected with *Bartonella henselae*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 216(4): 519-523, 517
- Koehler, J. E., C. A. Glaser and J. W. Tappero (1994). *Rochalimaea henselae* infection. A new zoonosis with the domestic cat as reservoir. *The Journal of the American Medical Association* 271(7): 531-535
- Kolb-Mäurer, A. and W. Goebel (2003). Susceptibility of hematopoietic stem cells to pathogens: role in virus / bacteria tropism and pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 226(2): 203-207
- Kolb-Mäurer, A., M. Wilhelm, F. Weissinger, E. B. Bocker and W. Goebel (2002). Interaction of human hematopoietic stem cells with bacterial pathogens. *Blood* 100(10): 3703-3709
- Kordick, D. L. and E. B. Breitschwerdt (1997). Relapsing bacteremia after blood transmission of *Bartonella henselae* to cats. *Am. J. Vet. Res.* 58(5): 493-497
- Kordick, D. L., T. T. Brown, K. Shin and E. B. Breitschwerdt (1999). Clinical and pathologic evaluation of chronic *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cats. *J. Clin. Microbiol.* 37(5): 1536-1547
- Kordick, D. L., M. G. Papich and E. B. Breitschwerdt (1997). Efficacy of enrofloxacin or doxycycline for treatment of *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41(11): 2448-2455
- Kostrzewski, J. (1949). The epidemiology of trench fever. *Bull. Acad. Pol. Sci. [Biol].* 7: 233-263

- Kurtzman, G. J., L. Platanius, L. Lustig, N. Frickhofen and N. S. Young (1989). Feline parvovirus propagates in cat bone marrow cultures and inhibits hematopoietic colony formation in vitro. *Blood* 74(1): 71-81
- La Scola, B. and D. Raoult (1999). Culture of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* from human samples: a 5-year experience (1993 to 1998). *J. Clin. Microbiol.* 37(6): 1899-1905
- Lappin, M. R., D. L. Kordick and E. B. Breitschwerdt (2000). *Bartonella* spp antibodies and DNA in aqueous humour of cats. *J Feline Med Surg* 2(1): 61-68
- Lin, Y.-Y., C.-H. Hsiao, Y.-H. Hsu, C.-C. Lee, H.-J. Tsai and M.-J. Pan (2006). Immunohistochemical study of lymph nodes in patients with cat scratch disease. *J. Formos. Med. Assoc.* 105(11): 911-917
- Linenberger, M. L., G. H. Shelton, M. T. Persik and J. L. Abkowitz (1991). Hematopoiesis in asymptomatic cats infected with Feline immunodeficiency virus. *Blood* 78(8): 1963-1968
- Mändle, T., H. Einsele, M. Schaller, D. Neumann, W. Vogel, I. B. Autenrieth and V. A. J. Kempf (2005). Infection of human CD34+ progenitor cells with *Bartonella henselae* results in intraerythrocytic presence of *B. henselae*. *Blood* 106(4): 1215-1222
- Margileth, A. M. (1992). Antibiotic therapy for cat-scratch disease: Clinical study of therapeutic outcome in 268 patients and a review of the literature. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 11(6): 474-478
- Margolis, B., I. Kuzu, M. Herrmann, M. D. Raible, E. Hsi and S. Alkan (2003). Rapid polymerase chain reaction-based confirmation of cat scratch disease and *Bartonella henselae* infection. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 127(6): 706-710
- Mehok, J. R., C. E. Greene, F. C. Gherardini, T.-W. Hahn and D. C. Krause (1998). *Bartonella henselae* invasion of feline erythrocytes in vitro. *Infect. Immun.* 66(7): 3462-3466
- Mexas, A. M., S. I. Hancock and E. B. Breitschwerdt (2002). *Bartonella henselae* and *Bartonella elizabethae* as potential canine pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 40(12): 4670-4674
- Mochizuki, M., M. Horiuchi, H. Hiragi, M. C. San Gabriel, N. Yasuda and T. Uno (1996). Isolation of canine parvovirus from a cat manifesting clinical signs of feline panleukopenia. *J. Clin. Microbiol.* 34(9): 2101-2105
- Molia, S., B. B. Chomel, R. W. Kasten, C. M. Leutenegger, B. R. Steele, L. Marker, J. S. Martenson, D. F. Keet, R. G. Bengis, R. P. Peterson, L. Munson and S. J. O'Brien (2004). Prevalence of *Bartonella* infection in wild African lions (*Panthera leo*) and cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Vet. Microbiol.* 100(1-2): 31-41

