

IV. Diskussion

Der 1990 entdeckte Erreger *B.h.* verursacht die ganz unterschiedlichen Krankheiten Katzenkratzkrankheit, Bazilläre Angiomatose, Bazilläre Peliose und anhaltendes Fieber. Einziger gesicherter Übertragungsweg von *B.h.* auf den Menschen ist nur der durch Katzenkratzer oder -bisse.

Das Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines murinen Tiermodells, in dem durch intradermale Injektion der hauptsächliche Übertragungsweg beim Menschen nachvollzogen wurde, um den natürlichen Verlauf der *B.-h.*-Infektion zu charakterisieren. Es sollte über 20 Wochen verfolgt werden, ob es nach intradermaler Infektion zu einer Persistenz von *B.h.* im murinen Organismus kommt und ob sich eine immunologische Abwehrreaktion entwickelt. Weiterhin sollte untersucht werden, wie sich *B.-h.*-Isolate unterschiedlicher Herkunft hinsichtlich ihres Infektionsverlaufs im murinen Modell unterscheiden. Hierfür wurden drei Gruppen von Versuchsmäusen mit jeweils einem von drei *B.-h.*-Isolaten unterschiedlicher Herkunft infiziert und der Infektionsverlauf verglichen.

4.1 Gewebereaktion der Inokulationsstelle

In der vorliegenden Arbeit wurde makroskopisch zu keinem Untersuchungszeitpunkt eine Läsion an der Eintrittspforte der Erreger entdeckt, obwohl die Tiere anfangs täglich, später mindestens ein Mal pro Woche daraufhin ausgewertet wurden. Hierin unterscheidet sich die lokale Immunreaktion der untersuchten Mäuse von der natürlichen mit *B.h.* infizierter Menschen, denn bei Patienten mit KKK läßt sich in 60-93% eine Läsion an der Inokulationsstelle finden.¹⁵ Bei experimentell mit dem neuentdeckten *B.-h.*-Stamm LSU16 infizierten Katzen beobachteten O'Reilly et al. bei allen neun Tieren innerhalb von 72h eine Schwellung an der Inokulationsstelle, die ihr Maximum nach zwei Wochen erreichte.⁹¹

4.2 Kultureller Nachweis von *B.h.*

In dieser Arbeit gelang die Anzucht von *B.h.* aus den entnommenen Organen ausschließlich am ersten Untersuchungszeitpunkt, d.h. zwei Tage nach intradermaler Injektion von $5,5 \times 10^5$ KBE in die Ballen der Hinterläufe der Mäuse. Es ließen sich einzelne Kulturen aus

Lymphknoten und Milzen von Mäusen gewinnen, die mit den Erregerstämmen B1 oder B2 infiziert waren. Der Erregerstamm ATCC #49822 konnte auch zu diesem Zeitpunkt aus keinem der Tiere angezüchtet werden.

Regnath et al. konnten mit Inokula von $3,5 \times 10^7$ bis 2×10^8 KBE den *B.-h.*-Stamm ATCC #49882 bis einschließlich des fünften bzw. vierten Tages p.i. in Milz- bzw. Lebergewebe nachweisen. Bei einzelnen Tieren gelang sechs Stunden p.i. die Kultur aus Blut und Gehirn. Nieren und Lunge blieben steril.⁹⁸ In den Untersuchungen von Kemper et al. konnten 24 Stunden nach Injektion von 3×10^8 KBE lebende *B.h.* des Stammes ATCC #49822 in Gewebe von nicht genauer genannten Organen nachgewiesen werden, jedoch nicht mehr 48 Stunden p.i. Bei keiner der i.v., s.c., i.p. oder oral mit 10^4 oder 10^6 KBE infizierten Mäuse gelang eine Organkultur aus Milz, Leber, Niere, mesenterialen Lymphknoten oder Blut.⁹⁹

In Studien, die sich mit der Anzucht aus Katzenorganen und -blut beschäftigten, gelang der Nachweis lebender Bakterien wesentlich häufiger und über Zeiträume von bis zu 32 Wochen.^{89, 91, 108}

Vergleicht man die Ergebnisse der vorliegenden Studie mit denen von Regnath et al. und Karem et al., so gelang der Nachweis vermehrungsfähiger Bartonellen mit den gewählten Kulturbedingungen bei geringer konzentrierten Inokula über einen längeren Zeitraum als bei Karem et. al.

