

III. Ergebnisse

3.1 Wachstumsverhalten von *B.h.* in vitro

In der folgenden Abbildung wird als typisches Beispiel für das Wachstumsverhalten von *B.h.* eine Wachstumskurve des Erregerstammes B1 gezeigt. Diese wurde aus den Mittelwerten von drei nacheinander durchgeführten Untersuchungen erstellt.

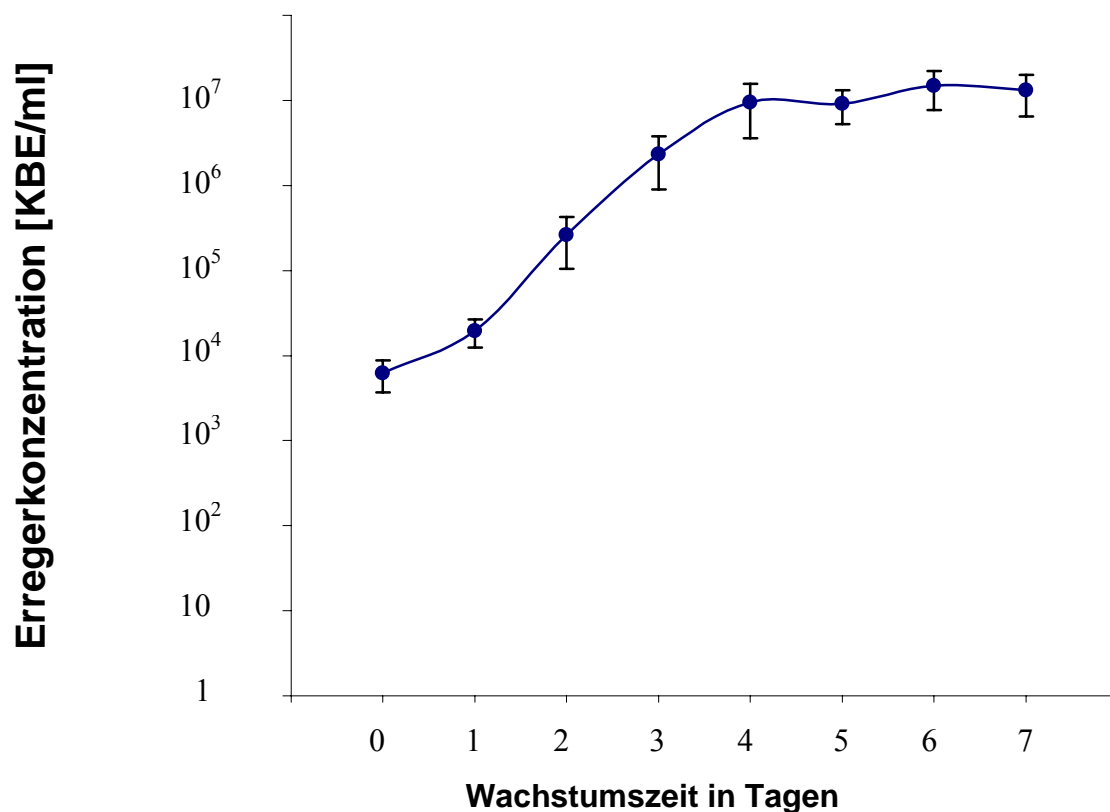


Abbildung 2: Typische Wachstumskurve von *B.h.* Logarithmische Darstellung der Mittelwerte von drei Untersuchungen, in denen täglich über einen Zeitraum von acht Tagen die Erregerkonzentration des *B.-h.*-Stammes B1 in KBE/ml Nährbouillon bestimmt wurde. Für jede der drei Untersuchungen wurde täglich eine Verdünnungsreihe bis zu 1:10⁶ angefertigt und jede Verdünnungsstufe auf 3 Columbia-Agar-Platten ausgestrichen. Die eingezeichnete Standardabweichung wurde aus allen bewachsenen, auszählbaren Platten eines Tages berechnet.

Es wurde der Zeitpunkt bestimmt, an dem sich die Erreger am Ende ihrer logarithmischen Vermehrung befinden. In dieser Phase ist es möglich, Bakterien mit maximaler Stoffwechselaktivität in hohen Konzentrationen zu gewinnen. In der darauf folgenden Plateauphase ist die Erregerdichte zwar etwas höher, die Stoffwechselaktivität jedoch

reduziert. Bei allen verwendeten *B.-h.*-Stämmen erwies sich der dritte Tag nach Beimpfung der flüssigen Nährmedien als am geeignetsten.

Während die Erregerkonzentration bei den *B.-h.*-Stämmen B1 und ATCC #49882 nach vier Tagen ein Plateau von etwa 1×10^7 KBE/ml erreichte, lagen die durchschnittlichen maximalen Konzentrationen von B2 bei ca. 6×10^6 KBE/ml.

Wurde eine Bakteriensuspension aufgetaut, die einen Zeitraum von wenigen Stunden bis einigen Monaten bei -70°C gelagert hatte, ergab sich ein KBE-Verlust von etwa einer Zehnerpotenz.

3.2 Gewebereaktion der Inokulationsstelle

An den Ballen der Hinterläufe der infizierten Mäuse wurde zu keinem Zeitpunkt eine makroskopisch sichtbare Läsion beobachtet.

3.3 Kultureller Nachweis von *B.h.*

B.h. konnte kulturell nur zum Zeitpunkt der ersten Organentnahme zwei Tage p.i. nachgewiesen werden. Bei den Mäusen, die mit dem Erregerstamm B1 infiziert wurden, ließen sich 12 bzw. 4 KBE in zwei von drei Milzen nachweisen. Aus einem von drei Lymphknoten konnten 4 KBE angezüchtet werden. In zwei von drei Lymphknoten der mit B2 infizierten Tiere gelang der Nachweis von 3 bzw. 4 KBE, sowie 7 KBE in einer von drei Milzen. Weitere Kulturen konnten weder aus anderen Organen noch zu späteren Untersuchungszeitpunkten gewonnen werden. Die Organkulturen der mit ATCC #49882 infizierten Mäuse waren ausnahmslos negativ.

3.4 Molekularbiologischer Nachweis von *B.h.*

Pro Entnahmetag und Stamm wurden popliteale Lymphknoten, Leber und Milz von drei Mäusen untersucht.

Wie der folgenden Tabelle 2 zu entnehmen ist, war mit Hilfe molekularbiologischer Diagnostik nach zwei Tagen bei mindestens einem Tier pro infizierter Gruppe in allen untersuchten Organen *B.-h.*-DNS nachweisbar. In den poplitealen Lymphknoten ließ sich

B.-h.-DNS der Erregerstämme B1 und ATCC #49882 bis Woche 12 bzw. des Stammes B2 bis Woche acht nachweisen.