- Molina, J.-M., D. T. Scadden, M. Sakaguchi, B. Fuller, A. Woon and J. E. Groopman (1990). Lack of evidence for infection or effect on growth of hematopoietic progenitor cells after in vivo or in vitro exposure to Human immunodeficiency virus. *Blood* 76(12): 2476-2482
- Mouritsen, C. L., C. M. Litwin, R. L. Maiese, S. M. Segal and G. H. Segal (1997). Rapid polymerase chain reaction-based detection of the causative agent of cat scratch disease (*Bartonella henselae*) in formalin-fixed, paraffin-embedded samples. *Hum. Pathol.* 28(7): 820-826
- Mullins, J. I. and E. A. Hoover (1989). Molecular aspects of Feline leukemia virus pathogenesis.
- O'Reilly, K. L., R. W. Bauer, R. L. Freeland, L. D. Foil, K. J. Hughes, K. R. Rohde, A. F. Roy, R. W. Stout and P. C. Triche (1999). Acute clinical disease in cats following infection with a pathogenic strain of *Bartonella henselae* (LSU 16). *Infect. Immun.* 67(6): 3066-3072
- Pacitti, A. M. (1987). Latent Feline leukaemia virus infection: a review. *J. Small Anim. Pract.* 28(12): 1153-1159
- Parrish, C. R. (1992). Panleukopenia *In: Veterinary Diagnostic Virology - A practitioner's guide.* A. E. Castro and W. P. Heuschele, Mosby Year Book: 194-197
- Pedersen, N. C., S. M. Meric, L. Johnson, S. Plucker and G. H. Theilen (1984). The clinical significance of latent Feline leukemia virus infection in cats. *Feline Practice* 14(2): 32-48
- Pedersen, N. C., J. K. Yamamoto, T. Ishida and H. Hansen (1989). Feline immunodeficiency virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 21(1): 111-129
- Perkocha, L. A., S. M. Geaghan, B. Yen, S. L. Nishimura, S. P. Chan, R. Garcia-Kennedy, G. Honda, A. C. Stoloff, H. Z. Klein, R. L. Goldmann, S. Van Meter, L. D. Ferrell and P. E. LeBoit (1990). Clinical and pathological features of bacillary peliosis hepatitis in association with Human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 323(23): 1581-1586
- Qian, X., L. Jin, R. T. Hayden, W. R. Macon and R. V. Lloyd (2005). Diagnosis of cat scratch disease with *Bartonella henselae* infection in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by two different PCR assays. *Diagn. Mol. Pathol.* 14(3): 146-151
- Quigley, J. G., Z. Yang, M. T. Worthington, J. D. Phillips, K. M. Sabo, D. E. Sabath, C. L. Berg, S. Sassa, B. L. Wood and J. L. Abkowitz (2004). Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. *Cell* 118(6): 757-766
- Quimby, J. M., T. Elston, J. Hawley, M. Brewer, A. Miller and M. R. Lappin (2008). Evaluation of the association of *Bartonella* species, Feline herpesvirus 1, Feline calicivirus,