Da Regnath et al. die letzten positiven Erregernachweise fünf Tage p.i. durchführten und in der vorliegenden Arbeit die Untersuchungszeitpunkte zwei Tage und zwei Wochen p.i. gewählt wurden, läßt sich nicht sagen, in welchem Modell die Erreger länger in vermehrungsfähiger Form persistieren konnten. Daß die eigenen Bemühungen, Bartonellen des Stammes ATCC #49822 anzuzüchten ebenso wie die von Karem et al.⁹⁹ bei Infektionsdosen $\leq 10^6$ KBE zu keinen positiven Ergebnissen führten, könnte darauf hinweisen, daß sich dieser Stamm schwerer anzüchten läßt, bzw. leichter von den Mäusen eliminiert wird als die Stämme B1 und B2. Aufgrund der geringen Anzahl an positiven Kulturen in dieser Studie und der in der Studie von Karem et al. anders gewählten Inkubationsbedingungen läßt sich allerdings über derartige Unterschiede zwischen den *B.-h.*-Stämmen keine sichere Aussage machen.

Die Beobachtung, daß es bei der Isolierung von *B.h.* aus Mäuseorganen zu ähnlichen Problemen kommt wie beim Menschen, läßt das murine Modell als ein besser geeignetes Modell zur Untersuchung der Kultivierbarkeit von Bartonellen erscheinen als ein felines

Modell. Denn auch beim Menschen gelingt die Isolierung von Bartonellen sehr viel schwerer als bei der Katze.⁴⁵ Die beobachteten Unterschiede der kulturellen Nachweisbarkeit von *B.h.* in Mäusen und Katzen bezogen auf Leber, Milz und Lymphknoten könnten bedeuten, daß die Elimination der Erreger abhängig vom Wirtsorganismus ist, und daß *B.h.* in Katzen über einen längeren Zeitraum in vermehrungsfähiger Form persistieren kann als in Mäusen und Menschen.

In dieser Arbeit wurde weiterhin versucht, *B.h.* aus Mäuseblut anzuzüchten, nachdem es bereits in anderen Studien gelungen war, bei Menschen, Katzen und Nagetieren die intraerythrozytär lebenden Bartonellen kulturell im Blut nachzuweisen.^{3, 4, 85, 108, 109} In der vorliegenden Arbeit konnte *B.h.* bei keiner Maus aus Blut angezüchtet werden. Da es Kosoy et al. mit "lysis-centrifugation tubes" gelang, Bartonellen-Spezies aus dem Blut von infizierten Nagetieren zu isolieren,⁸⁵ sollte für zukünftige Untersuchungen von Mäuseblut besser diese bereits von Slater et al.³ beschriebene Methode der Erythrozytenlyse verwendet werden, als die in der vorliegenden Studie genutzte mechanische Hämolyse. Brenner et al. beobachteten weiterhin, daß die Sensitivität des kulturellen *B.-h.*-Nachweises gesteigert werden konnte, indem das untersuchte Katzenblut zunächst für 26 Tage bei -65°C gelagert wurde, anstatt es sofort nach Entnahme auszuplattieren bzw. zunächst für 24h bei 25°C zu lagern.¹¹⁰ Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob man diese Sensitivitätssteigerung auch bei Mäuseblut nutzen kann. La Scola et al. berichteten, daß es auch bei Menschen nur sehr selten gelingt, *B.h.* aus Blut von Patienten mit KKK zu isolieren.⁴⁵ Bei der Isolierung von *B. quintana*, die sich etwas erfolgreicher aus menschlichem Blut kultivieren ließ, stellten die Autoren außerdem fest, daß ein kultureller Nachweis signifikant häufiger gelang, wenn das Blut nicht direkt auf festes Medium ausplattiert wurde, sondern zunächst in flüssigem Medium inkubiert und erst anschließend auf Agar-Platten subkultiviert wurde.⁴⁵

4.3 Molekularbiologischer Nachweis von *B.h.*

Noch 16 Wochen p.i. konnte in jeder der drei Mäuse-Gruppen, die mit jeweils einem *B.-h.*-Stamm infiziert waren, bei einem Tier in Lymphknoten oder Milz *B.-h.*-DNS nachgewiesen werden. Bei der mit ATCC #49882 infizierten Gruppe gelang der Nachweis von DNS sogar noch in der 20. Woche p.i. Am häufigsten konnte *B.-h.*-DNS in den lokalen Lymphknoten amplifiziert werden. Bei einer geringen Anzahl von Tieren gelang der Nachweis spezifischer

DNS in Leber- und Milzgewebe. Dies sprach ebenso wie die zellulären Veränderungen der Leber und der kulturelle Nachweis in der Milz dafür, daß es bei den Mäusen nach intradermaler Applikation der Bakterien ebenso wie beim Menschen durch den natürlichen Übertragungsweg zur systemischen Infektion kam.

