

Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
aus dem Institut für Infektionsmedizin
Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Infektionsimmunologie
Abteilungsleiter: Prof. Dr. Dr. Ulf B. Göbel

**Prävalenz und molekulare Epidemiologie
der *Bartonella henselae*-Infektion bei Katzen in Berlin**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
Charité Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von Alexander Klose
aus Krefeld

Referent: Prof. Dr. med. M. Arvand

Koreferent: Prof. Dr. H.-G. Holzhütter

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 20.11.2009

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1.	Erreger und Krankheitsbild	5
1.2.	Taxonomie	6
1.3.	Infektion mit <i>Bartonella species</i>	7
1.3.1.	Epidemiologie	7
1.3.2.	Infektion bei Katzen	7
1.3.3.	Infektion beim Menschen	8
1.3.3.1	<i>B. henselae</i> -Infektion bei immunkompetenten Individuen	8
1.3.3.2	<i>B. henselae</i> -Infektion bei Immunkompromittierten Individuen	9
1.4.	Diagnostik der Bartonellen-Infektion	9
1.4.1.	Histologie	10
1.4.2.	Anzucht	10
1.4.3.	Serologie	11
1.4.4.	PCR	11
1.5.	Pathogenität und Typisierung	11
1.6.	Therapie der Bartonellen-Infektion	12
1.7.	Fragestellung der Arbeit	13
2.	Material und Methoden	14
2.1.	Materialverzeichnis	14
2.1.1.	Technische Geräte	14
2.1.2.	Lösungen	14
2.1.3.	Puffer	14
2.1.4.	Reagenzien und Enzyme	14
2.1.5.	Testkits und Materialien	15
2.1.6.	Referenzstämme	15
2.1.7.	Feste Nährmedien	15
2.1.8.	Flüssige Nährmedien	15
2.2.	Methoden	16
2.2.1.	Überprüfung der Anzuchtmethodik	16
2.2.2.	Ermittlung der Nachweisgrenze der verwendeten Anzuchtmedien	16
2.2.3.	Auswirkung des Isolator 1.5-Röhrchens	18
2.2.4.	Anreicherungskinetik der Flüssigmedien	18
2.3.	Anzucht von <i>B. henselae</i> aus Katzenblutproben	19
2.3.1.	Hauskatzen	19
2.3.2.	Streunende Katzen	19
2.3.3.	Probengewinnung	20
2.3.4.	Probenverarbeitung	20
2.4.	Identifizierung der Isolate und Ausschlusskriterien	21
2.4.1.	Makroskopische Identifizierung	23
2.4.2.	Grampräparat	23
2.4.3.	Katalase- bzw. Oxidasetestung	23
2.4.4.	Biochemische Leistungsprüfung	23
2.4.5.	Immunfluoreszenztest	24
2.4.6	Sequenzierung des 16S rRNA-Gens	25
2.5.	Molekulare Typisierung mit Pulsed-field-Gel-Elektrophorese (PFGE)	25
2.5.1.	Durchführung der PFGE	26

2.6.	Statistische Begriffe und Methoden	28
2.6.1.	Relatives Risiko	28
2.6.2.	Ergebnisinterpretation	29
2.6.3.	Statistisch signifikantes Risiko	30
2.6.4.	Stichprobenumfang	30
3.	Ergebnisse	31
3.1.	Überprüfung der Anzuchtmethodik	31
3.1.1.	Nachweisgrenzen bei festen und flüssigen Medien	31
3.1.2.	Anreicherungseffekt durch flüssige Medien	32
3.1.3.	Auswirkungen des Isolator 1.5-Röhrchens	33
3.2.	Prävalenz der <i>B. henselae</i> -Bakteriämie	34
3.2.1.	Risikofaktoren bei Haus- und streunenden Katzen	35
3.2.2.	Kulturergebnisse	36
3.2.3.	Sensitivität der Kulturmedien	38
3.2.4.	Biochemische Leistungsprüfung	38
3.2.5.	Sequenzierung des 16S rRNA-Gens	39
3.2.6.	Typisierung mit PFGE	40
4.	Diskussion	42
4.1.	Vergleich der Kulturmedien	43
4.2.	Prävalenzvergleich – Einflußgrößen	43
4.3.	Risikofaktoren für die Bartonellen-Infektion bei Katzen	43
4.3.1.	Risikofaktor Alter	44
4.3.2.	Risikofaktor Flohbefall	44
4.4.	Typisierung der <i>B. henselae</i> -Isolate	45
5.	Zusammenfassung	46
6.	Literatur	47
7.	Anhang	54
7.1.	Publikation	54
7.2.	Abkürzungen	54
7.3.	Lebenslauf	55
7.4.	Eidesstattliche Erklärung	56
7.5.	Danksagung	57

1. Einleitung

1.1. Erreger und Krankheitsbild

Bartonellen sind gramnegative, fakultativ intrazelluläre Bakterien, die sich in der Primärkultur deutlich langsamer und schwieriger als viele andere Erreger anzüchten lassen und deswegen lange Zeit bei mikrobiologischen Untersuchungen übersehen wurden. Der Vertreter aus der Familie der Bartonellen, den diese Arbeit hauptsächlich untersucht, *Bartonella henselae*, wurde erstmalig 1990 beschrieben, als der Arbeitsgruppe um Relman unter Zuhilfenahme molekularbiologischer Methoden die Identifizierung eines bis dahin unbekanntes Erregers gelang (1). *B. henselae* ist der Erreger der Katzenkratzkrankheit (Cat Scratch Disease, CSD) und ist besonders im Zusammenhang mit AIDS als Ursache von rezidivierenden Bakteriämien und der bazillären Angiomatose (BA) in Erscheinung getreten (2-4). Die Geschichte von *B. henselae* begann jedoch weitaus früher, nämlich bereits 1891, als Parinaud das Auftreten eines „Oculoglandulären Syndroms“ - einer Konjunktivitis mit präaurikulärer Lymphknotenschwellung - nach Tierkontakt beschrieb (10). Debre verfolgte von 1931-1950 bei Patienten, die über enge Katzenkontakte berichteten, das syndromhafte Auftreten von scheinbar sterilen Lymphknotenschwellungen und Fieber. Er publizierte seine Beobachtungen unter dem Titel `La maladie de griffes de chat´ (die Katzenkratzkrankheit) (79). 1983 gelang es Wear und Mitarbeitern den Erreger der CSD mikroskopisch darzustellen (11). Zur gleichen Zeit beschrieben Stoler et al. erstmals die bazilläre Angiomatose, eine gutartige Wucherung von Gefäßgewebe bei HIV-infizierten Patienten (12). Im Zuge der steigenden Verbreitung von AIDS erhielt BA zunehmend Bedeutung, da die BA klinisch schwer vom AIDS-definierenden Kaposi-Sarkom zu unterscheiden ist. Die Arbeitsgruppe um Koehler beschrieb bei HIV-Patienten das gleichzeitige Auftreten von BA und disseminierten CSD-Verläufen (13). 1990 identifizierte Relman den Erreger der BA, der Ähnlichkeiten mit *Rochalimaea quintana*, dem Erreger des Schützengrabenfiebers aufwies (1). Von 1991 an bestätigten viele unabhängige Untersuchungen, dass dieser bis dato unbekanntes Erreger sowohl BA, Bakteriämien, Fieber, als auch viele weitere Krankheitsbilder auszulösen vermag (2,3,14). Nach einem Vorschlag von Regnery et al. etablierte sich die Bezeichnung *Rochalimaea henselae* (14). Bald darauf wurde durch serologische und molekularbiologische Untersuchungen nachgewiesen, dass *Rochalimaea henselae*, bisher als Erreger der BA in Erscheinung getreten, identisch mit dem Erreger der CSD ist (15). Ab 1993 wurde statt *Rochalimaea henselae* die Bezeichnung *Bartonella henselae* üblich. Nach 1990 wurde eine Vielzahl weiterer verwandter Bartonellenspezies entdeckt: *Bartonella elizabethae* wurde 1993 als Erreger von Endokarditis identifiziert. *Bartonella clarridgeiae*, erstmalig 1996 identifiziert, wird mit CSD in Zusammenhang gebracht (7-9). *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* sowie *Bartonella grahamii* sind erst unlängst als Erreger von Endokarditis bzw. Neuroretinitis identifiziert worden (83,94). Andere Mitglieder der Familie der Bartonellen waren schon weitaus länger als Krankheitserreger bekannt; *Bartonella bacilliformis*, der Erreger des Oroya-Fiebers und der Verruga peruana, wurde bereits um 1950 beschrieben (101).