- Feline leukemia virus and Feline immunodeficiency virus with chronic feline gingivostomatitis. *J Feline Med Surg* 10(1): 66-72
- Regnath, T., M. E. A. Mielke, M. Arvand and H. Hahn (1998). Murine Model of *Bartonella henselae* Infection in the immunocompetent host. *Infect. Immun.* 66(11): 5534-5536
- Regnery, R. L., J. A. Rooney, A. M. Johnson, S. L. Nesby, P. Manzewitsch, K. Beaver and J. G. Olson (1996). Experimentally induced *Bartonella henselae* infections followed by challenge exposure and antimicrobial therapy in cats. *Am. J. Vet. Res.* 57(12): 1714-1719
- Relman, D. A., J. S. Loutit, T. M. Schmidt, S. Falkow and L. S. Tompkins (1990). The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. *N. Engl. J. Med.* 323(23): 1573-1580
- Ridder, G. J., C. C. Boedeker, K. Technau-Ihling and A. Sander (2005). Cat-scratch disease: Otolaryngologic manifestations and management. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 132(3): 353-358
- Riess, T., S. G. E. Andersson, A. Lupas, M. Schaller, A. Schäfer, P. Kyme, J. Martin, J.-H. Wälzlein, U. Eehalt, H. Lindroos, M. Schirle, A. Nordheim, I. B. Autenrieth and V. A. J. Kempf (2004). *Bartonella* Adhesin A mediates a proangiogenic host cell response. *J. Exp. Med.* 200(10): 1267-1278
- Rojko, J. L., E. A. Hoover, S. L. Quackenbush and R. G. Olsen (1982). Reactivation of latent Feline leukaemia virus infection. *Nature* 298(5872): 385-388
- Rolain, J. M., P. Brouqui, J. E. Koehler, C. Maguina, M. J. Dolan and D. Raoult (2004). Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(6): 1921-1933
- Rolain, J. M., B. La Scola, Z. Liang, B. Davoust and D. Raoult (2001). Immunofluorescent detection of intraerythrocytic *Bartonella henselae* in naturally infected cats. *J. Clin. Microbiol.* 39(8): 2978-2980
- Roy, A. F., R. E. Corstvet, R. A. Tapp, K. L. Oreilly and H. U. Cox (2001). Evaluation and use of a nested polymerase chain reaction assay in cats experimentally infected with *Bartonella henselae* genotype I and *Bartonella henselae* genotype II. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13(4): 312-322
- Sander, A. (2003). Epidemiologie, Klinik und Diagnostik von *Bartonella*- Infektionen. *Antibiotika Monitor* 19(5)
- Schatzberg, S. J. and N. J. H. Sharp (2003). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of parvoviral DNA from the brains of dogs and cats with cerebellar hypoplasia. *J. Vet. Intern. Med.*(17): 538-544



- Schüleïn, R., A. Seubert, C. Gille, C. Lanz, Y. Hansmann, Y. Piémont and C. Dehio (2001). Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes: A unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. *J. Exp. Med.* 193(9): 1077-1086
- Schunck, B., W. Kraft and U. Truyen (1995). A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of Canine parvovirus and Feline panleukopenia virus in feces. *J. Virol. Methods* 55(3): 427-433
- Slater, L. N. and K. W. Min (1992). Polypoid endobronchial lesions. A manifestation of bacillary angiomatosis. *Chest* 102(3): 972-974
- Slater, L. N., D. F. Welch, D. Hensel and D. W. Coody (1990). A newly recognized fastidious gram-negative pathogen as a cause of fever and bacteremia. *N. Engl. J. Med.* 323(23): 1587-1593
- Slater, L. N., D. F. Welch and K. W. Min (1992). *Rochalimaea henselae* causes bacillary angiomatosis and peliosis hepatis. *Arch. Intern. Med.* 152(3): 602-606
- Spach, D. H., A. S. Kanter, M. J. Dougherty, A. M. Larson, M. B. Coyle, D. J. Brenner, B. Swaminathan, G. M. Matar, D. F. Welch, R. K. Root and W. E. Stamm (1995). *Bartonella (Rochalimea) quintana* bacteremia in inner-city patients with chronic alcoholism. *N. Engl. J. Med.* 332(7): 424-428
- Spaulding, W. B. and J. N. Hennessy (1960). Cat scratch disease. A study of eighty-three cases. *Am. J. Med.* 28: 504-509
- Suntz, M. (2007). Untersuchung zu Vorkommen und Bedeutung latenter Infektionen mit dem *Felinen Leukämievirus (FeLV)* bei Sektionskatzen. Inaugural Dissertation. Institut für Veterinär-Pathologie. Justus-Liebig-Universität Gießen
- Torres, A. N., C. K. Mathiason and E. A. Hoover (2005). Re-examination of Feline leukemia virus: host relationships using real-time PCR. *Virology* 332(1): 272-283
- Torry, J. M. and R. M. Walton (1975). Peliosis hepatis in a cat. *Br Vet J* 131(6): 716-719
- Truyen, U., J. F. Evermann, E. Vieler and C. R. Parrish (1996a). Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology* 215(2): 186-189
- Truyen, U., G. Platzer and C. R. Parrish (1996b). Antigenic type distribution among canine parvoviruses in dogs and cats in Germany. *Vet. Rec.* 138(15): 365-366
- Tsang, W. Y., J. K. Chan and C. S. Wong (1992). Giemsa stain for histological diagnosis of bacillary angiomatosis. *Histopathology* 21(3): 299
- Ueno, H., T. Hohdatsu, Y. Muramatsu, H. Koyama and C. Morita (1996). Does coinfection of *Bartonella henselae* and *FIV* induce clinical disorders in cats? *Microbiol. Immunol.* 40(9): 617-620
- van Erpecum, K. J., A. R. Janssens, J. Kreuning, D. J. Ruiter, H. M. Kroon and A. J. Grond (1988). Generalized peliosis hepatis and cirrhosis after long-term use of oral contraceptives. *Am. J. Gastroenterol.* 83(5): 572-575