Die positiven PCR-Ergebnisse dieser Arbeit bereits zwei Tage p.i. wiesen ebenso wie die Bakterienkulturen aus der Milz zum gleichen Untersuchungszeitpunkt auf eine sehr rasche Generalisierung hin. Auch Regnath et al. konnten über den beobachteten Zeitraum von drei Monaten *B.-h.*-DNS in murinem Lebergewebe nachweisen.⁹⁸ Karem et al. führten molekularbiologische Erregernachweise in Mäuseorganen nur über einen Zeitraum von einer Woche durch. Schon sechs Stunden p.i. konnten sie *B.h.* in Lebergewebe und mesenterialen Lymphknoten finden. Ebenfalls zu positiven Ergebnissen während der sieben Tage kam es in Milz und Niere. Blut und Knochen waren zu allen Zeitpunkten negativ.⁹⁹ Auch die Ergebnisse von Regnath und Karem ergaben somit eine systemische Infektion von Mäusen durch *B.h.*, allerdings nach i.p.-Infektion.

Der molekularbiologische Erregernachweis wurde in dieser Arbeit mit Hilfe einer semi-nested PCR geführt. Die verwendeten Primer entstammten Veröffentlichungen von Anderson und Mouritsen.^{104, 105, 106} Die genaue Durchführung wurden jedoch z.T. modifiziert, da es so zu höherer DNS-Ausbeute kam. In einer Untersuchung von Avidor et al. war die Sensitivität bei Verwendung der Primer CAT1/CAT2 geringer als bei Citratsynthetase-spezifischen Primern.⁴⁷ In der vorliegenden Arbeit wurde trotzdem mit den Primerpaaren CAT1/CAT2 und CAT2/RH1 gearbeitet, da es in vorbereitenden Experimenten bei Nutzung der Primer zur Amplifizierung des *gltA*-Gens mehrfach zu falsch positiven Ergebnissen gekommen war, wenn Lebern und Milzen von Mäusen, die direkt dem Zuchtstall entstammten, untersucht wurden. Eine Kombination von Amplifizierung der 16S rRNA und Hybridisierung führte bei Avidor et al. zur höchsten Sensitivität.⁴⁷ Diese Methode ist jedoch teurer und zeitaufwendiger als die in der vorliegenden Arbeit verwendete. Auch Sander et al. ermittelten eine höhere Sensitivität bei Vermehrung des 16S rRNA-Gens als bei Vervielfältigung des *htrA*-Gens. Hierbei wurde jedoch nur mit einer einfachen PCR und keiner semi-nested PCR verglichen.¹¹¹ Ebenso wie in der Veröffentlichung von Avidor et al.⁴⁷ und Bergmans et al.¹¹² traten auch in dieser Studie zusätzlich zu den spezifischen Banden weitere DNS-Linien auf, die durch Primer-Komplexe verursacht sein und dadurch zu einer Minderung der Sensitivität geführt haben könnten. Die Nachweisgrenze der angewendeten Methode lag bei 15 KBE pro Ansatz

mit 15µl gelöster DNS. Diese Sensitivität liegt etwas oberhalb der Grenze von 10 KBE pro Ansatz mit 1µl gelöster DNS, die Avidor et al. bei Verwendung der Primer CAT1 und CAT2 herausfanden.⁴⁷

Die noch nach 20 Wochen nachgewiesene *B.-h.*-DNS könnte darauf hinweisen, daß es zu einem längerfristigen Persistieren von *B.h.* im murinen Organismus kommen kann. Der Nachweis von amplifizierter DNS erlaubt jedoch keine Aussage über die Vitalität der Erreger, da auch DNS toter Erreger vervielfältigt wird. Weist man bei negativer Erreger-Kultur spezifische Bakterien-DNS mittels PCR nach, könnte man metabolisch aktive von stoffwechsellinaktiven Erregern unterscheiden, indem man eine "reverse transcription-PCR" (RT-PCR) zum Nachweis von mRNS durchführt.^{113, 114}

Bakterielle mRNS hat nämlich in Abhängigkeit vom Inaktivierungsweg und den anschließenden Umgebungsbedingungen eine Halbwertszeit von einigen Minuten bis wenigen Stunden.^{113, 115} Daher würde der Nachweis bakterien-spezifischer mRNS mehrere Tage oder sogar Wochen nach Infektion der Mäuse für die Persistenz vitaler Erreger sprechen. Bei Verwendung geeigneter mRNS lassen sich mit dieser Methode auch persistierende Erreger, deren Stoffwechselaktivität stark reduziert ist ("dormant bacteria"), nachweisen.^{114, 116}