Bartonella quintana ist von besonderer Bedeutung als Erreger des Fünf-Tage-Fiebers (Schützengrabenfieber) im ersten Weltkrieg gewesen (102) und wird heute sowohl mit BA bei Immunkompromittierten in Zusammenhang gebracht (5,6), als auch als Erreger von Endokarditis bei Obdachlosen und Alkoholabhängigen gefunden (80,81).

Tab. 1.1. *Bartonella* spp.

Wichtigste humanpathogenen Bartonella Arten mit den durch sie verursachten Krankheitsbildern, sowie Bartonella Arten, die bei Menschen bisher nicht als Krankheitserreger beschrieben wurden.

Humanpathogene Bartonellenspezies (ausgelöste Krankheit)	Avirulente Bartonellenspezies
<i>B. quintana</i> (Schützengr.-fieber, Endokarditis, BA, BPH)	<i>B. doshiae</i>
<i>B. bacilliformis</i> (Oroya-Fieber, Verruga peruana)	<i>B. talpae</i>
<i>B. henselae</i> (CSD, BA, BPH, Endokarditis)	<i>B. vinsonii</i>
<i>B. elizabethae</i> (Endokarditis)	<i>B. taylorii</i>
<i>B. clarridgeiae</i> (CSD)	
<i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i> (Endokarditis)	
<i>B. grahamii</i> (Neuroretinitis)	

1.2. Taxonomie

Bartonellen gehören zur Familie *Bartonellaceae* (18) in der alpha 2-Untergruppe der Eubakterien. Bartonellen sind gramnegative, mit wenigen Ausnahmen unbewegliche, aerob wachsende Stäbchen, die fakultativ intrazellulär leben (19). In früheren Publikationen findet sich insbesondere *B. henselae* noch unter dem Namen *Rochalimaea henselae* (14). Zusammen mit *Rochalimaea quintana* und *Bartonella bacilliformis* wurde *R. henselae* der Ordnung der Rickettsiales zugeordnet. 1993 wurden die Gattungen *Rochalimaea* und *Bartonella* zu einem Genus zusammengefaßt und gleichzeitig aus der Familie der Rickettsien, die obligat intrazelluläre Krankheitserreger sind, ausgegliedert (18).

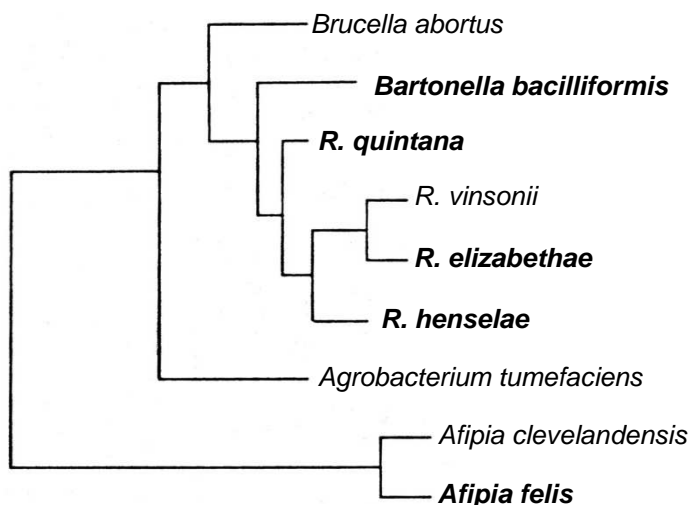


Abb. 1.2. Verwandtschaftsverhältnisse der *Bartonella* spp. (nach Adal et al.)

In dem Dendrogramm, das anhand der 16S rRNA-Gensequenzen erstellt wurde sind die Verwandtschaftsverhältnisse von verschiedenen *Bartonella* Arten dargestellt.

1.3. Infektion mit *Bartonella species*

1.3.1. Epidemiologie

Seitdem der Erreger und die Krankheitsbilder, die er hervorruft, bekannt sind, und die diagnostischen Möglichkeiten deutlich verbessert wurden, sind stetig mehr Fälle von *B. henselae*-Infektionen registriert worden (30,35,36). Infektionen mit *Bartonella* Arten kommen weltweit vor (7,23,29,37-44). Im Falle der CSD als häufigster Manifestationsform der *B. henselae*-Infektion, wurden 1992 22.000 Infektionsfälle in den USA ermittelt (45). Seroprävalenzen der *B. henselae*-Infektion sind oft größer als die Erkrankungsprävalenz im selben Gebiet, da gerade die CSD bei immungesunden Individuen oft unbemerkt abläuft und meist spontan abheilt. Es werden jedoch auch im Laufe der inapparenten Infektion Antikörper gebildet (serologische Narbe). Der entstehende Summationseffekt lässt die Seroprävalenz höher als die Prävalenz der apparenten Erkrankung ausfallen (39,62,75,76). Epidemiologische Daten zum prozentualen Vorkommen des Erregers in der Katzenpopulation, aber auch zur Inzidenz der *B. henselae*-Infektion beim Menschen, standen für Berlin zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit im Jahr 1998 nicht zur Verfügung. Referenzangaben waren 1998 für Deutschland nur aus Freiburg und als grob orientierende Seroprävalenzen auch für Norddeutschland verfügbar (34,46)

1.3.2. Infektion bei Katzen

Die Bartonellen-Infektion ist in der Regel eine Anthroozoonose. Katzen sind das Hauptreservoir für *B. henselae* (4,7,20-24). Jüngere Studien weisen für neu entdeckte *Bartonella* Arten eine Vielzahl von anderen Tieren als Reservoir nach (25,26, 95-98). Die Übertragung von *B. henselae* zwischen den Katzen erfolgt über den Katzenfloh (*Ctenocephalides felis*) (33). Infizierte Katzen sind bis auf seltene Ausnahmen asymptomatisch. Der Erreger findet sich im Blut der Katze, aus dem er angezüchtet werden kann (34). Zu den Risikofaktoren für die *Bartonella henselae*-Infektion zählt, das Alter der Katze (23,27,34,37). Höchste Prävalenzen von *B. henselae*-Bakteriämien bei Katzen wurden bei Tieren unter zwei Jahren gefunden (7,23). Ein weiterer Risikofaktor für die Katze liegt im Flohbefall des Tieres, da der Erreger zwischen den Tieren ausschließlich über den Katzenfloh übertragen wird (33). Das Klima gilt als gesicherter Einflussfaktor, da Flohbefall und Durchschnittstemperaturen gleichsinnig korrelieren (42). Ebenso wird Flohbefall bei Hauskatzen seltener als bei streunenden Tieren angetroffen, was auf bessere Pflege zurückzuführen sein dürfte.

1.3.3. Infektion bei Menschen

B. henselae wird durch Läsionen (Biss- oder Kratzverletzungen) auf den Menschen übertragen (22,27-29). Allerdings sind auch atraumatische Infektionen beschrieben worden (7,30). Als weitere Übertragungswege für die *B. henselae*-Infektion sind Arthropodenstiche (z.B. durch Zecken und Flöhe) diskutiert worden (3,31,32,93), wie sie schon von anderen Bartonella Arten bekannt sind. So ist z.B. die Kleiderlaus (*Pediculus humanus*) der Vektor für *B. quintana* (1), und *B. bacilliformis* wird durch die Sandmücke (*Lutzomyia verrucarum*) übertragen (84). Als Risikofaktor für eine Infektion mit *B. henselae* gilt das Lebensalter, da Kinder unter zehn Jahren deutlich häufiger erkranken als andere Gruppen (27, 29). Als ursächlich kann hier die höhere Risikoexposition für Kratzläsionen z.B. beim Spiel mit einem befallenen Tier gelten. Saisonale Häufungen der Infektion werden für die Herbst- und Wintermonate beschrieben (29,35). Die Erregerausbreitung erfolgt durch Vermehrung des Erregers an der Eintrittspforte (Primärläsion) und Befall der regionalen Lymphknoten (19). Entweder wird die Infektion durch die körpereigene Abwehr limitiert, oder es kommt zur Ausbreitung der Infektion mit disseminiertem Organbefall (22,49). Das Spektrum von Symptomen reicht von regionaler Lymphadenopathie bei CSD, die oft folgenlos abheilt, bis hin zu disseminierten Verläufen mit Befall mehrerer Organe (48). Die Schwere der Symptome scheint mit dem Immunstatus des Patienten zu korrelieren (19,49). Im Folgenden wird deshalb zwischen Verläufen bei immungesunden und immunkompromittierten Individuen unterschieden.