- Vobis, M., J. D'Haese, H. Mehlhorn and N. Mencke (2003). Evidence of horizontal transmission of Feline leukemia virus by the cat flea (*Ctenocephalides felis*). *Parasitol. Res.* 91(6): 467-470
- Wakabayashi, T., H. Onda, T. Tada, M. Iijima and Y. Itoh (1984). High incidence of peliosis hepatis in autopsy cases of aplastic anemia with special reference to anabolic steroid therapy. *Acta Pathol. Jpn.* 34(5): 1079-1086
- Warren, K., E. Goldstein, V. S. Hung, J. E. Koehler and W. Richardson (1998). Use of retinal biopsy to diagnose *Bartonella* (formerly *Rochalimaea*) *henselae* retinitis in an HIV-infected patient. *Arch. Ophthalmol.* 116(7): 937-940
- Webster, G. F., C. J. Cockerell and A. E. Friedman-Kien (1992). The clinical spectrum of bacillary angiomatosis. *Br. J. Dermatol.* 126(6): 535-541
- Wesslen, L., C. Ehrenborg, M. Holmberg, S. McGill, E. Hjelm, O. Lindquist, E. Henriksen, C. Rolf, E. Larsson and G. Friman (2001). Subacute bartonella infection in Swedish orienteers succumbing to sudden unexpected cardiac death or having malignant arrhythmias. *Scand. J. Infect. Dis.* 33(6): 429-438
- Wong, A. K., M. Alfert, D. H. Castrillon, Q. Shen, J. Holash, G. D. Yancopoulos and L. Chin (2001). Excessive tumor-elaborated VEGF and its neutralization define a lethal paraneoplastic syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98(13): 7481-7486
- Yamamoto, K., B. B. Chomel, R. W. Kasten, C. M. Hew, D. K. Weber and W. I. Lee (2002). Experimental infection of specific pathogen free (SPF) cats with two different strains of *Bartonella henselae* type I: a comparative study. *Vet. Res.* 33(6): 669-684
- Yamamoto, K., B. B. Chomel, L. J. Lowenstine, Y. Kikuchi, L. G. Phillips, B. C. Barr, P. K. Swift, K. R. Jones, S. P. Riley, R. W. Kasten, J. E. Foley and N. C. Pedersen (1998). *Bartonella henselae* antibody prevalence in free-ranging and captive wild felids from California. *J. Wildl. Dis.* 34(1): 56-63
- Yanoff, M. and A. J. Rawson (1964). Peliosis hepatis: an anatomic study with demonstration of two varieties. *Arch. Pathol.* 77: 159-165
- Zafranie, E. S., A. Cazier, A.-M. Baudelot and G. Feldmann (1984). Ultrastructural lesions of the liver in human peliosis. *Am. J. Pathol.* 114: 349-359
- Zeaiter, Z., P.-E. Fournier, G. Greub and D. Raoult (2003). Diagnosis of *Bartonella* endocarditis by a real-time nested PCR assay using serum. *J. Clin. Microbiol.* 41(3)
- Zeaiter, Z., P.-E. Fournier and D. Raoult (2002). Genomic variation of *Bartonella henselae* strains detected in lymph nodes of patients with cat scratch disease. *J. Clin. Microbiol.* 40(3): 1023-1030