Da in der vorliegenden Studie besonders mit fortschreitender Infektionsdauer nur wenige Organe von infizierten Tieren positive Ergebnisse der PCR geliefert haben, ist die hier verwendete Methode nicht optimal für weitere molekularbiologische Untersuchungen geeignet. Es müßte die Sensitivität der PCR weiter gesteigert werden, oder es könnte versucht werden, durch höhere Inokula eine bessere Homogenität innerhalb einer Gruppe zu erreichen.

4.4 Zelluläre Immunantwort der poplitealen Lymphknoten

Nahezu 100% aller Patienten mit KKK entwickeln eine regionale Lymphadenopathie als Zeichen der Immunreaktion des lokalen Lymphknotens. Gewöhnlich treten bei Menschen etwa zwei Wochen nach Infektion mit *B.h.* vergrößerte, druckempfindliche Lymphknoten proximal der Inokulationsstelle auf. Die Lymphadenopathie entwickelt sich meistens über zwei bis vier Monate zurück, bei 1-2% der Patienten persistiert sie jedoch für ein bis drei Jahre.¹⁵

In der vorliegenden Arbeit reagierten nahezu alle infizierten Mäuse ebenfalls mit einer lokalen Lymphadenopathie, die sich durch Bestimmung der Lymphknotengewichte

quantifizieren ließ. Wie den im Ergebnisteil gezeigten Abbildungen 4-6 zu entnehmen ist, konnte aufgrund der hohen Inhomogenität der Werte zu einem Untersuchungszeitpunkt keine einheitliche von der Zeit abhängige Gewichtsentwicklung innerhalb einer Gruppe gefunden werden. Es waren deshalb auch keine deutlichen Unterschiede zwischen den drei mit den unterschiedlichen *B.-h.*-Stämmen infizierten Gruppen zu erkennen. Da die extrem hohen Lymphknotengewichte auch mit den ausgeprägtesten histologischen Veränderungen einhergingen, war es nicht möglich, sie als hohe Abweichungen vom Mittelwert aus den Betrachtungen herauszulassen.

Im Vergleich zum typischen Verlauf der Lymphknotenschwellung beim Menschen, bei dem es innerhalb von 8-16 Wochen zu einer Rückbildung der Lymphknoten kommt, bestand bei vielen Mäusen dieser Studie bis zum letzten Untersuchungszeitpunkt (20 Wochen p.i.) ein erhöhtes Lymphknotengewicht. Die regionale Lymphadenopathie hat also bei vielen Tieren über einen längeren Zeitraum als beim Menschen persistiert. Zu beachten ist jedoch, daß die Adenopathie bei Menschen im allgemeinen nur durch äußerlich sichtbare Größenveränderungen gemessen wird, während in diesem Tierversuch die Lymphknoten exakt ausgewogen wurden.

Bisher gab es keine Studie, die sich mit der Histopathologie in Mäuselymphknoten beschäftigte.

Schon nach zwei Tagen stieg das Gewicht der poplitealen Lymphknoten, die der Eintrittspforte der Erreger am nächsten lagen, deutlich an. Zwei Wochen p.i. zeigten die meisten lokalen Lymphknoten der infizierten Tiere eine Größenzunahme und Sekundärfollikel mit Keimzentren. Diese histologischen Veränderungen entsprechen den frühen Gewebeveränderungen, die Naji et al. bereits 1962 in Lymphknoten von Patienten mit KKK entdeckt haben.³⁹ Ab der zweiten Woche p.i. reagierten zusätzlich einige Tiere mit der Bildung von lymphomonozytären Infiltraten in den poplitealen Lymphknoten. Diese Infiltrate lassen sich mit der von Naji et al. beschriebenen granulomatösen Entzündung der Lymphknoten, dem Zwischenstadium der Gewebeveränderungen, vergleichen. Bei einigen Mäuselymphknoten führten die Entzündungsreaktionen zu einer vollständigen Auflösung der normalen Organstruktur. Auch Naji et al. haben beobachtet, daß im Stadium der granulomatösen Entzündung die reguläre Architektur der Lymphknoten zerstört war, subkapsuläre Granulome in diesem Stadium die Organkapsel durchbrachen und es zu Lymphknotenadhäsionen kam. Die Beobachtung, daß viele Tiere mehrere Wochen p.i.