1.3.3.1. *B. henselae*-Infektion bei immunkompetenten Individuen

Die Hauptmanifestationsart der *B. henselae*-Infektion bei Immungesunden ist die Katzenkratzkrankheit (CSD). An der Eintrittsstelle entsteht nach ca. einer Woche eine erythematöse Papel, der neben Allgemeinsymptomen wie Fieber und Übelkeit, eine regionale granulomatöse Lymphadenitis für Wochen folgen kann (22). Eine seltenere Manifestationsform der CSD ist das Oculoglanduläre Syndrom, das bereits von Parinaud 1891 beschrieben wurde: eine granulomatöse Läsion mit palpebraler Konjunktivitis und präaurikulärer Lymphknotenschwellung (10,27,35). Zu den mit 0,4% seltenen Verlaufsformen der *B. henselae*-Infektion zählt neben der Neuroretinitis mit ödematöser Schwellung des Fundus, makulärem Stern und Visusminderung (35) auch die Thrombozytopenische Purpura (27). Prolongierte Krankheitsverläufe mit Fieber, Bewusstseinsverlust und Krämpfen, bzw. Enzephalitis, werden hauptsächlich bei Kindern angetroffen (51,52). Seltene Manifestationen der *B. henselae*-Infektion bei immunkompetenten Patienten sind Endokarditis (30,53) und granulomatöse Hepatitis (54). Auch bei immungesunden Patienten können disseminierte Infektionen angetroffen werden. Manifestationen der generalisierten Aussaat zeigen sich in multiplen Absiedlungen der Erreger. Laborchemisch zeigen sich unspezifische Veränderungen. Die Entzündungsparameter sind nicht notwendigerweise angestiegen, Transaminasen und Bilirubin allenfalls milde erhöht. Befall der Haut imponiert als typische knötchenförmige Gefäßläsionen (BA), die Milz zeigt herdförmige Abszedierung und konsekutive Milzschwellung. Neben dem Anschwellen von

abdominalen Lymphknoten kann es auch zu Knochenabsiedlungen mit osteomyelitischen Veränderungen kommen (86-88).

1.3.3.2. *B. henselae*-Infektion bei immunkompromittierten Individuen

Bei immunkompromittierten Patienten zeigt sich im Rahmen der geschwächten Abwehrlage oft ein Wochen bis Monate anhaltender Symptomenkomplex aus rezidivierenden Fieberschüben mit allgemeinem Krankheitsgefühl. Die Fieberschübe werden häufig durch Bakteriämien ausgelöst (3,31,36). Eine andere Manifestation der disseminierten Infektion kann die bazilläre Angiomatose (BA) sein, die sich in kutanen bzw. subkutanen Läsionen zeigt (55). Die Läsionen lassen differentialdiagnostisch an das Kaposi-Sarkom denken. Allgemeinsymptome wie Fieber, Übelkeit, Kopfschmerz, Appetit- und Gewichtsverlust sind oft mit der BA vergesellschaftet. Extrakutane Manifestationen bei schwerer Abwehrschwäche zeigen sich in multiplem Organbefall und mukokutanen Läsionen (36,56-58). Die bazilläre Peliosis hepatis (BPH) kann man als „viszerale“ BA auffassen (55). Klinisch imponiert die BPH mit Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe und abdominalen Schmerzen sowie Erhöhung von Leberenzymwerten (36). Im Rahmen der generalisierten Infektion kann im Wesentlichen jedes Organsystem betroffen werden; beschrieben wurden u.a. nekrotisierende Granulome in Leber und Milz (3,88), cerebrale Abszedierung und Meningitis (35,89).

1.4. Diagnostik der Bartonellen-Infektion

Früher wurde die Diagnose einer Bartonelleninfektion, die im Wesentlichen in Form der CSD bekannt war, klinisch gestellt (27), wenn bei einem Patienten mit chronischer Lymphadenitis mindestens drei der folgenden vier Kriterien erfüllt wurden:

1. Vorhandensein einer Primärläsion und anamnestischer Hinweis auf Katzenkontakt,
2. Ausschluß anderer Erreger, die eine Lymphadenopathie verursachen können (EBV; HIV; CMV, Mykobakterien, *Toxoplasma gondii* u.a.),
3. positiver Intrakutantest (CSD-Hauttest)
4. histologischer Nachweis granulomatöser Läsionen, ggfs. mit Nachweis von kleinen pleomorphen Stäbchen mittels Warthin-Starry-Färbung.

Heute stehen zusätzliche diagnostische Möglichkeiten zum spezifischen Nachweis des Erregers zur Verfügung. Je nach klinischer Manifestationsart und Immunitätslage des Patienten können unterschiedliche diagnostische Verfahren eingesetzt werden.

Tab. 1.4. Diagnostik der *B. henselae*-Infektion

Es werden die unterschiedlichen Verfahren der Bartonellendiagnostik und ihre klinischen Einsatzmöglichkeiten gezeigt.

Verfahren	Einsatzmöglichkeit
Histologische Untersuchung der Gewebeprobe mit mikroskopischem Nachweis des Erregers	CSD, BA, BPH, Endokarditis
Anzucht aus Blutkultur bzw. Lymphknotenaspirat	CSD, BA, BPH, Bakteriämie
Nachweis von <i>B. henselae</i> -DNA mittels PCR aus Blut oder Gewebeproben	CSD, BA, BPH, Neuroretinitis, Meningitis
Antikörpernachweis im Serum	CSD, Endokarditis, BA, BPH

1.4.1. Histologie

Histopathologisch zeigt sich die Bartonellen-Infektion z.B. bei CSD in den betroffenen Lymphknoten durch eine folliculäre lymphoide Hyperplasie mit Riesenzellen (19,35,36). Läsionen variieren von Mikroabszessen bis zu verkäsenden Granulomen. Die Spezifität der Histopathologie ist jedoch gering, da auch andere Erreger, z.B. Mykobakterien, granulomatöse Läsionen verursachen können. Mit der Warthin-Starry-Färbung können Bartonellen als pleomorphe Stäbchen gut dargestellt werden, allerdings ist die Färbung unspezifisch und kann ebenfalls andere Bakterienarten erfassen. Bei anderen klinischen Manifestationen, wie z.B. BA bzw. BPH fallen histopathologisch lobuläre Endothelzellproliferationen, subendotheliale Ansammlungen von Erregern und neutrophile Infiltrate bzw. ein granulozytäres Infiltrat im Lebergewebe mit blutgefüllt-dilatierten Kapillaren und ödematösem Stroma auf (5,13,54).

1.4.2. Anzucht

Die Anzucht ist für die klinische Diagnostik weniger gut geeignet, da die Kultur von *Bartonella spp.* erheblich länger dauert, als die Anzucht der meisten anderen klinisch relevanten Erreger, wie z.B. Staphylokokken. Für Primärisolate sollten Kulturzeiten von bis zu 12 Wochen kalkuliert werden. Darüber hinaus erweisen sich Bartonellen als empfindliche und anspruchsvolle Erreger, deren Anzucht besondere Bedingungen wie erhöhte CO₂-Spannung und nährstoffangereicherte Medien erfordert (3,14,19,100). Blutentnahmesysteme in denen Blut hämolysiert und mögliche intrazelluläre Erreger freigesetzt werden, verbessern das Anzuchtergebnis (61). Ebenso führt das Tieffrieren der erregerehaltigen Probe auf unter -70°C zur Erythrozytolyse mit konsekutiv größeren Erregerzahlen nach dem Auftauen (61,100).

1.4.3. Serologie

Die Serologie ist ein bevorzugtes diagnostisches Verfahren, da es wenig invasiv ist. Antikörper gegen *B. henselae* können mit dem Immunfluoreszenztest (IFT), oder Enzymimmunoassay (Elisa) detektiert werden. Der IFT ist wegen seiner kommerziellen Verfügbarkeit und vergleichsweise einfachen Handhabung bisher am weitesten verbreitet. Hier gelten in der Regel Titer von > 64 für IgG als erhöht (15,19,62).

1.4.4. PCR

Mit Hilfe der PCR kann man *Bartonella*-spezifische DNA in Gewebeproben nachweisen, z.B. in einem befallenen Lymphknoten oder in dem papulösen Hautareal, das die Primärläsion bei CSD darstellt (1,59,60). Die verhältnismäßig geringen DNA-Mengen werden mit Hilfe der PCR amplifiziert. Durch Verwendung von spezifischen Primern kann *Bartonella*-DNA spezifisch in der Probe nachgewiesen werden. Bei Verwendung von unspezifischen Primern, wie z.B. Eubakterien-Primern, wird jegliche in der Probe vorhandene DNA amplifiziert, ungeachtet der Herkunft. Der Nachweis von *Bartonella spp.* muss dann durch Sequenzierung der amplifizierten DNA erfolgen.