Mindestens in einem Organ gelang der Nachweis von *B.-h.*-spezifischer DNS bei allen verwendeten *Bartonella*-Stämmen bis zur 16. Woche p.i.

B.-h.-DNS des Stammes ATCC #49882 ließ sich sogar noch 20 Wochen p.i. in zwei Organen nachweisen.

Bei der Mehrzahl der untersuchten Organe ergab die PCR-Untersuchung jedoch, unabhängig vom injizierten Bartonellen-Stamm, negative Ergebnisse.

In Abb. 3 wird beispielhaft das Foto einer Gel-Elektrophorese gezeigt. In dieser ist die charakteristische Bande von *B.h.* bei 390 Basenpaaren zu sehen.

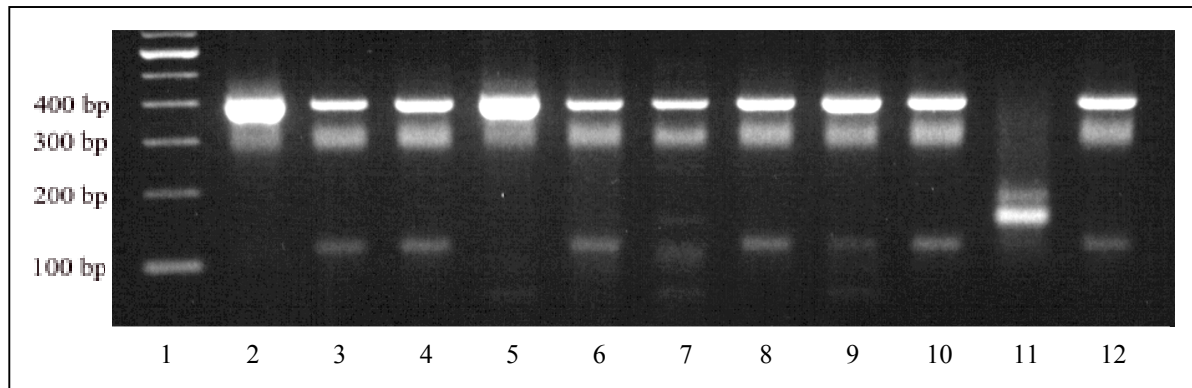


Abbildung 3: Typisches Ergebnis einer *B.h.*-spezifischen, semi-nested PCR. Ethidiumbromid gefärbtes, 2%iges Agarosegel, durch einen UV-Transilluminator visualisiert und durch ein Polaroid-Foto dokumentiert. *Spur 1:* DNA-Ladder, *Spur 2:* *B.h.*-Stamm B1, poplitealer Lymphknoten, 2 Tage p.i., *Spur 3:* *B.h.*-Stamm ATCC #49882, poplitealer Lymphknoten, 6 Wochen p.i., *Spur 4:* *B.h.*-Stamm B2, poplitealer Lymphknoten, 2 Tage p.i., *Spur 5:* *B.h.*-Stamm B1, Leber, 2 Tage p.i., *Spur 6:* *B.h.*-Stamm ATCC #49882, Leber, 2 Tage p.i., *Spur 7:* *B.h.*-Stamm B2, Leber, 2 Tage p.i., *Spur 8:* *B.h.*-Stamm B1, Milz, 2 Tage p.i., *Spur 9:* *B.h.*-Stamm ATCC #49882, Milz, 16 Wochen p.i., *Spur 10:* *B.h.*-Stamm B2, Milz, 2 Tage p.i., *Spur 11:* Negativkontrolle mit Aqua injectabilia, *Spur 12:* Positivkontrolle mit DNS aus *B.h.*-Kolonien des Stammes B1.

3.5 Zelluläre Immunantwort

3.5.1 Gewichtsentwicklung der poplitealen Lymphknoten

Wie den folgenden Abb. 4-6 zu entnehmen ist, ergab sich bereits am zweiten Tag p.i. in den poplitealen Lymphknoten aller infizierten Mäuse eine Gewichtszunahme, die bis auf wenige Ausnahmen bei allen Erregerstämmen über den gesamten Untersuchungszeitraum deutlich nachweisbar war. Die Schwankungsbreite innerhalb einer Mäusegruppe an einem Untersuchungszeitpunkt war z.T. sehr hoch.