lediglich mit einer geringen Hypertrophie der Lymphknoten oder nur mit der Ausbildung einiger Sekundärfollikel reagierten ohne die Entstehung von lymphomonozytären Infiltraten, korreliert ebenfalls mit den Untersuchungsergebnissen von Naji et al. Dort hieß es, daß sich die veränderten Lymphknoten zwar weiterentwickeln können zur Zwischenphase, daß sie jedoch auch im Stadium der frühen Gewebeveränderung verharren können, um sich anschließend ohne weitere Entwicklung zurückzubilden. In der eigenen Studie zeigten sich große Unterschiede innerhalb einer Mäusegruppe bezüglich des Lymphknotengewichts und der zellulären Immunantwort. Auch Naji et al. beschrieben eine große makroskopische und mikroskopische Variabilität der Lymphknotenläsionen von Fall zu Fall, abhängig vom Untersuchungszeitpunkt und der individuellen Immunantwort.

Bei experimentell infizierten Katzen beobachteten Guptill et al. eine Vergrößerung von peripheren Lymphknoten und die Ausbildung von Sekundärfollikeln mit Keimzentren. Ein Tier bildete acht Wochen p.i. zwei nekrotisierende Granulome in einem Lymphknoten aus.⁸⁹ Auch in Studien von Kordick et al., O'Reilly et al. und Greene et al. wurde über hyperplastische Katzenlymphknoten berichtet, die jedoch nicht histologisch untersucht wurden.^{90, 91, 108}

Aufgrund der beobachteten Parallelen des Infektionsverlaufs in murinen und humanen Lymphknoten eignet sich nicht nur das feline sondern auch das murine Infektionsmodell für die Untersuchung der Funktion der drainierenden Lymphknoten bei der Abwehr von *B.h.*

4.5 Zelluläre Immunantwort in Leber und Milz

Bei 5-14% der Patienten mit KKK verläuft die Erkrankung atypisch.^{14, 17} Bei wenigen dieser Patienten wird eine Beteiligung von Leber und Milz beobachtet, die auch unabhängig von den typischen peripheren Lymphknotenschwellungen oder einer Hautläsion an der Stelle des Erregereintritts vorkommt.^{15, 22, 24, 25} In der Leber tritt charakteristischerweise ein breites Spektrum unterschiedlicher, multipel vorkommender Gewebeveränderungen auf. Die typische Läsion ist ein unregelmäßiger Mikroabszeß, der von einer inneren Schicht palisadenartig angeordneter Histiozyten umgeben ist, gefolgt von einer Schicht Lymphozyten und der nach außen durch fibrotisches Gewebe abgekapselt wird. Außerdem kommt es in sehr unterschiedlichem Ausmaß zur Bildung von nekrotischen Arealen und Riesenzellen.²¹

Auch bei den in dieser Arbeit histologisch untersuchten Mäuselebern kam es ab der zweiten Woche p.i. bei einzelnen Tieren zur Ausbildung lymphomonozytärer Infiltrate. Die Variabilität innerhalb einer Mäusegruppe war sehr hoch. Bei der mit dem *B.-h.*-Stamm B1 infizierten Gruppe reagierten 12 Wochen p.i., im Vergleich zu den anderen Untersuchungszeitpunkten, die meisten Mäuse mit Leberveränderungen. In der mit dem ATCC-Stamm #49882 infizierten Gruppe war die ausgeprägteste Veränderung bereits zwei Wochen p.i. bei einem einzelnen Tier zu entdecken. Jedoch bildeten erst 12 Wochen p.i. alle untersuchten Mäuse Infiltrate in der Leber. Bei der Gruppe, die mit dem *B.-h.*-Stamm B2 infiziert wurde, war die Entzündungsreaktion eines Tieres sechs Wochen p.i. maximal ausgeprägt. Der Untersuchungstermin, an dem die meisten Tiere reagierten, lag bei acht Wochen p.i.