1.5. Pathogenität und Typisierung

Durch Einsatz von molekularen Typisierungsmethoden konnten unterschiedliche *B. henselae*-Varianten identifiziert werden. Bei Untersuchungen in den Niederlanden konnten Bergmans et al. durch 16S rRNA-Sequenzierung zwei verschiedene Typen von *B. henselae* beschreiben (7,63). Während Typ I zu 75% in Gewebeproben von CSD-Patienten nachgewiesen werden konnte, waren nur 28% der untersuchten Katzen mit Typ I infiziert. Diese Daten deuten daraufhin, dass Typ I virulenter ist als Typ II. Auch bei Untersuchungen von Katzen in Freiburg konnten mittels 16S rRNA-Sequenzierung diese zwei verschiedenen Typen nachgewiesen werden, von denen Typ I dem Stamm Houston-1 entsprach, der in Houston/USA von einem HIV-Patienten isoliert werden konnte (34,71). Die Mehrzahl der felines Isolate jedoch entsprach Typ II (34).

Eine weitere Typisierungsmethode ist die Analyse der Makrorestriktionsmuster der genomischen DNA mit Hilfe der Pulsed-field-Gelelektrophorese (PFGE). Sander et al. sowie andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die PFGE unter den verschiedenen molekularbiologischen Methoden zur Typisierung von *B. henselae* am besten geeignet ist (71,72,90,91). Mit Hilfe der PFGE konnte gezeigt werden, dass Houston-1 genetisch identisch ist mit Berlin-1, einem Stamm, der von einem Berliner HIV-Patienten isoliert werden konnte (17). Ebenso konnte durch die PFGE nachgewiesen werden, dass Berlin-2, ein *B. henselae*-Isolat von der Katze eines CSD-Patienten aus Berlin einem anderen Stamm als Berlin-1 entspricht (17).

1.6. Therapie der Bartonellen-Infektion

In vitro zeigen Bartonellen in der Regel gute Empfindlichkeit für Beta-Lactam-Antibiotika, Tetrazykline, Gyrasehemmer, Makrolide, Aminoglykoside und Chloramphenicol (5,17,65). Die in vitro-Empfindlichkeit korreliert jedoch nicht mit klinischen Beobachtungen (13,66). Als Therapie bei einem möglicherweise intrazellulär vorliegenden Erreger, bieten sich Tetrazykline oder Makrolide an, die gut auf intrazelluläre Erreger wirken. Chinolone gelten nicht als Therapeutika der ersten Wahl (31,67,77). Es gibt bei der Therapie der Bartonelleninfektion zwar eine Vielzahl von Einzelfallbeschreibungen, jedoch nur eine Plazebo-kontrollierte klinische Studie zur Behandlung der CSD (13,66,77). Eine Revision der bislang verfügbaren Literatur (77) sieht bei immungesunden Patienten keine antibiotische Therapie der CSD vor, lediglich bei störend-schmerzhafter Lymphknotenschwellung kann Azithromycin oder Doxyzyklin/Rifampicin gegeben werden (68,77). Konsens besteht darüber, dass komplizierte Fälle der CSD (Retinitis, Enzephalopathie und Endokarditis) mit Doxyzyklin und Rifampicin behandelt werden sollten. Bei Infektionen durch *B. quintana* konnten mit der Kombinationstherapie aus Gentamicin und Doxyzyklin bessere Erfahrungen als mit anderen Kombinationen gemacht werden. Die Therapiedauer soll mindestens einen Monat betragen (36,77). Bei immunkompromittierten Patienten werden alle Manifestationen einer Infektion mit Bartonellen behandelt, wobei die klinische Besserung im Gegensatz zu antibiotisch behandelten immungesunden Patienten deutlich eindrucksvoller ausfällt. Konsens bei der antibiotischen Therapie von immunkompromittierten Patienten ist die Gabe von Erythromycin, oder als Alternative Doxyzyklin bzw. ein Cephalosporin der III. Generation. Bei ZNS oder Endocardbefall gelten Aminoglykoside oder Rifampicin als intravenöse Kombinationspartner der ersten Wahl. Die antibiotische Therapie der *Bartonella spp.*-Infektion ist bei immunkompromittierten Patienten über Wochen bis hin zu 3 Monaten fortzuführen (77).

1.7. Fragestellung der Arbeit

B. henselae ist ein bakterieller Krankheitserreger, der die Katzenkratzkrankheit, die bazilläre Angiomatose und viele andere Krankheitsbilder beim Menschen, insbesondere bei immunkompromittierten Individuen, wie z.B. HIV-Infizierten verursachen kann (3,31,36,55-58,88,89). Katzen, mit die häufigsten Haustiere, stellen mit klinisch asymptomatischen Bakteriämien das infektiöse Reservoir für den Erreger und die einzige bislang bekannte, relevante Infektionsquelle für den Menschen dar (7,14,20-24). 1998, zum Zeitpunkt des Beginns dieser Studie gab es für Norddeutschland keine Daten über die Prävalenz der Bartonellen-Bakteriämie bei Katzen. Im selben Jahr war es aber bereits gelungen *B. henselae* aus einer BA-Läsion eines Berliner AIDS-Kranken nachzuweisen. Um ein Infektionsrisiko abschätzen zu können, erschienen die bereits bekannten Seroprävalenzen als kumulativer Parameter nicht hinreichend aussagekräftig (34,46); insofern war es Ziel dieser Arbeit, die *B. henselae*-Bakteriämieprävalenz bei Katzen in Berlin zu ermitteln.

Die in der Literatur hauptsächlich diskutierten Risikofaktoren Alter und Flohbefall der Katze sollten ebenfalls erfasst werden (7,23,27,33,34,37).

Bei einer bislang in der Literatur beschriebenen Fülle von Anzuchtmethoden sollte durch qualitativen Vergleich eine optimierte Erregeranzucht herausgearbeitet werden (3,14,19,61,69,70,100).

Ebenso war es Ziel der Arbeit, durch 16S rRNA-Gensequenzierung, die zu isolierenden Erreger den in der Literatur vorbeschriebenen 16S RNA-Genotypen zuzuordnen. Da nicht alle *B. henselae*-Stämme gleichartig als Krankheitserreger beim Menschen angetroffen werden, sollte hinsichtlich des Infektionsrisikos durch Typisierung mit PFGE, die genetische Verwandtschaft der zu isolierenden Stämme sowohl untereinander, als auch mit dem bereits bekannten humanpathogenen Stamm Berlin-1 untersucht werden (17,71,72,90,91).

Material und Methoden

2.1. Materialverzeichnis

2.1.1. Technische Geräte

- Lichtmikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland)
- Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland)
- CHEF-DR III-Elektrophoresegerät (Bio-Rad, Hercules, USA)
- Experion Software für CHEF-DR III (Microsoft, Washington, USA)

2.1.2. Lösungen

- Aqua bidestillata
- 1M MgCl₂ (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 1M NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland)

2.1.3. Puffer

- 1M Tris pH7 und pH8 (Sigma, St.Louis, USA)
- 0,5M EDTA pH7 und pH8 (Sigma, St.Louis, USA)
- DNS-Puffer (250µl 5mM MgCl₂, 5 ml 100mM Tris pH 7,5, 44,75ml A.D.)
- CHEF-TE-Puffer (0,1M Tris pH 7,5; 0,1M EDTA pH 7,5)
- TBE-Puffer 10-fach (121g TrisBase , 61,8g Borsäure, 3,7g EDTA, 1 l A.D.)
- TEN-Puffer (0,1M Tris pH 7,5; 0,1M EDTA; 0,15M NaCl)
- EC-Puffer (6mM Tris, 1M NaCl, 10mM EDTA, 0,5% Brij 58, 0,2% Desoxycholat, 0,5% Sarkosyl)
- ES-Puffer (1ml EDTA 0.5M pH 8 + 0.01g Sarkosyl / Well)
- Elektrophorese-Puffer (0,5 fach TBE)

2.1.4. Reagenzien und Enzyme

- Wasserstoffperoxid (3%)
- Oxdasereagenz (Tetramethyl-p-phenylendiamin)
- Gramreagenzien (Viktoriablau, HgCl, Chininalkohol, Fuchsin)
- Brij (Polyoxythylene-20-ethyläther, Sigma, St. Louis, USA)
- Sarkosyl (N-Lauroylsarkosin-Natrium, Sigma, St.Louis, USA)
- Desoxycholat (Desoxycholat-Natrium, Sigma, St. Louis, USA)
- Proteinase K 20mg/ml (Sigma, St.Louis, USA)
- Lysozym 20mg/ml (Sigma, St.Louis, USA)
- Sma I 10U/µl (Boehringer, Mannheim , Deutschland)
- Pulsed field certified Agarose (2% für Blöckchen, Bio-Rad, Hercules, USA)
- Pulsed field certified Agarose (1% für Gel, Bio-Rad, Hercules, USA)
- Ethidiumbromid 10 mg/ml