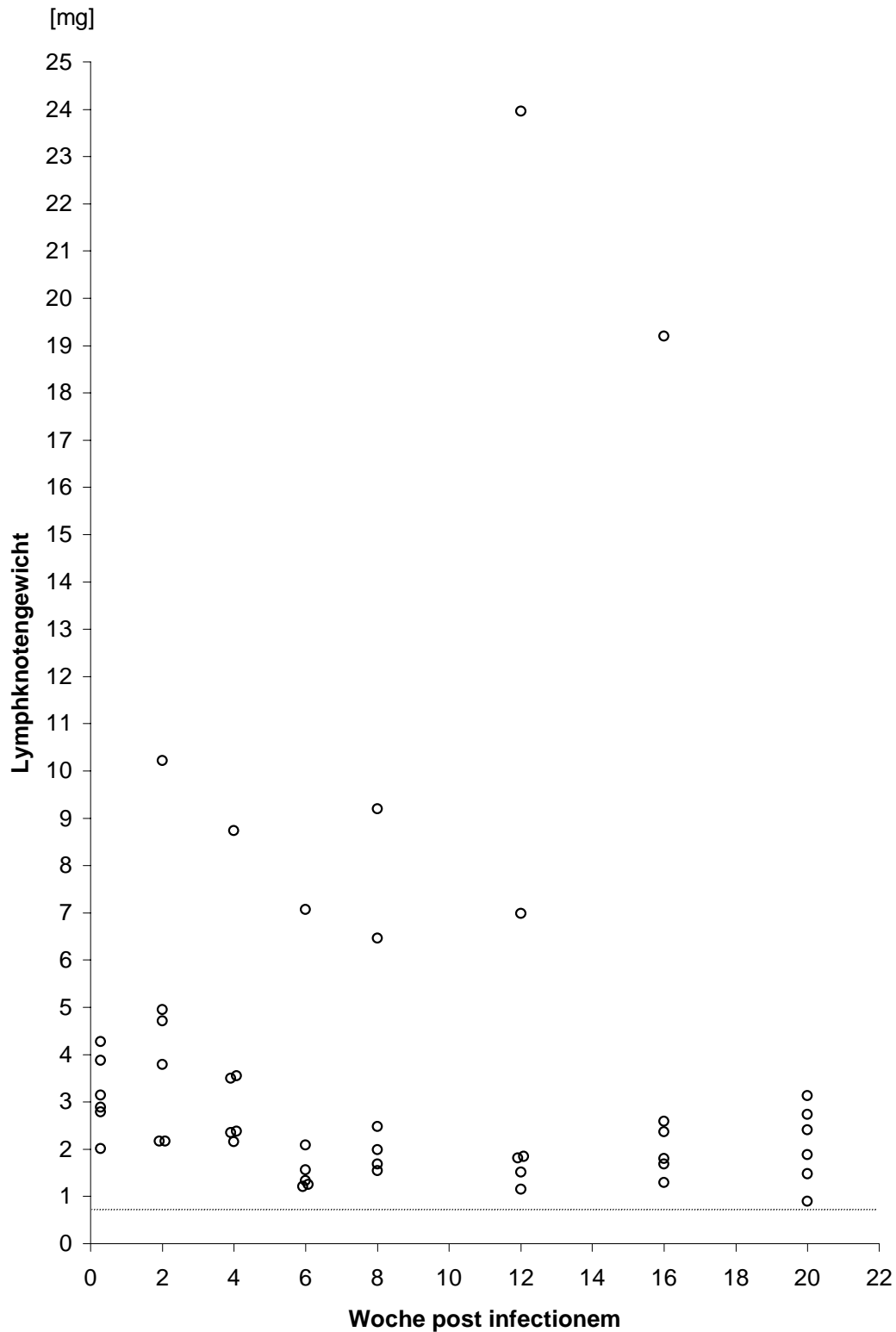


Abbildung 4: Gewichte der poplitealen Lymphknoten von je sechs Mäusen pro Untersuchungstermin, die mit $5,5 \times 10^5$ KBE des *B.-h.*-Stammes B1 infiziert wurden. Die Lymphknoten wurden 2 Tage, sowie 2, 4, 6, 8, 12, 16 und 20 Wochen p.i. gewogen. : Mittleres Gewicht der poplitealen Lymphknoten aller Kontrolltiere.

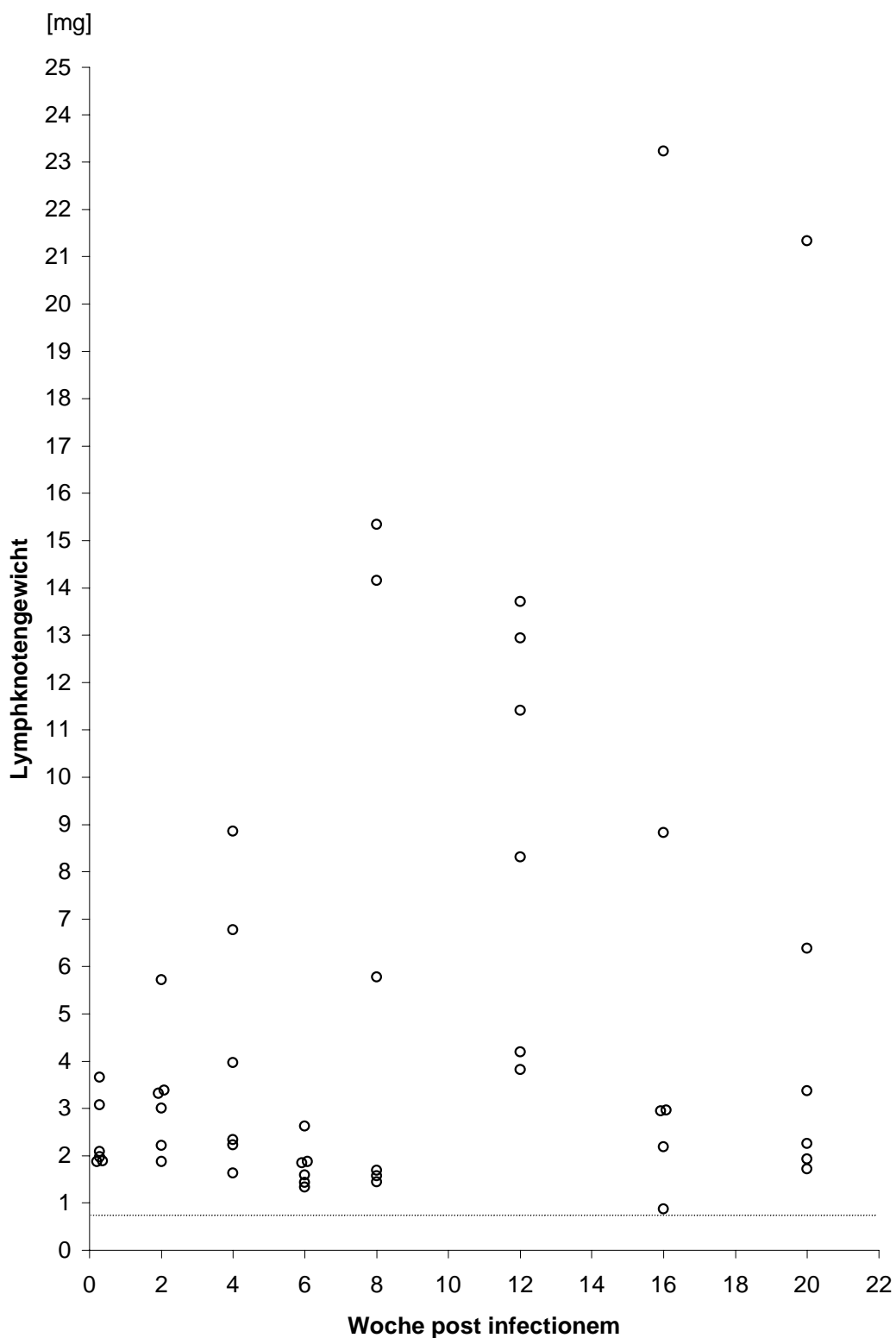


Abbildung 5: Gewichte der poplitealen Lymphknoten von je sechs Mäusen pro Untersuchungstermin, die mit $5,5 \times 10^5$ KBE des *B.-h.*-Stammes ATCC #49882 infiziert wurden. Die Lymphknoten wurden 2 Tage, sowie 2, 4, 6, 8, 12, 16 und 20 Wochen p.i. gewogen. ----- : Mittleres Gewicht der poplitealen Lymphknoten aller Kontrolltiere.