## Anhang I: Abkürzungen

ABC-Methode:	Avidin-Biotin-Komplex Methode
BadA:	<i>Bartonella</i> Adhesin A
bp:	Basenpaare
CFU-E:	<i>colony-forming units-erythroid</i>
CPV:	Canines Parvovirus
DAB:	3'3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
ELISA:	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FAIDS:	Felines erworbenes Immunschwächesyndrom
FeLV:	Felines Leukämievirus
FIV:	Felines Immundefizienz Virus
FLVCR:	<i>Feline leukemia virus- C cell surface receptor</i>
FPV:	Felines Parvovirus
gltA-Gen:	Citratsynthase-Gen
HIV:	Humanes Immundefizienz Virus
htrA-Gen:	<i>high temperature requirement A-Gen</i>
IgG:	Immunglobulin G
IgM:	Immunglobulin M
IHC:	immunhistochemische Untersuchung
IFT:	Immunfluoreszenstest
KBE:	Koloniebildende Einheiten
LK:	Lymphknoten
PBS:	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR:	Polymerasekettenreaktion
SPF:	spezifiziert pathogenfrei
VEGF:	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

## **Anhang II: Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien**

### **a) Geräte**

#### DNA - Isolierung und PCR

Pipetten: Eppendorf Research 2.5, 10, 20, 100, 200, 1000µl; Eppendorf Deutschland, Hamburg

Homogenisator: Precellys 24, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Schüttelblock: Thermomixer Compact, Eppendorf Deutschland, Hamburg

Vortex Mixer: neoLab® 7-2020, Heidelberg;

VWR™ international, Darmstadt

Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5417R, Eppendorf Deutschland, Hamburg

Tischzentrifuge: Micro Centrifuge, Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe

Spektralphotometer: NanoDrop® ND-1000, peqlab, Erlangen

Thermocycler: T 3000, Biometra, Göttingen

Gelkammern für die Elektrophorese: peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Spannungsgeber Elektrophorese: Power - Pac™ Basic, Biorad, München

Gelbetrachtung: UV Transilluminator 2000, Biorad, München

#### Immunhistochemie

Einbettautomat: Tissue -Tek® VIP, Sakura Finetek Germany GmbH, Heppenheim

Mikrotom: HM 335E, Microm GmbH, Walldorf

Coverplates: Shandon Coverplate™, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich

Eindeckautomat: Leica CV3030, Nussloch

### **b) Reagenzien**

#### PCR

Ultra pure Water, Biochrom AG, Berlin

GoTaq™ Flexi DNA Polymerase, Promega, Mannheim

5x Flexi Buffer Colourless / Green, Promega, Mannheim

dNTP-Mix 2mM each, Fermentas, St. Leon-Roth, Germany

25 mM MgCl<sub>2</sub>, Promega, Mannheim

Molecular Grade Agarose, Bioline GmbH, Luckenwalde

HyperLadder™ II, Bioline GmbH, Luckenwalde

Roti®-Load DNA-small, Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe

### Immunhistochemie

DAB Puffertabletten, Merck, Darmstadt

Methanol, Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS): eigene Herstellung (siehe Anhang II)

Pronase E: Protease aus *Streptomyces griseus*, Aktivität 11054,5 U/mg, AppliChem GmbH, Darmstadt

Vectastain Elite ABC-Kit, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA

Wasserstoffperoxid 30%, Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe

### **c) Verbrauchsmaterialien**

QiaAmp DNA Mini Kit, Qiagen, Hilden

Reaktionsgefäße zu 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml: SafeSeal Reagiergefäße, Sarstedt AG + Co, Nümbrecht

PCR Gefäße mit gewölbtem Deckel, Brand GmbH +Co KG, Wertheim

Lysis Matrix D - Gefäße, MP Biomedicals, Eschwege

Star Frost® adhäsiv beschichtete Objektträger, Knittel Glasbearbeitung, Braunschweig

## Anhang III: Rezepturen

### PCR

#### 1x PBS-Lösung (1 l)

NaCl (137 mM)	8 g
KCl (2,7 mM)	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (10mM)	1,44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (2mM)	0,24 g

#### TBE-Puffer für die Gelelektrophorese

##### 5x konzentrierte Lösung (2 l):

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	108 g
Borsäure	55 g
0,5 M EDTA pH 8,0	40 ml
Aqua dest.	ad 2 l

0,5x Arbeitslösung: 5x Konzentrierte Lösung im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnen

### Immunhistochemie

#### 10%iges Formalin (82 l)

37% Formaldehyd <sub>(aq)</sub> , stabilisiert mit 10% Methanol (Roth, Karlsruhe)	22 l
CaCO <sub>3</sub> (Roth, Karlsruhe)	40 g
Aqua dest.	60 l