2.1.5. Testkits und Materialien

- Anaerobier-Test Rapid ID 32A (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich)
- Bartonella-IFT (McMahan Research Laboratories Inc., Chapel Hill, USA)
- Isolator 1.5 Lysiszentrifugationsröhrchen (Oxoid Ltd., Basingstoke, England)
- Isolierband (ScapaTapes Ltd., Bedfordshire, England)

2.1.6. Referenzstämme

- *Bartonella henselae*: ATCC 49882, 'Houston-1' (American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA)
ATCC 49793, 'Oklahoma' (American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA)

Berlin-1 (Charité, Institut f. Infektionsmedizin, Berlin)
Berlin-2 (Charité, Institut f. Infektionsmedizin, Berlin)
- *Bartonella elizabethae*: ATCC 49927 (American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA)
- *Bartonella clarridgeiae*: ATCC 51734 (American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA)

2.1.7. Feste Nährmedien

- Brain-Heart-Agar (Oxoid, Basingstoke, England)
mit Zusatz von 15% Pferdeblut
- Columbia-Agar (Oxoid, Basingstoke, England)
mit Zusatz von 5% Humanblut
- Tryptone-Soja-Agar (Oxoid, Basingstoke, England)
mit Zusatz von 5% Schafblut
- Tryptone-Soja-Agar (Oxoid, Basingstoke, England)
mit Zusatz von 10% erhitztem Humanblut

2.1.8. Flüssige Nährmedien

- BBFH - Medium nach Schwartzman (69) (Brucella-Broth-Fildes-Hämin)
(8% Fildes, Hämin 250 µg/ml)
- RPMI 1640 - Medium nach Wong (70), modifiziert
(0,1% HEPES-Puffer, 1% L-Glutamin, 1% Na-Pyruvat, 1% nicht-essentielle Aminosäuren, Hämin 15 mg/l)

2.2. Methoden

2.2.1. Überprüfung der Anzuchtmethodik

Ein Hauptziel dieser Arbeit war es, *B. henselae* aus Blutproben von Katzen anzuzüchten. Da es sich bei Bartonellen um äußerst anspruchsvolle Erreger handelt, sollte vor Durchführung der Untersuchung geklärt werden, ob die verwendete Methode (Anzucht, Anzuchtmedien, Blutentnahmegefäße) sicher und empfindlich genug ist, um Bartonellen nachweisen zu können. Es sollte festgestellt werden, wo die Nachweisgrenze auf festen und in flüssigen Nährmedien liegt. Im Weiteren war zu klären, ob die hämolysierenden Zusätze der Blutentnahmegefäße (Isolator 1.5) eine Auswirkung auf die Erregerzahl haben. Ebenso sollte überprüft werden, ob es in den verwendeten flüssigen Nährmedien zur gewünschten Anreicherung der Bartonellen kommt, sowie deren Kinetik demonstriert werden.

Alle im Weiteren dargestellten Versuche und Methoden sind, bis auf die als Fremdleistung ausgewiesenen, durch den Autor eigenständig durchgeführt worden.

2.2.2. Ermittlung der Nachweisgrenze der verwendeten Anzuchtmedien

„Was ist die kleinste – von den verwendeten Anzuchtmedien - noch nachweisbare Konzentration von *Bartonella*?“

Zur Beantwortung der Frage wurde mit dem institutseigenen Stamm *B. henselae* Berlin-2 eine Suspension mit einer Erregerzahl 10^7 KBE/ml hergestellt. In einem zweiten Schritt wurde die Konzentration der Ausgangssuspension mit Hilfe einer geometrischen Verdünnungsreihe verdünnt. Hierbei wurden 0,1 ml der Ausgangssuspension in 1 ml sterilem NaCl gemischt, woraufhin die Konzentration in der resultierenden Probe folglich nur noch ein Zehntel der vorhergehenden Probe besaß. Aus dieser Verdünnungsstufe wurde erneut 0,1 ml in 1 ml steriles NaCl überführt usw. So wurde die Konzentration in Zehnerpotenzen abgestuft (10^6 , 10^5 , 10^4) reduziert. Anschließend wurde von jeder Verdünnungsstufe eine Probe zunächst in die Isolatorröhrchen überführt, um die Gegebenheiten des Hauptversuches wiederzuspiegeln. Aus den Isolatorröhrchen erfolgte dann die Ausplattierung auf die verschiedenen Agarsorten mit anschließender Inkubation für 8 Wochen bei 37°C und 5% CO₂. Die auf den Agarplatten gewachsenen Kolonien wurden gezählt und ermöglichten im Rückschluss die Bestimmung der Nachweisgrenze. Den entsprechenden Versuchsaufbau zeigt die Abbildung 2.2.2. .

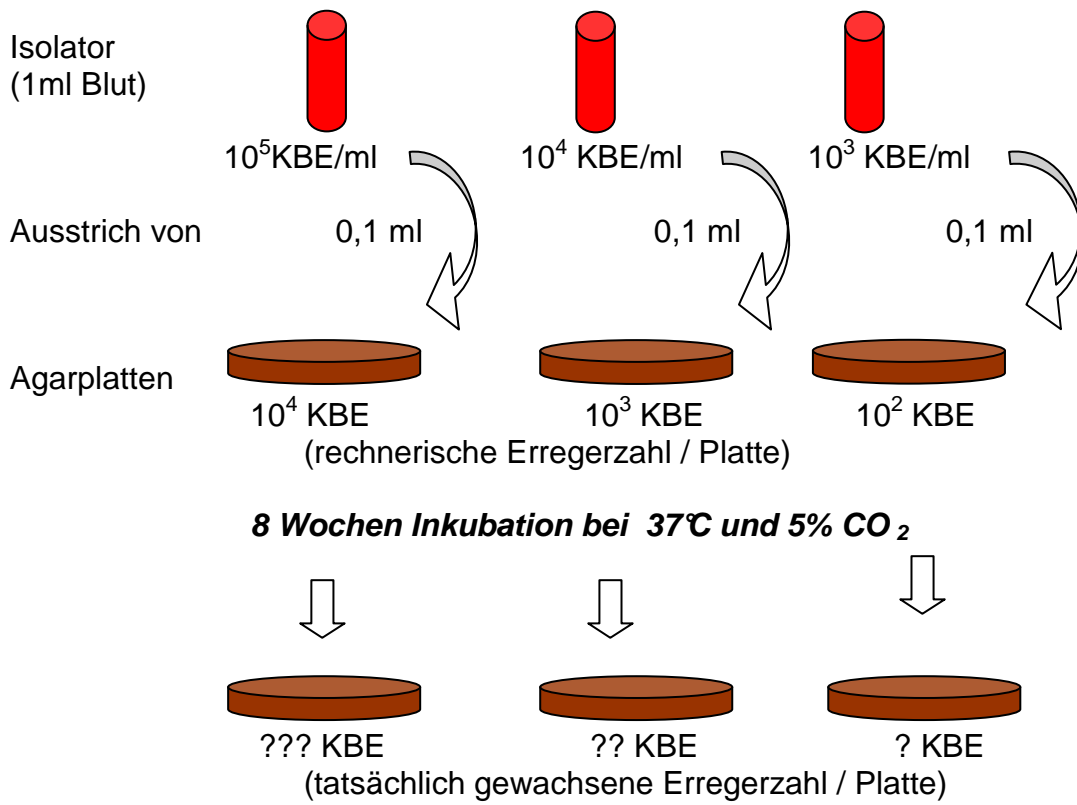


Abb. 2.2.2. Versuchsaufbau zur Ermittlung der Nachweisgrenze bei Agar

Von verschiedenen Verdünnungsstufen der Ausgangssuspension – in der Abbildung als blutgefüllte Isolatorröhrchen dargestellt – wird je 0,1 ml auf die verschiedenen Agarplatten gebracht und das Wachstumsergebnis nach 8 Wochen abgelesen.

Zur Ermittlung der kleinsten, mit flüssigen Medien nachweisbaren *Bartonella*-Konzentration wurde nun - analog zum vorhergehenden Ansatz - aus jeder Verdünnungsstufe der geometrischen Verdünnungsreihe 0,1 ml in jeweils 5 ml BBFH- bzw. RPMI-Medium inokuliert und für 8 Wochen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am 7. und 21. Tag nach Anlage, wurde aus jedem Medium 0,1 ml auf Columbia-Agar verimpft. Diese Platten wurden wiederum für 8 Wochen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und das Wachstumsergebnis abgelesen. Wiederum muss die methodisch bedingte 50-fache Verdünnung der untersuchten Probe berücksichtigt werden, die durch Inokulation in das Flüssigmedium (5 ml) zustande kommt.