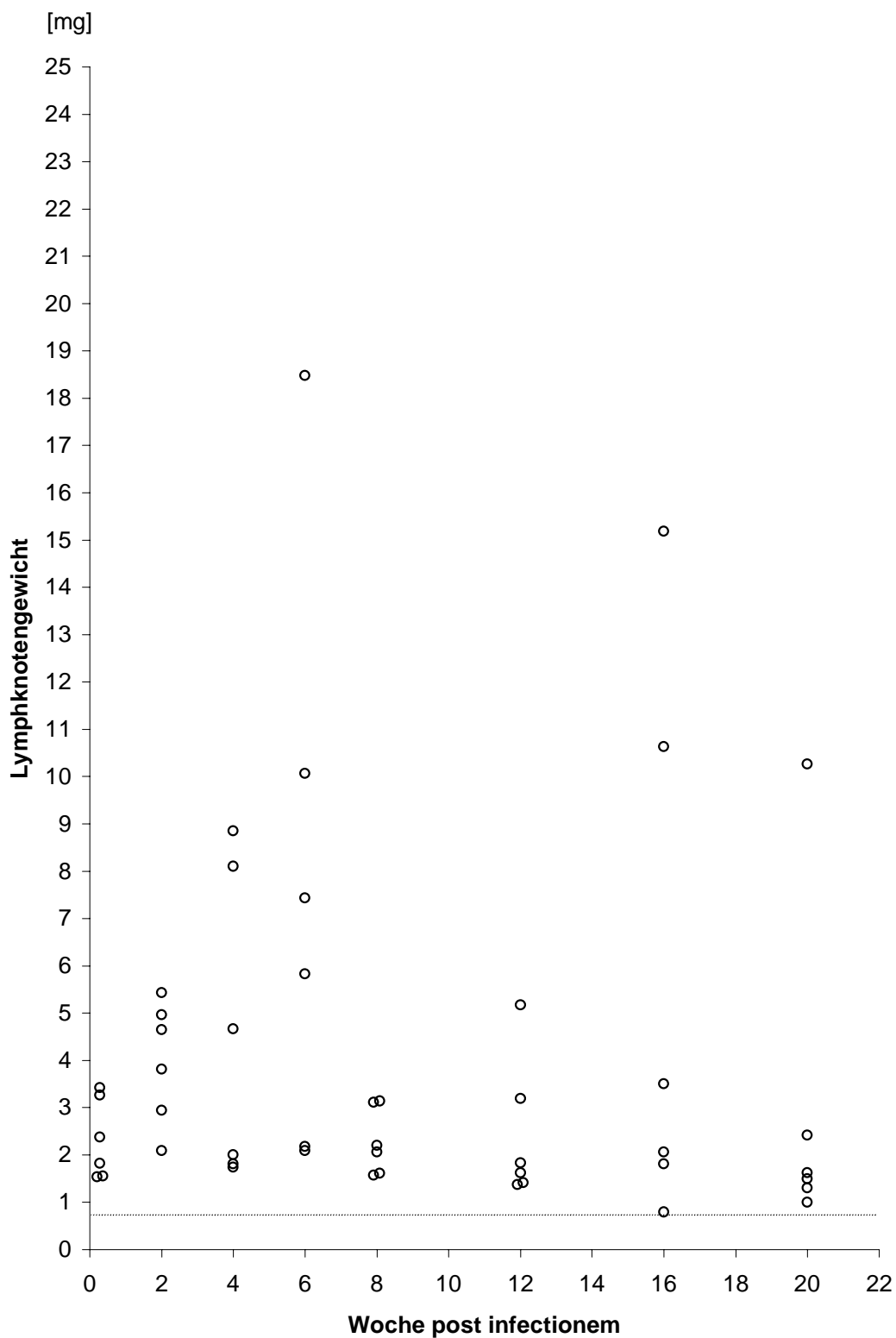


Abbildung 6: Gewichte der poplitealen Lymphknoten von je sechs Mäusen pro Untersuchungstermin, die mit $5,5 \times 10^5$ KBE des *B.-h.*-Stammes B2 infiziert wurden. Die Lymphknoten wurden 2 Tage, sowie 2, 4, 6, 8, 12, 16 und 20 Wochen p.i. gewogen. : Mittleres Gewicht der poplitealen Lymphknoten aller Kontrolltiere.

3.5.2 Lymphknotenhistologie

Pro Entnahmetag und *B.-h.*-Stamm wurden von drei Mäusen die poplitealen Lymphknoten, die die erste große Lymphknotenstation proximal der Inokulationsstelle bilden, untersucht.

Wie der folgenden Tabelle 3 zu entnehmen ist, bildten sich zwei Wochen p.i. in den drainierenden Lymphknoten bei der Mehrzahl der infizierten Tiere Sekundärfollikel mit Keimzentren. Im weiteren Verlauf entstanden lymphomonozytäre Infiltrate. In Mäusen, die mit dem Erregerstamm ATCC #49882 infiziert wurden, kam es bei mehr Individuen zur Bildung von lymphomonozytären Infiltraten im Vergleich zu den anderen beiden Stämmen. Nach Injektion des Stammes B2 war diese Immunreaktion früher maximal ausgeprägt als bei den Stämmen B1 und ATCC #49882, jedoch waren die infiltrativen Veränderungen der Lymphknoten insgesamt geringer ausgeprägt.

Im Vergleich zu den drainierenden Lymphknoten der infizierten Tiere wiesen die entsprechenden Lymphknoten der Kontrolltiere bis zur 16. Woche nur vereinzelt maximal einen Sekundärfollikel auf. Lediglich bei der letzten Untersuchung enthielten auch die Lymphknoten von zwei der vier Kontrollmäuse zwei Sekundärfollikel, bzw. hatte der von einer Kontrollmaus drei Sekundärfollikel. Bei den Lymphknoten der Kontrolltiere traten keine lymphomonozytären Infiltrate auf.

Die Lymphknoten mit den ausgeprägtesten histologischen Veränderungen wiesen auch besonders hohe Gewichte auf. Bei den geringer vergrößerten Lymphknoten bestand jedoch keine enge Korrelation zur Histologie.

Die folgenden Abb. 7-12 zeigen die histologischen Veränderungen der lokalen Lymphknoten nach Infektion mit *B.h.*

Abb. 7 gibt die typische frühe Immunreaktion des drainierenden Lymphknotens wieder. Im Vergleich zum Kontroll-Lymphknoten in Abb.8 ist der Lymphknoten des infizierten Tieres größer und enthält mehrere Sekundärfollikel mit Keimzentren.

Die Abb. 9-11 zeigen Lymphknoten mit besonders deutlich ausgeprägten lymphomonozytären Infiltraten. Für jeden der drei *B.-h.*-Stämme wurde jeweils ein stark infiltrierter Lymphknoten exemplarisch dargestellt.

Abb. 12 zeigt ein lymphomonozytäres Lymphknoteninfiltrat in hoher Vergrößerung (400fach).