Die Histopathologie von Mäuselebern wurde bereits in der Studie von Regnath et al. untersucht. Dort entwickelten die i.p. infizierten C57BL/6-Mäuse ab dem dritten Tag p.i. einzelne Aggregate von Lymphozyten und Monozyten, die über die nächsten Tage an Zahl und Größe zunahmen. Ab der zweiten Woche beschrieben Regnath et al. die Bildung von lymphomonozytären Infiltraten. Das Maximum der entzündlichen Reaktionen wurde vier Wochen p.i. erreicht. Am Ende des dritten Monats p.i. waren keine entzündlichen Veränderungen mehr zu entdecken. In Regnaths Studie war eine deutliche Abhängigkeit der Infiltrationsdichte und der Variabilität der Reaktionen innerhalb einer Tiergruppe von der verwendeten Inokulationsdosis zu erkennen. Inokula, die weniger als 5×10^6 KBE enthielten, verursachten keine signifikanten Gewebereaktionen.⁹⁸ Im Gegensatz zu dieser Studie konnten in der vorliegenden Arbeit trotz der geringeren Inokulationsdosis von $5,5 \times 10^5$ KBE entzündliche Infiltrate beobachtet werden. Da das Granulom das typische pathomorphologische Substrat einer fokalen chronischen Entzündung ist, die durch intrazellulär vitale Bakterien ausgelöst wird, kann man vermuten, daß bei der i.p. Infektion eine schnellere bzw. effektivere Erregerelimination stattfindet als bei intradermaler Inokulation. Dies entspricht auch den Ergebnissen von Abbott et al., die feststellten, daß es bei Katzen nach intradermaler Infektion mit *B.h.* zu einer höheren Infektionsrate der Tiere kam als bei intraperitonealer Infektion.⁸⁰ In der vorliegenden Studie wurde außerdem über einen längeren Zeitraum als bei Regnath et al., nämlich bis einschließlich 20 Wochen p.i., die Ausbildung von lymphomonozytären Infiltraten beobachtet. Die meisten Mäuse dieser Untersuchung reagierten erst zu späteren Untersuchungszeitpunkten als die in der Arbeit von

Regnath. Der dort festgestellte Einfluß der Infektionsdosis auf die Variabilität der Infiltranzahl innerhalb einer Gruppe kann die Inhomogenität der Ergebnisse der Leber-Histopathologie dieser Untersuchung erklären.

In der Literatur wird nur selten eine Erkrankung der Leber bei Patienten mit KKK beschrieben.^{15, 22} Im Vergleich dazu reagierten die Mäuse dieser beiden Arbeiten relativ häufig mit einer Beteiligung der Leber. Es ist jedoch anzunehmen, daß es auch beim Menschen im Laufe einer KKK gar nicht so selten zu einer entzündlichen Beteiligung der Leber kommt, diese jedoch häufig wegen fehlender oder nur geringfügiger Symptomatik nicht erkannt wird.^{24, 25}

Die untersuchten Milzen der infizierten Mäuse zeigten keine histologischen Veränderungen im Vergleich zu den Milzen der Kontrolltiere und es wurden bei keinem Tier Veränderungen der Leber oder Milz gefunden, die der Histopathologie der BA oder BP entsprochen hätten.

4.6 Humorale Immunantwort

In der vorliegenden Studie wiesen alle untersuchten Seren der drei *B.-h.*-Stämme acht Wochen p.i. einen *B.-h.*-spezifischen IgG-Antikörpertiter auf, der signifikant für eine Infektion war. 20 Wochen p.i. zeigten alle mit B1 oder ATCC #49882 infizierten Tiere hohe IgG-Antikörpertiter gegen *B.h.*, zwei von vier Mäusen, denen der Erregerstamm B2 injiziert wurde, jedoch nicht. 12 und 16 Wochen p.i. ließen sich allerdings in allen untersuchten Seren der mit B2 infizierten Mäuse hohe Antikörper-Titer nachweisen.

Karem et al. konnten dagegen nach einmaliger subkutaner, oraler oder intranasaler Injektion von 10^6 KBE lebender *B.h.* des Stammes ATCC #49882 nur bis 52 Tage p.i. erhöhte Antikörper-Titer nachweisen, nicht mehr 81 Tage p.i. Auch nach subkutaner Gabe von toten Erregern der selben Dosierung kam es zu entsprechender Antikörper-Entstehung.

Das in der vorliegenden Arbeit beschriebene murine Modell ist daher besser geeignet als das von Karem et al. beschriebene, um die Antikörperentstehung langfristig zu untersuchen und bietet diesbezüglich eine gute Alternative zu Katzenmodellen.