2.2.3. Auswirkungen des Isolator 1.5-Röhrchens

„Verändern die hämolysierenden Zusätze Saponin und/oder Na-Polyanetholsulfat - eventuell erst bei längerer Einwirkzeit - die in der Probe vorhandene Erregerzahl?“

Aus drei exemplarischen Verdünnungsstufen wurden hierzu wieder je 0,1 ml in ein mit 1 ml Blut gefülltes Isolatorröhrchen verimpft. Zu drei Zeitpunkten (sofort, nach 24 und 48 Stunden) wurde jeweils 0,1 ml auf Agar ausplattiert und nach entsprechender Inkubation (8 Wochen, 37°C, 5%CO₂) die gewachsenen Kolonien gezählt.

2.2.4. Anreicherungskinetik der Flüssigmedien

Von einem Medium mit einer Verdünnungsstufe, bei der einerseits sicher genug Erreger eingesetzt wurden (z.B. 10³ KBE/ml), andererseits aber noch nicht Erregerzahlen erreicht wurden, die das exakte Auszählen unmöglich machen (z.B. 10⁶ KBE/ml), wurden Ausstriche am 1.,3.,5.,7.,14. und 21. Tag angelegt. Nach 8 Wochen wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt. So konnte das Ansteigen der Erregerzahl in den Medien im zeitlichen Verlauf nachvollzogen werden.

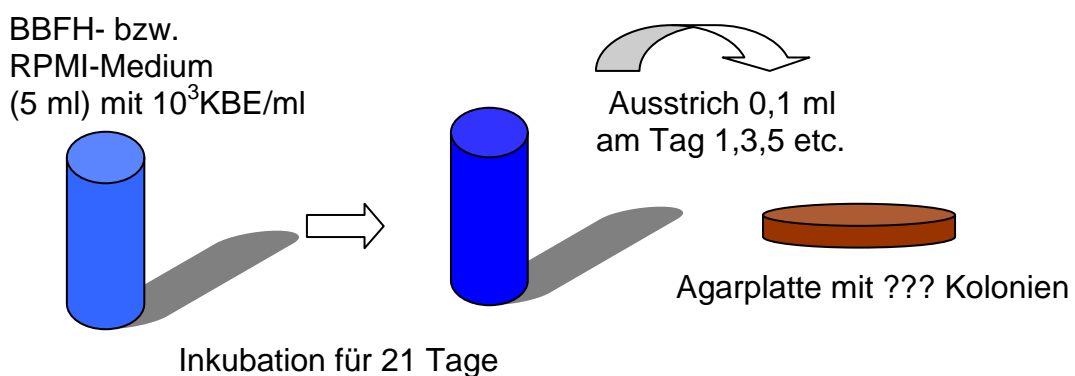


Abb. 2.2.4. Versuchsaufbau zur Untersuchung der Anreicherungskinetik

Erregeranreicherung in flüssigen Medien und deren zeitliche Dynamik werden ermittelt. Im gezeigten Beispiel sind nach Ausstrich von 0,1 ml der Ausgangssuspension mit 10³KBE/ml rechnerisch 100 KBE auf der Agarplatte zu erwarten. Finden sich mehr als 100 KBE auf der Platte, ist es zur Anreicherung gekommen.

2.3. Anzucht von *B. henselae* aus Katzenblutproben

Um die Prävalenz der *B. henselae*-Bakteriämie bei Katzen zu untersuchen, wurde der Erreger direkt aus dem Blut der Tiere angezüchtet. Die untersuchten Tiere wurden nach Pflegeverhältnissen in zwei Gruppen aufgeteilt, da die Pflege den Risikofaktor Flohbefall beeinflusst. Gruppe 1 umfasste die Katzen, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme in festen Besitzverhältnissen waren und als überwiegend in der Wohnung gehaltene Tiere gelten konnten. Diese Tiere hielten sich mindestens über Nacht, meistens jedoch auch tagsüber in der Wohnung auf; die Besitzer gaben an, das Tier jeden Tag zu sehen; wenn die Tiere Freigang hatten, beschränkte sich dieser auf wenige Stunden. Gruppe 2 enthielt Tiere, die ohne festen Besitzer waren (z.B. streunende Katzen, Findlinge, etc.) und die sich daher ausschließlich im Freien aufhielten.

2.3.1. Hauskatzen

Untersucht wurden 97 Hauskatzen, von denen 92 von ihren Besitzern zur Behandlung gebracht wurden, 2 als Blutspenderkatzen zur Klinik f. kleine Haustiere der Freien Universität Berlin gehörten und 3 als Findlinge in der Klinik abgeliefert wurden, wo innerhalb von maximal 48 Stunden eine Blutabnahme durchgeführt wurde. Das äußere Erscheinungsbild dieser „Findlinge“ (Fellzustand, kein Flohbefall, Zahnstatus, Ernährungszustand) ließ jedoch darauf schließen, dass diese Tiere in - wie auch immer gestalteter - Pflege durch einen Besitzer standen, sodass es zulässig schien, diese Tiere zu den Hauskatzen zu zählen. Mit einem Fragebogen wurde neben Alter, Geschlecht und Flohbefall auch Gewicht, Rasse, Behandlungsdiagnose, Herkunft und Vorhandensein weiterer Katzen im Haushalt erfasst. Pro Haushalt wurde jedoch nur ein Tier untersucht. Von den 97 untersuchten Tieren waren 51,7% männlich und 48,3% weiblich. 52,2% der männlichen Tiere und 41,4% der weiblichen Tiere waren sterilisiert. Bei nur 8% der Tiere waren weitere Katzen im Haushalt vorhanden. 77% der Tiere gehörten der Rasse Europäisch-Kurzhaar (EKH) an, 12% waren Perserkatzen, weitere 3% waren Karthäuser bzw. Main-Coon. Die an 100 fehlenden Prozente waren seltene Rassen wie Bluepoint oder Abbessiner. Das Alter der Tiere lag zwischen 7 Monaten und 18,5 Jahren, mit einem Mittelwert von 7,82 Jahren. 15,5% der Tiere waren jünger als zwei Jahre, 10,3% jünger als ein Jahr. Der Median lag bei 7 Jahren.

2.3.2. Streunende Katzen

Untersucht wurden 96 streunende Katzen, die aus verschiedenen Stadtteilen Berlins stammten. Diese Tiere waren im Rahmen eines Programms zur Populationskontrolle streunender Katzen gefangen worden, und sollten kastriert bzw. sterilisiert werden. Bei den Tieren wurde Geschlecht und Gewicht erfasst. Das Alter der Tiere wurde durch einen Veterinärmediziner, anhand des Gewichts und Zahnstatus (Abnutzungserscheinungen) geschätzt, eine Methode, die schon bei anderen Arbeitsgruppen beschrieben worden

war (37,71). Die Tiere wurden entsprechend einer der zwei Altersgruppen (vermutlich jünger bzw. älter als 2 Jahre) zugeordnet. Ebenso wurde Flohbefall bzw. Befall mit anderen Ektoparasiten (z.B. Zecken) dokumentiert. Alle 96 untersuchten Tiere gehörten der Rasse Europäisch-Kurzhaar an. 18 Tiere (19%) wurden als jünger als zwei Jahre klassifiziert. Von den Tieren waren 50% weiblich, 50% männlich, hiervon 4% bereits kastriert.

2.3.3. Probengewinnung

Die Entnahmestelle an den Extremitäten wurde von Fell befreit (rasiert/gezupft) und mit 70%igem Alkohol desinfiziert. Mit einer Kanüle wurde die Vene aseptisch punktiert und ca. 1 ml Blut durch Abtropfen in ein Isolator 1.5 -Röhrchen gewonnen. Dieses Röhrchen wurde steril verschlossen, gut durchmischt und bei Raumtemperatur (ca. 20°C) bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Durch die Agenzien (Saponin bzw. Natriumpolyanethol-sulfonat) des Isolator 1.5-Röhrchens kam es zur Hämolyse.