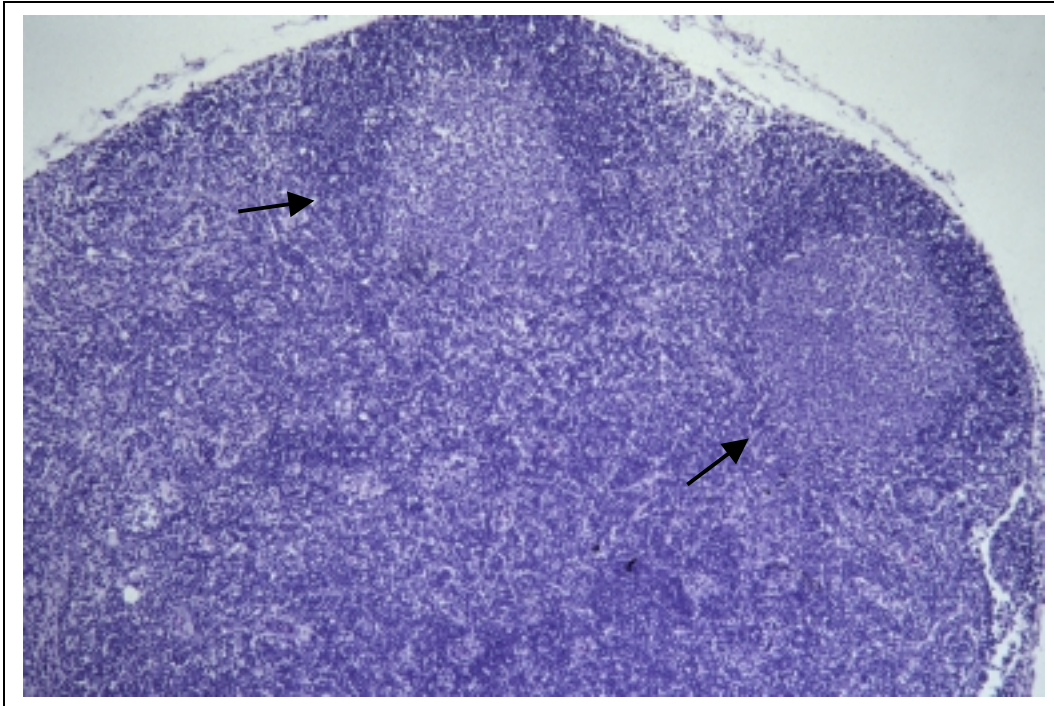


Abbildung 4: Poplitealer Lymphknoten mit Sekundärfollikeln → .
B. henselae-Stamm ATCC, zwei Wochen p.i. Hämatoxylin-Eosin-Färbung,
Originalgröße x 100.

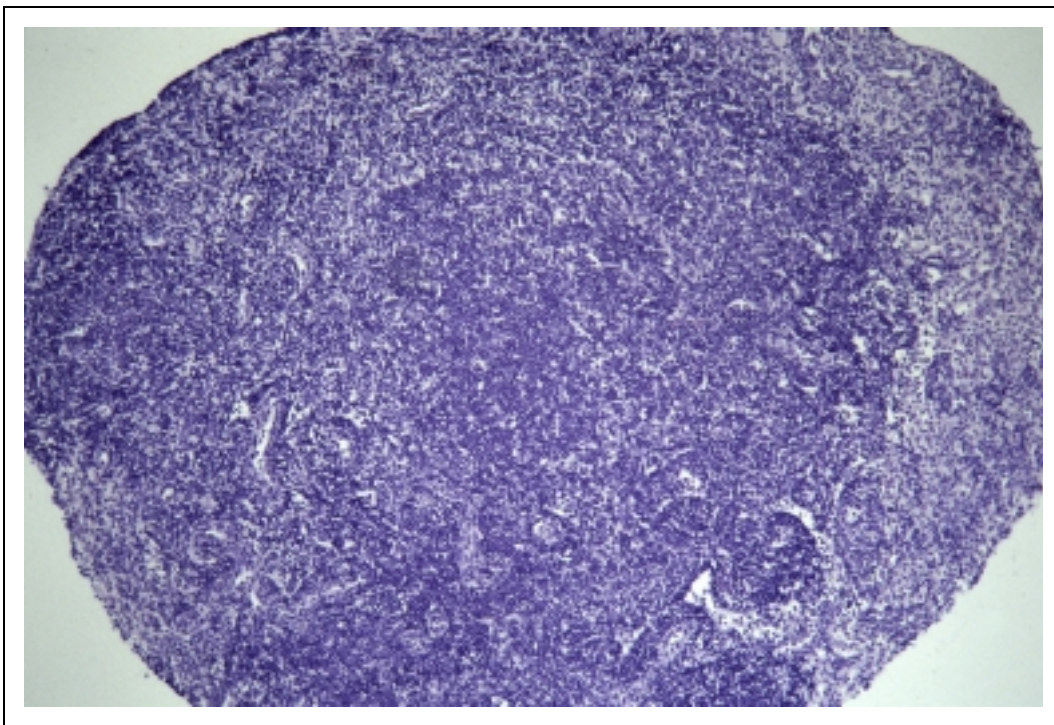


Abbildung 5: Poplitealer Lymphknoten eines Kontrolltiers.
Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Originalgröße x 100.

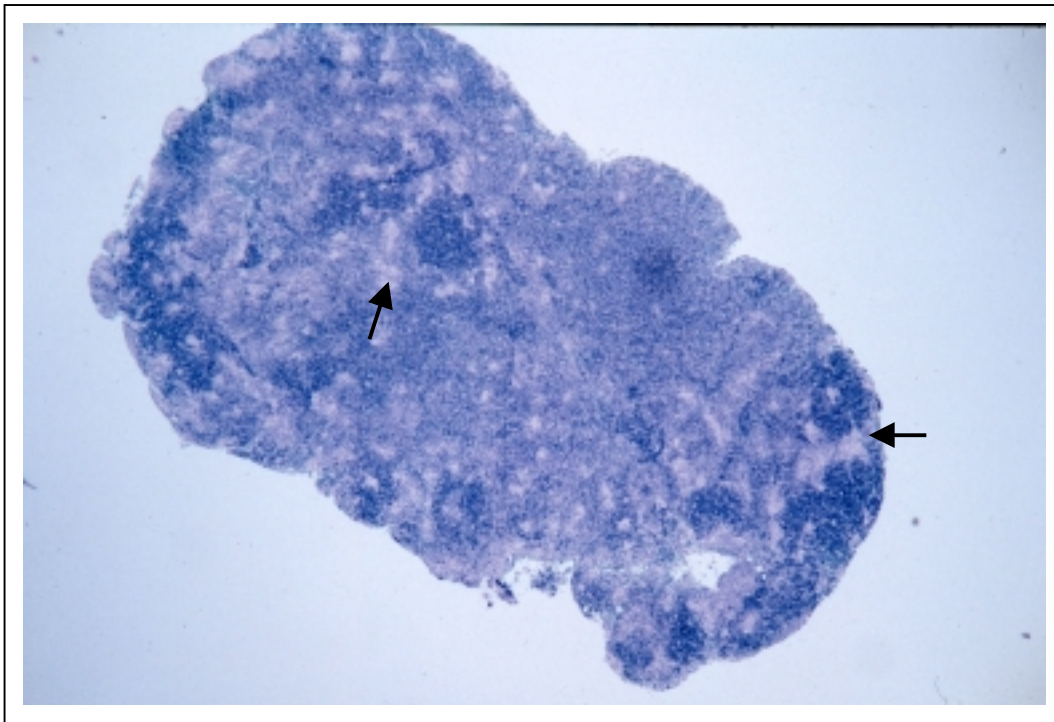


Abbildung 6: Poplitealer Lymphknoten mit konfluierenden, lymphomonozytären Infiltraten → *B. henselae*-Stamm B1, 12 Wochen p.i. Originalgröße x 25.