#### PBS-Lösung für die Immunhistochemie (5 l)

NaCl (137 mM)	40 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (10mM)	8,97 g
Aqua dest.	5 l

Mit NaOH<sub>(l)</sub> auf pH 7,0 bis 7,2 einstellen

#### Citrat-Mikrowellenpuffer (1 l)

2,1g Citronensäuremonohydrat in 1 l Aqua dest. lösen

# Publikationsliste

## Artikel in Fachzeitschriften

### **Does a feline leukemia virus infection pave the way for *Bartonella henselae* infection in cats?**

A. U. Buchmann, O. Kershaw, V. A. Kempf, A. D. Gruber  
Journal of Clinical Microbiology 48(9), 2010, 3295-3300

### **Peliosis hepatis in cats is not associated with *Bartonella henselae* infections**

A. U. Buchmann, V. A. Kempf, O. Kershaw, A. D. Gruber  
Veterinary Pathology 47 (1), 2010, 163-66

## Posterpräsentationen:

### **Einfluss immunsuppressiver Krankheiten auf eine Infektion mit *Bartonella henselae* bei Katzen**

A. U. Buchmann, O. Kershaw, A. D. Gruber  
17. Jahrestagung der Fachgruppe Innere Medizin und Klinische Labordiagnostik der DVG, InnLab, 31.01.-01.02.2009, Berlin

### **The role of *Bartonella henselae* in cats with immunocompromising conditions**

O. Kershaw, A.U. Buchmann, A. D. Gruber  
26th Annual Meeting of the European Society of Veterinary Pathology,  
17.-21.09.2008, Dubrovnik, Kroatien

### **Einfluss immunsuppressiver Krankheiten auf eine Infektion mit *Bartonella henselae* bei Katzen**

A. U. Buchmann, O. Kershaw, A. D. Gruber  
Doktorandensymposium der Freien Universität Berlin (Fachbereich Veterinärmedizin),  
27.06.2008, Berlin

### **Einfluss einer Immunsuppression auf eine Infektion mit *Bartonella henselae* bei Katzen**

A. U. Buchmann, O. Kershaw, A. D. Gruber  
Doktorandensymposium der Freien Universität Berlin (Fachbereich Veterinärmedizin),  
08.06.2007, Berlin

## Vortrag:

### **Einfluss potenziell immunsuppressiver Krankheiten auf eine Infektion mit *Bartonella henselae* bei Katzen**

A. U. Buchmann, O. Kershaw, A. D. Gruber  
52. Jahrestagung der DVG Fachgruppe Pathologie, 06.-08.03.2009, Fulda

## Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Achim Gruber, für dieses interessante und diagnostisch orientierte Thema und dafür, dass er mich stets in meinen Plänen unterstützte. Danke auch für die Möglichkeit, in der von mir so geliebten Einsendungsdiagnostik arbeiten zu dürfen.

Der H. WILHELM SCHAUMANN Stiftung danke ich von Herzen für die finanzielle Unterstützung, die es mir überhaupt erst ermöglicht hat, zu promovieren.

Meiner Betreuerin, Dr. Olivia Kershaw, danke ich für gute Ratschläge, das Korrekturlesen und vor allem dafür, dass sie mich ermutigt hat, nach Hause zu fahren, als meine Mutter krank wurde.

Frau Jana Enders und Frau Monika Schaerig danke ich für ihre unschätzbare Hilfe in Laborangelegenheiten.

Meiner lieben Zimmerkollegin Dr. Elisabeth van der Grinten danke ich für die wunderbare Zeit, die wir in unserem Büro hatten, für die hervorragende fachliche Anleitung in allen Fragen der Pathologie, für gute Gespräche und unsere tägliche Portion Lachen.

Vor allem aber möchte ich meinem Vater danken. Deiner Liebe und Deinem bedingungslosen Rückhalt verdanke ich alles, was ich erreicht habe. Danke von ganzem Herzen!

Und schließlich danke ich meinem Mann, Björn Ritsert, der immer an mich geglaubt hat und mir half, auch die Durststrecken der Forschung zu überstehen.



## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Leichlingen, den 27.10.2010

Alexandra U. Buchmann