4.7 Einfluß der Infektionsdosis

Die Inokulationsdosis wurde bei diesem Versuch dadurch beschränkt, daß sich der Erregerstamm B2 nicht in einer Konzentration anzüchten ließ, die der maximal erreichten der anderen Stämme entsprochen hätte. Möglicherweise hängt dies damit zusammen, daß bei diesem Erregerstamm die Eigenschaft von *B.h.*, Aggregate zu bilden, besonders ausgeprägt ist. Betrachtet man die Arbeit von Guptill et al., in der die histologischen Veränderungen experimentell infizierter Katzen untersucht wurden, so stellt man fest, daß die Katzen, die bereits nach zwei Wochen Nekroseherde der Leber bzw. nach acht Wochen Granulome der Lymphknoten ausbildeten, zwar mit einer Dosis von 10^{10} KBE infiziert wurden; die Katze, die nach vier Wochen einen Leberabszeß und kleine Nekroseherde der Leber ausbildete, hatte jedoch nur ein Inokulum von 10^6 KBE erhalten.⁸⁹ Außerdem zeigte sich jede von Guptill et al. beschriebene zelluläre Immunantwort nur bei einem von vier Tieren einer Gruppe, die Anzahl an beobachteten histopathologischen Veränderungen stieg durch eine höhere Infektionsdosis nicht an. Auffallend war weiterhin, daß die Anzahl der aus dem Blut angezüchteten Kolonien keine deutlichen Unterschiede in Abhängigkeit von der Infektionsdosis zeigte.⁸⁹ Auch bei geringeren Infektionsdosen von $3,6 \times 10^5$ - 1×10^6 KBE, wie sie O'Reilly et al. zur Infektion von Katzen verwendeten, zeigten die Tiere deutliche Krankheitszeichen.⁹¹ Im Vergleich zu den wesentlich größeren und schwereren Katzen erschien die in dieser Arbeit verwendete Infektionsdosis von $5,5 \times 10^5$ KBE pro Maus daher ausreichend hoch. Bei der experimentellen Infektion von Ratten mit *Bartonella*-Spezies entwickelten sogar die mit der geringen Dosis von 10^3 KBE infizierten Tiere eine höhere und länger anhaltende Bakteriämie als die Tiere, denen 10^7 KBE injiziert wurden.¹¹⁷ Es ist daher nicht sicher davon auszugehen, daß höhere Inokula zu einer höheren Manifestationsrate geführt hätten. Trotzdem wäre eine Studie mit einem ähnlichen Aufbau wie in der vorliegenden Arbeit, jedoch mit höherer Konzentration der *B.-h.*-Stämme, interessant.

4.8 Einfluß von Spezies, Geschlecht, Alter und Immunstatus der Mäuse

Möglicherweise hätte die Arbeit mit einem anderen Maus-Stamm zu anderen Reaktionen geführt.¹⁰⁷ Regnath et al. konnten jedoch bei Durchführung ihrer Experimente mit Balb/c

Mäusen über einen Zeitraum von zehn Tagen keinen wesentlichen Unterschied im Infektionsverlauf feststellen.⁹⁸

Es wäre auch interessant zu prüfen, ob männliche Tiere des Stammes C57BL/6 eine andere Empfindlichkeit gegenüber *B.h.* aufweisen.¹⁰⁷ Beim Menschen tritt die KKK jedoch weitgehend geschlechtsunabhängig auf.^{11, 17, 28} Da an der KKK häufig Kinder erkranken und auch bei Haus- und Raubkatzen vor allem die Jungtiere bakteriämisch sind, wäre ein murines Tiermodell mit Mäusen, die jünger als 9 Wochen alt sind, eine weitere sinnvolle Ergänzung zu dieser Arbeit.

Es ist noch ungeklärt, ob es bei Menschen im Anschluß an eine KKK oder eine inapparente *B.-h.*-Infektion zur Persistenz der Erreger im Organismus kommt. In dem vorliegenden murinen Infektionsmodell sprachen die Ausbildung der lymphomonozytären Infiltrate der poplitealen Lymphknoten und der Leber ebenso wie die Bakterienisolate aus der Milz dafür, daß *B.h.* in vitalem Zustand in die Organe gelangte. Durch Immunsuppression bereits infizierter Tiere bzw. die Infektion von immunsupprimierten Mäusen könnten der Einfluß des Immunstatus auf die Ausprägung von KKK- oder BA- bzw. BP-ähnlichen Symptomen untersucht werden. So könnte die Frage geklärt werden, ob die fast ausschließlich bei Immunsupprimierten auftretenden Erkrankungen BA und BP durch Reaktivierung einer bereits seit längerer Zeit persistierenden, generalisierten *B.-h.*-Infektion entstehen oder durch eine frische *B.-h.*-Infektion in abwehrgeschwächtem Zustand. Auch Infektionen mit anderen Bakterien wie z.B. *Mycobacterium leprae* können sehr unterschiedliche Verläufe abhängig vom Grad der zellulären Immunantwort des Infizierten zeigen. Es scheint jedoch noch weitere, zur Zeit unbekannte Faktoren zu geben, die die klinische Erscheinung und Pathologie ein *B.-h.*-Infektion beeinflussen, da BA auch bei einigen immunkompetenten Patienten beschrieben wurde.^{60, 62}