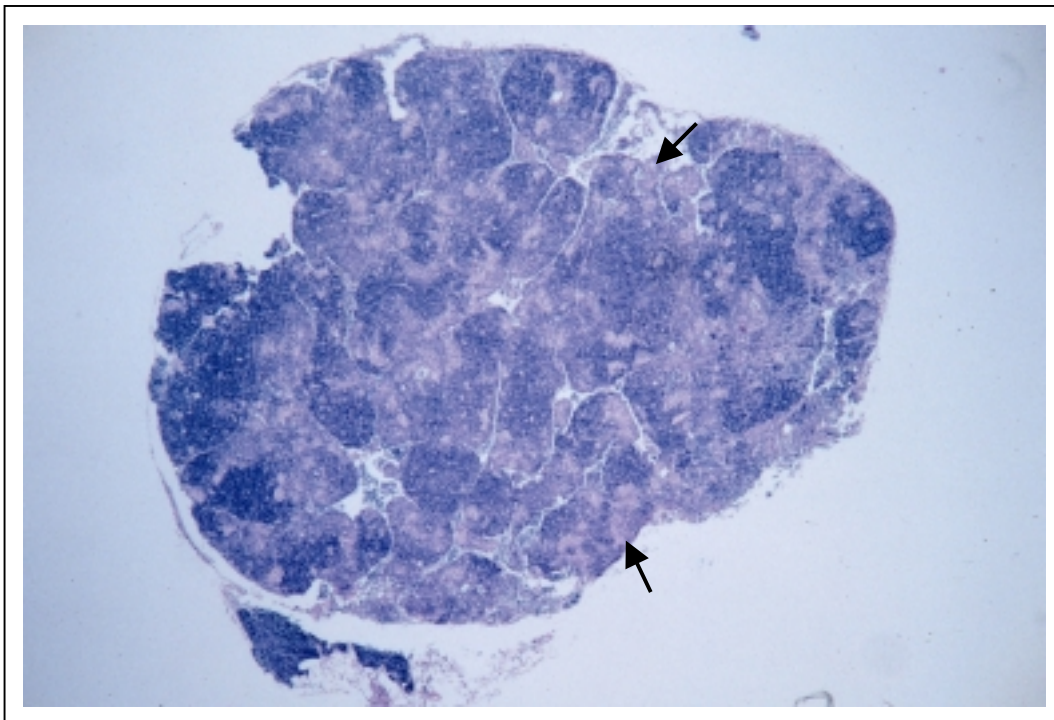


Abbildung 7: Poplitealer Lymphknoten mit konfluierenden lymphomonozytären Infiltraten → *B. henselae*-Stamm ATCC, 16 Wochen p.i. Originalgröße x 25.

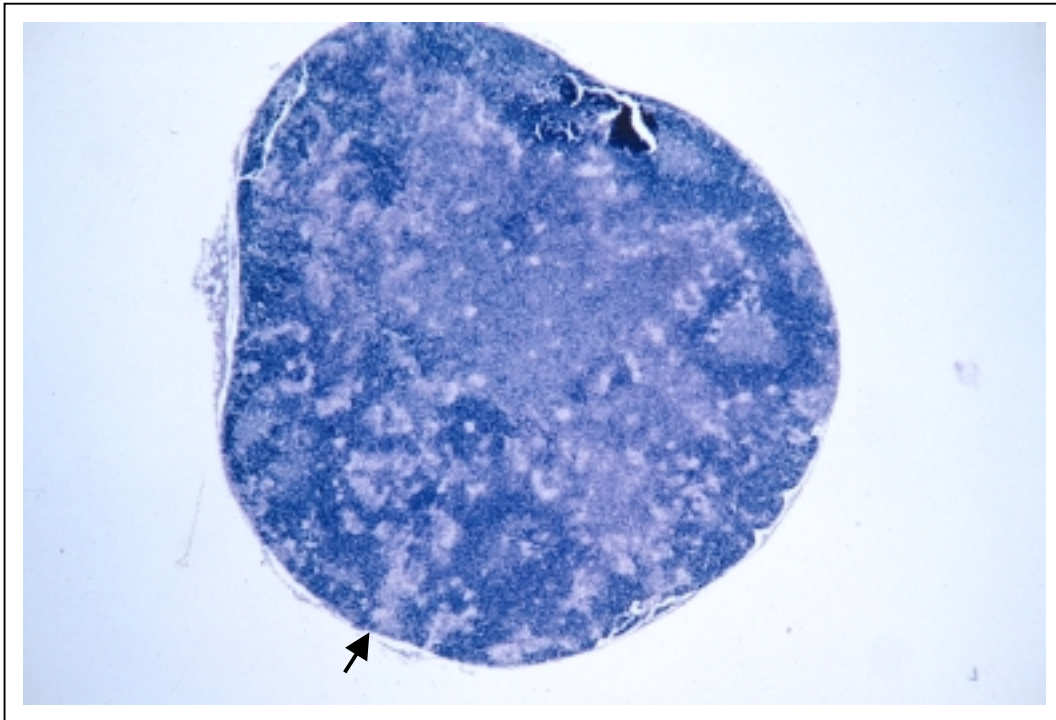


Abbildung 8: Poplitealer Lymphknoten mit konfluierenden lymphomonozytären Infiltraten → *B. henselae*-Stamm B2, sechs Wochen p.i. Originalgröße x 25.