2.3.4. Probenverarbeitung

Nach maximal 6 h wurde mit dem Lysat nach gründlichem Durchmischen ein kompletter Plattensatz beimpft, bestehend aus: 1 x Hirn-Herz Agar, 1 x Kochblut-Agar, 4 x Columbia-Agar. Pro Platte wurden 0,1 ml ausplattiert und mit einem Glasspatel mechanisch verteilt. Zur Anreicherung der Erreger wurden außerdem je 0,1 ml in BBFH-Medium (5 ml) und RPMI-Medium (5 ml) inokuliert und durchmischt. Die Primärplatten und Bouillons wurden für 8 Wochen bei 37°C in 5% CO₂ inkubiert. Nach 7 und 21 Tagen wurden je 0,1 ml der Bouillons nach gründlichem Durchmischen auf Columbia-Agar ausplattiert, um den angereicherten Erreger anzuzüchten. Primärplatten und Bouillonausstriche wurden am ersten Tag nach Anlage auf schnellwachsende (Kontaminations-)Erreger untersucht. Im Falle der Kontaminationsfreiheit wurden die Platten mit Isolierband zugeklebt, um Austrocknung des Agars und Kontamination durch Sporen und Pilze zu verhindern. Röhrchen mit den beimpften flüssigen Medien wurden aufrecht stehend inkubiert. Der Deckel wurde nach einem kurzen Abflammen nicht zu fest aufgeschraubt, um bei möglichst gutem Kontaminationsschutz keine Diffusionsbarriere für CO₂ zu schaffen.

2.4. Identifizierung der Isolate und Ausschlusskriterien

In den ersten Tagen wurden die Platten jeden zweiten Tag kontrolliert, um Wachstum von Kontaminationskeimen frühzeitig zu erkennen. Ab Tag 7 bis Tag 28 nach Anlage einer Agarplatte, wurde diese 3-4 tägig auf Wachstum von Kolonien, die makroskopisch wie Bartonellen imponierten, überprüft. Ab dem 29. Tag wurde die Agarplatte nur noch einmal wöchentlich bis zum Tag der letzten Ablesung am 64. Tag kontrolliert.

Zur Abgrenzung fraglicher Bartonellen- Kolonien gegen Kontaminationskeime wurden Ausschlusskriterien aufgestellt. Die Ausschlusskriterien beschreiben Charakteristika von Bartonellen, die, obwohl sie nicht für Bartonellen spezifisch sind, es trotzdem gestatten, Bartonellen gegen die überwiegende Mehrzahl der Erreger, die ebenfalls auf den verwendeten Nährmedien wachsen, abzugrenzen (siehe auch Algorhythmus Abb.2.4.). Eine Eingrenzung kann anhand der Merkmale Wachstumszeit, Gramverhalten und Katalase- bzw. Oxidasetestverhalten vorgenommen werden (3,14,19,23,34):

- 1) Wachstumszeit: Primarisolate von Bartonellen benötigen in der Regel zwischen etwa 1 Woche bis zu 5 Wochen
- 2) Grampreparat: Bartonellen sind gramnegative Stäbchen, mit einer typischen zu Klumpen geballten Lagerungsform
- 3) Katalase- bzw. Oxidasetest: Bartonellen sind Katalase und Oxidase negativ.

Traf eines der drei Kriterien bei einem Isolat nicht zu, wurde es ausgeschlossen. Bei unklarem Verhalten in einem oder mehreren der genannten Kriterien, wurden zur Testwiederholung Subkulturen angelegt. Der Plattensatz der Subkultur bestand aus 2 x Columbia-Agar und 1 x Blut-Agar. Ließen sich aufgrund zu geringer Erregermenge die o.g. Kriterien nicht überprüfen, wurde das Isolat als potentielle Bartonellenspezies weiterbehandelt, d.h. es wurden Subkulturen angelegt, bis die Tests durchführbar waren.

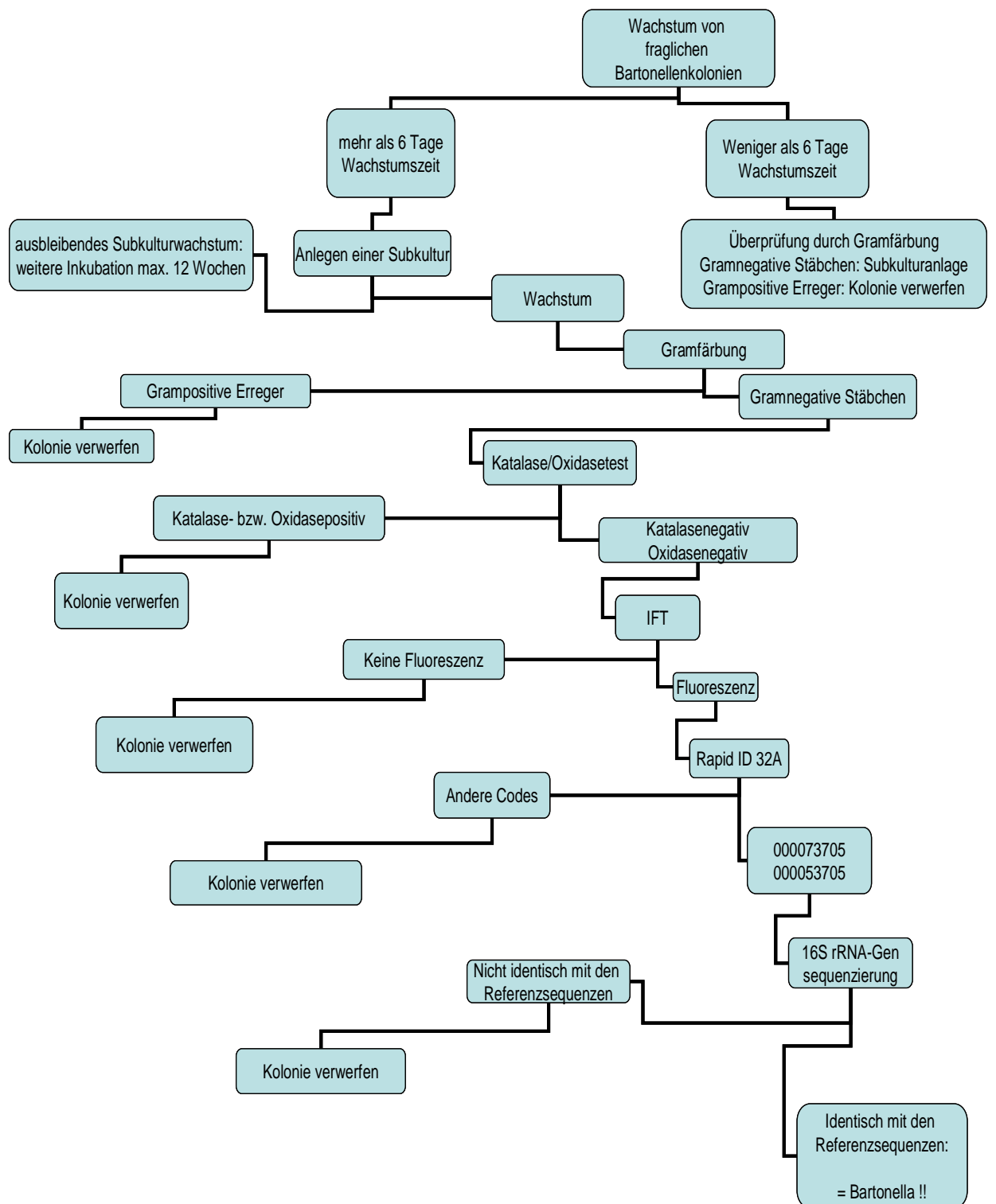


Abb.2.4. Algorithmus zur Identifizierung der Isolate

Im Hauptversuch wurde bei Nachweis von Kolonien die Identifizierung von Bartonellen bzw. Abgrenzung anderer Bakterien entsprechend dem gezeigten Algorithmus durchgeführt.

2.4.1. Makroskopische Identifizierung

Bartonellen-Kolonien sind im jungen Stadium farblos-glasige, glatte, glänzende, bis ca. 1 mm große Kolonien. Mit zunehmendem Alter erscheint die Kolonie weißlich bis bräunlich, stumpf, mit rosettenartiger Zähnelung und wird bis zu 5 mm groß. Die Kolonien haften teilweise dem Agar an, bzw. graben sich ein.

2.4.2. Grampräparat

Bartonellen erscheinen im Grampräparat als gramnegative, typischerweise in Klumpen gelagerte Stäbchen. Charakteristisch ist, dass einzelne Bakterien nur schwach anfärbbar sind.

2.4.3. Katalase- bzw. Oxidasetestung

Katalase und Oxidasetests prüfen das Vorhandensein der Enzyme Katalase und Cytochromoxidase bei den zu untersuchenden Bakterien. Es handelt sich also hier um eine biochemische Leistungsprüfung der Erreger. Negative Ergebnisse zeigen sich in einem Ausbleiben einer Blasenbildung bei Betropfen mit Wasserstoffperoxid, bzw. im Ausbleiben einer intensiv blauen Koloniefärbung durch das Oxidasereagenz. Bei jeder Erregerprüfung wurden bekannte *B. henselae*-Stämme als Kontrolle mitgeführt. Bartonellen sind katalase- und oxidasen negativ.