4.9 Einfluß des Erregerstammes auf den Infektionsverlauf

In den letzten Jahren beschäftigten sich mehrere Forscher mit der Stammvielfalt von *B.h.*^{91, 95, 96, 97, 98, 118, 119} Dennoch bleibt weiterhin unklar, ob die unterschiedlichen Krankheiten, die durch *B.h.* verursacht werden, auf unterschiedlich virulente Stämme des Erregers zurückzuführen sind. In Experimenten mit Katzen ergaben sich inzwischen deutliche Hinweise, daß es Unterschiede in der Virulenz zwischen den Stämmen gibt. In einer Studie

von O'Reilly et al. reagierten Katzen nach Injektion eines neu entdeckten *B.-h.*-Stammes mit zuvor noch nie bei Tieren nach *B.-h.*-Infektion beschriebenen Krankheitszeichen.⁹¹ Es ist daher wichtig, bei Studien der Pathogenese von *B.h.*, den jeweils verwendeten Stamm zu charakterisieren.

Einer der in dieser Studie verwendeten Erregerstämme stammte aus der *American Type Culture Collection* und wurde ursprünglich aus dem Blut eines HIV-positiven Patienten mit Fieber angezüchtet. Die anderen beiden *B.-h.*-Stämme wurden im Haus aus einer Läsion eines HIV-positiven Patienten mit BA bzw. aus einer bakteriämischen Katze eines Patienten mit KKK isoliert.¹⁰⁰ Die vorliegende Arbeit war so aufgebaut, daß drei gleichartige Mäusegruppen mit jeweils einem *B.-h.*-Stamm infiziert und untereinander sowie mit einer Kontrollgruppe verglichen wurden. Um verfälschende Einflüsse auszuschließen, wurden alle Tiere am gleichen Tag infiziert und im folgenden zu den gleichen Zeitpunkten untersucht. Ein Vergleich des Infektionsverlaufs in Abhängigkeit vom injizierten Erregerstamm war jedoch, aufgrund der hohen Variabilität der Reaktionen innerhalb einer Gruppe, kaum möglich.

Für weitere Untersuchungen der Unterschiede von *B.-h.*-Stämmen im Maus-Modell wäre der Einsatz kürzlich in anderen Studien beschriebener, auffallender *B.-h.*-Stämme wie z.B. LSU16 sinnvoll.^{91,92}

Aufgrund der hohen Variabilität innerhalb einer Tiergruppe kann für diese Arbeit nur festgestellt werden, daß sich der Erregerstamm B2 von den anderen beiden *B.-h.*-Stämmen durch eine geringere maximale Erregerkonzentration in Nährbouillon bei identischen Wachstumsbedingungen auszeichnete. Bei allen weiteren durchgeführten Untersuchungen überwogen die Unterschiede innerhalb einer Gruppe gegenüber denen zwischen den drei verglichenen Gruppen. Die vorliegende Studie ergab daher keinen eindeutigen Hinweis, daß zwischen den beobachteten *B.-h.*-Stämmen ein Virulenzunterschied besteht, der bei C57BL/6-Mäusen zu unterschiedlichem Infektionsverlauf führt.

4.10 Schlußfolgerung

Nach experimenteller Infektion von C57BL/6-Mäusen mit $5,5 \times 10^5$ KBE der *B.-h.*-Stämme ATCC #49882, B1 und B2 ließen sich unabhängig vom verwendeten Erreger-Stamm lokale und systemische Immunreaktionen über den gesamten Untersuchungszeitraum von 20 Wochen feststellen. Es kam zur lokalen Lymphadenopathie und zur Bildung

lymphomonozytärer Infiltrate in Lymphknoten und Leber und von *B.-h.*-spezifischen IgG-Antikörpern im Blut. Weiterhin ergaben sich durch kulturellen und molekularbiologischen Erregernachweis Hinweise für die Persistenz von *B.h.* im murinen Organismus. Diese Ergebnisse zeigen, daß mit der hier vorliegenden Arbeit ein murines Tiermodell der Katzenkratzkrankheit etabliert werden konnte, mit dessen Hilfe vielfältige Untersuchungen durchgeführt werden können, um weitere Erkenntnisse über den Verlauf von *B.-h.*-Infektionen zu erlangen.

Ein Einfluß des verwendeten *B.-h.*-Stammes auf den Infektionsverlauf konnte nicht festgestellt werden.