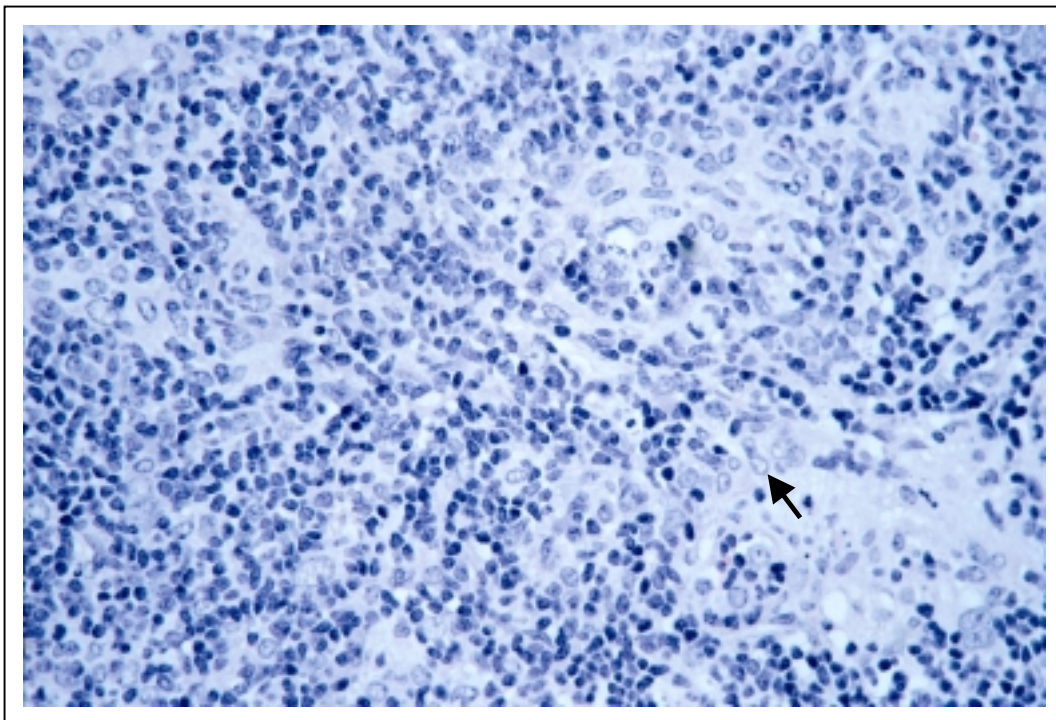


Abbildung 9: Konfluierende lymphomonozytäre Infiltrate des poplitealen Lymphknotens mit Monozyten → *B. henselae*-Stamm B2, sechs Wochen p.i. Originalgröße x 400.

3.5.3 Leberhistologie

Pro Entnahmetag und je Stamm wurden die Lebern von sechs Mäusen histologisch untersucht.

Die generalisierte Immunreaktion wurde histologisch durch die Anzahl der entstehenden entzündlichen Veränderungen erfaßt. Ein histologisches Bild mit maximal einem lymphomonozytären Infiltrat pro Gesichtsfeld bei einer 100fachen Vergrößerung entsprach der Leberhistologie der Kontrolltiere.

Wie die folgende Tabelle 4 zeigt, reagierten mit B1 infizierte Tiere seltener und mit einer geringer ausgeprägten maximalen infiltrativen Veränderung der Leber als die Mäuse der anderen beiden Gruppen. Die maximal aufgetretene Infiltration war bei Infektion mit ATCC bereits zwei Wochen p.i., bei B2 sechs Wochen p.i. zu finden. Bei maximal fünf lymphomonozytären Infiltraten pro Gesichtsfeld (100fache Vergrößerung) wies ein mit B1 infiziertes Tier 12 Wochen p.i. einzelne sehr große Infiltrate auf. 12 Wochen p.i. reagierten die meisten Tieren, die mit den Erregerstämmen B1 und ATCC #49882 infizierten waren, mit lymphomonozytären Infiltraten. Der Untersuchungstag, an dem die größte Anzahl der mit B2 infizierten Tiere Infiltrate gebildet hatten, war acht Wochen p.i.

Tabelle 4: Leberhistologie von jeweils sechs C57BL/6-Mäusen pro Untersuchungstag und Erregerstamm, denen intradermal in beide Hinterlaufballen eine Gesamtdosis von $5,5 \times 10^5$ KBE *B.h.* injiziert wurde. Die Ergebnisse wurden für jeden Untersuchungstag und Erregerstamm nach Anzahl der Infiltrate geordnet (Nr. 1-6). Für die lymphomonozytären Infiltrate galt bei jeweils 100facher Vergrößerung: o: 0-1 Infiltrat pro Gesichtsfeld, +: 2-5 Infiltrate pro Gesichtsfeld, ++: >5 Infiltrate pro Gesichtsfeld.

1) *B.-h.*-Stamm B1

	Nr.	d2	w2	w4	w6	w8	w12	w16	w20
Lympho- monozytäre Infiltrate	1	o	+	+	+	+	+	+	o
	2	o	o	+	o	o	+	+	o
	3	o	o	o	o	o	+	o	o
	4	o	o	o	o	o	o	o	o
	5	o	o	o	o	o	o	o	o
	6	o	o	o	o	o	o	o	o

2) *B.-h.*-Stamm ATCC #49882

	Nr.	d2	w2	w4	w6	w8	w12	w16	w20
Lympho- monozytäre Infiltrate	1	o	++	o	+	+	+	+	+
	2	o	o	o	o	+	+	+	+
	3	o	o	o	o	o	+	o	+
	4	o	o	o	o	o	+	o	o
	5	o	o	o	o	o	+	o	o
	6	o	o	o	o	o	o	+	o

3) *B.-h.*-Stamm B2

	Nr.	d2	w2	w4	w6	w8	w12	w16	w20
Lympho- monozytäre Infiltrate	1	o	+	+	++	+	+	+	+
	2	o	+	o	+	+	o	o	o
	3	o	o	o	o	+	+	o	o
	4	o	o	o	o	o	+	o	o
	5	o	o	o	o	o	+	o	o
	6	o	o	o	o	o	o	o	o

In den folgenden Abb. 13 und 14 ist exemplarisch durch lymphomonozytäre Infiltrate verändertes Lebergewebe in einer Übersichts- und einer Detailansicht dargestellt (25fache bzw. 400fache Vergrößerung).

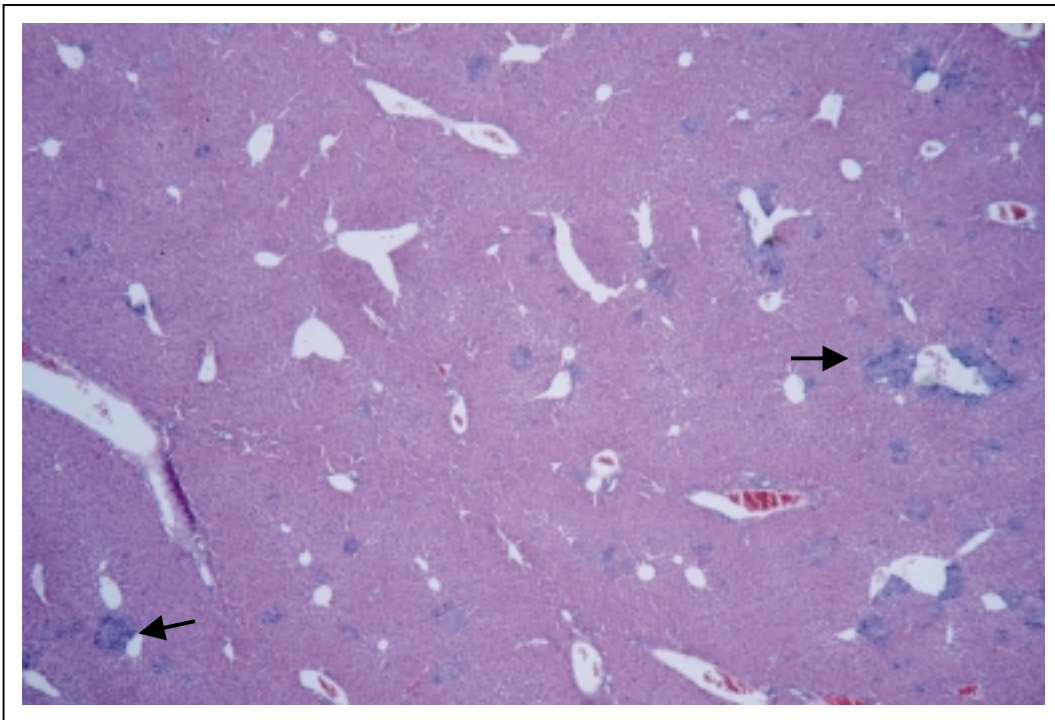


Abbildung 10: Leber mit lymphomonozytären Infiltraten →.
B. henselae-Stamm B2, sechs Wochen p.i. Originalgröße x 25.

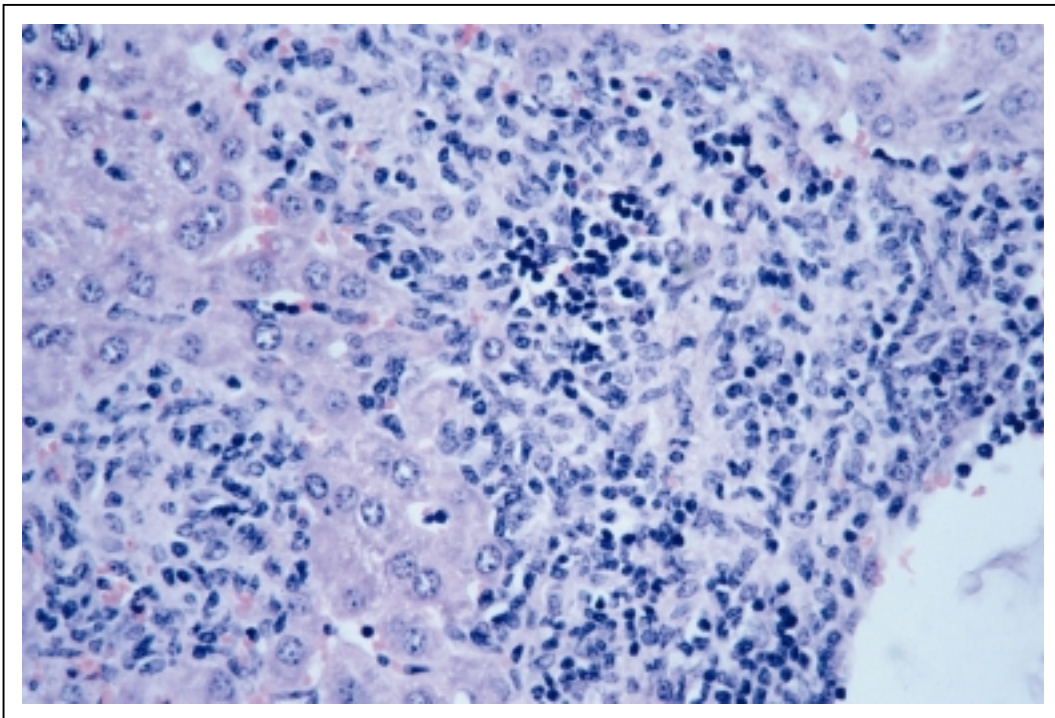


Abbildung 11: Lymphomonozytäre Infiltrate der Leber.
B. henselae-Stamm ATCC, 12 Wochen p.i.. Originalgröße x 400.

3.5.4 Milzhistologie

In den untersuchten Milzen der infizierten Mäuse fanden sich in Hämatoxylin-Eosin gefärbten Organschnitten keine Veränderungen im Vergleich zu den Milzen der Kontrolltiere.

3.6 Humorale Immunantwort

Wie der nachfolgenden Tabelle 5 zu entnehmen ist, wiesen alle untersuchten Mäuse-Seren der drei *B.-h.*-Stämme acht Wochen p.i. für eine *B.-h.*-Infektion signifikante IgG-Antikörpertiter von $\geq 1:256$ im IFT auf. 20 Wochen p.i. ergaben alle Seren der Mäuse, die mit dem *B.-h.*-Stamm B1 oder ATCC #49882 infiziert worden waren, ebenfalls *B.-h.*-spezifische IgG-Antikörpertiter von $\geq 1:256$. Bei zwei von vier Tieren, die mit dem Erregerstamm B2 infiziert wurden, konnte 20 Wochen p.i. keine humorale Immunantwort festgestellt werden, die signifikant für eine *B.-h.*-Infektion gewesen wäre. Die drei bzw. vier Serumproben, die 12 bzw. 16 Wochen p.i. gewonnen wurden, ergaben jedoch auch bei Infektion mit diesem Erregerstamm signifikante *B.-h.*-Antikörpertiter.

Tabelle 5: Humorale Immunantwort von C57BL/6-Mäusen nach intradermaler Infektion mit $5,5 \times 10^5$ KBE *B.h.* *B.-h.*-Antikörpertiter $\geq 1:256$ im Immunfluoreszenztest: +, *B.-h.*-Antikörpertiter $\leq 1:128$: -, keine Untersuchung auf *B.-h.*-Antikörper durchgeführt: /.

Wochen p.i.	Maus	ATCC #49882	B1	B2
8	1	+	+	+
	2	+	+	+
	3	+	+	+
	4	+	+	+
12	1	/	/	+
	2	/	/	+
	3	/	/	+
16	1	/	/	+
	2	/	/	+
	3	/	/	+
	4	/	/	+
20	1	+	+	+
	2	+	+	+
	3	+	+	-
	4	+	+	-