2.4.4. Biochemische Leistungsprüfung

Rapid ID ANA II bzw. das in dieser Arbeit verwendete Rapid ID 32A sind Testsysteme zur Identifizierung von Anaerobiern und arbeiten mit Angebot von Nährstoffen (Zucker, Nitrat, Indol, Aminosäuren). Diese Substanzen können bei Vorhandensein von entsprechenden Enzymen abgebaut werden. Das Ergebnis der biochemischen Leistungsprüfung wird als Zahlencode angegeben. Bisher wurde bei der Identifikation von *B. henselae* mit Rapid ID ANA II das Profil 000 671, mit Rapid ID 32 A das Profil 0000 0737 05 beschrieben (8,34). Für *B. clarridgeiae* gab es zum Zeitpunkt dieser Arbeit kein beschriebenes Profil mit dem Rapid ID 32A System. Im Test mit dem Rapid ID ANA II-System ergibt sich ebenfalls das Profil 000671 (8). *Bartonella spp.* sind biochemisch relativ inerte Bakterien; der Abbau von Zuckern wird nicht beobachtet, die Identifizierung gelingt anhand der Verwertung der angebotenen Aminosäuren. Die biochemische Leistungsprüfung mit Rapid ID 32A wurde freundlicherweise von den MitarbeiterInnen der Routineabteilung des Hauses durchgeführt.

2.4.5. Immunfluoreszenztest

Der IFT dient zur Genusidentifizierung, also dem Nachweis, dass es sich bei den Isolaten um Bartonellen handelt.

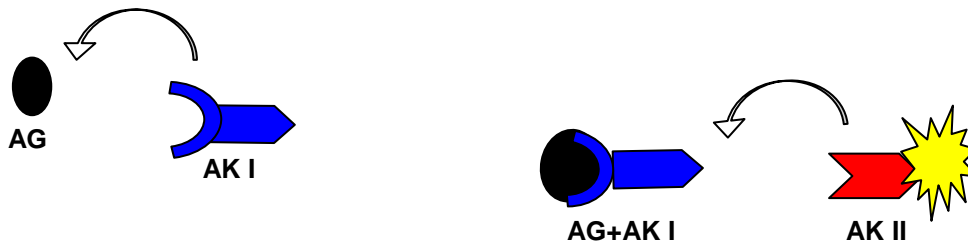


Abb.2.4.5. Immunfluoreszenztest

Die Reaktionsschritte des Immunfluoreszenztests (IFT) bei der *Bartonella*-Diagnostik. Die Erreger (vermutete Bartonellen) bilden das Antigen (AG). Der erste (spezifische) Antikörper (AK I) ist von Kaninchen, die mit Bartonellen immunisiert wurden. Der zweite Antikörper (AK II) besteht aus Fluorescein-markierten Antikörpern des Schweins gegen Kaninchen-Immunglobuline.

Der IFT wird mit 5 –10 µl der zu untersuchenden Bakteriensuspension durchgeführt die auf ein Objektträgerfeld gebracht werden, luftgetrocknet werden und anschließend 30 Minuten in Methanol fixiert werden. Dann wird Antikörper I (Kaninchenantikörper polyklonal gegen *B. henselae*) in zwei Ansätzen (1:100 und 1:1000 mit PBS verdünnt) mit je 20 µl/ Feld aufgebracht und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nachdem die Objektträger 3 Minuten in A.D. gewaschen wurden, wird nun Antikörper II, einem Fluorescein-markierten Schweineantikörper gegen Kaninchen (1:100 verdünnt mit Puffer, der aus 1,8 ml PBS +Tween und 0,2 ml Evans Blue besteht) mit je 20µl/Feld aufgebracht und 30 Minuten unter Lichtabschluß bei 37°C inkubiert. Nach 3 Minuten Waschen in A.D. und anschließendem Lufttrocknen wird das Objektträgerfeld mit Deckgläschen und Deckflüssigkeit abgedeckt und mit einem Fluoreszenzmikroskop bei 400-facher Vergrößerung betrachtet. Von jedem zu testenden Erreger wurde sowohl eine Positivkontrolle (*B. henselae*-Referenzstamm) als auch eine Negativkontrolle (schnellwachsende Bakterien) mitgeführt. Bartonellen stellen sich im IFT vor dunklem Hintergrund als grün-fluoreszierende, kleine, teilweise gekrümmte Stäbchen dar.

2.4.6. Sequenzierung des 16 S rRNA-Gens

Die 16 S rRNA Gensequenzierung dient einerseits der Speziesidentifizierung, andererseits als eine Methode zur Typisierung verschiedener Stämme einer Spezies (34,63,90,91). Beim 16S rRNA Gen handelt es sich um ein universelles Gen, das bei jedem Bakterium vorhanden ist mit gut konservierten Bereichen, die für eine Bakterienart spezifisch sind. Im Fall von *B. henselae*-Isolaten wurde ein 456 Basenpaare langes Stück, bei dem *B. clarridgeiae*-Isolat wurde ein Bruchstück von 435 Basenpaaren mittels PCR vervielfacht (14). Diese Kopien wurden sequenziert, d.h. ihre genaue Basenabfolge wurde identifiziert und mit der Spezies-Referenzsequenz in einer Genbank (z.B. EMBL) verglichen. Für die Sequenzierung wurden sieben Tage alte Subkulturen der Erregerisolate benutzt. Von jedem Isolat wurden ca. 20 Kolonien in je 200 µl A.D. eingerührt und 30 Minuten bei 60°C abgetötet. Die so präparierten Erreger wurden von der Firma Replicon (Berlin-Tempelhof) für das 16S rRNA-Gen sequenziert.

2.5. Molekulare Typisierung mit Pulsed-field-Gel-Elektrophorese

Mit Hilfe der PFGE können verschiedene Stämme innerhalb einer Spezies differenziert werden. Das bakterielle Genom wird mit Hilfe von Restriktionsenzymen fragmentiert, sodass unterschiedlich lange Bruchstücke resultieren, die mittels Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Das Software-Programm Experion steuert dabei abwechselnd unterschiedlich orientierte Spannungsfelder in der Elektrophoresekammer, sodass sich die elektrisch geladenen Fragmente im Gel gemäß ihrer Größe aufteilen und sauber abgegrenzte Banden bilden. Unter der Annahme, dass durch ein genetisches Ereignis (z.B. Deletion eines Basenpaares) die Fragmentlänge durch Verlust einer enzymatischen Schnittstelle verändert wird, resultieren unterschiedliche Bandenmuster. Voraussetzung zum Vergleich der Bandenmuster ist das Vorhandensein von mindestens 10 Banden. Anhand der Anzahl der unterschiedlichen Banden, lässt sich die Einteilung in wahrscheinliche Verwandtheitsgrade vornehmen.

Tab. 2.5. PFGE-Banden - Verwandtheitsgrade nach Tenover et al.

Die Anzahl von unterschiedlichen Banden in der PFGE können zur Bewertung des Verwandtheitsgrades von Bakterienstämmen untereinander herangezogen werden.

Bandenunterschiede	Aussage	Erklärung
< 3 unterschiedliche Banden	Identischer Stamm	Ein genetisches Ereignis (z.B. Deletion eines Basenpaares)
4 – 6 unterschiedliche Banden	Klonale Verwandtschaft möglich	2 unabhängige genetische Ereignisse
> 6 unterschiedliche Banden	Wahrscheinlich zwei verschiedene Stämme	Mehr als 2 genetische Ereignisse

2.5.1. Durchführung der PFGE

Für die PFGE wurden 6-7 Tage alte Subkulturen der verschiedenen Isolate benutzt. Zum Vergleich wurden bei jedem Elektrophoreselauf die *B. henselae*-Stämme Berlin-1, Houston-1 (ATCC 49882) und ATCC 49793, sowie Berlin-2 und *B. elizabethae* mitgeführt. Lambda ladder und *Saccharomyces cerevisiae* wurden als chromosomale Marker verwendet.

Zur Herstellung der Blöckchen wird Agarosegel (2%) im Wasserbad bei 58°C verflüssigt. Nach Abdichten des Blöckchengießstandes am Boden, wird je 1 ml steriles NaCl in die gewogenen Eppendorfküvetten gegeben, in die nun jeweils ca. 3 Ösen voll Bakterienkolonien eingerührt werden. Es sollte ca. 1 Agarplatte abgeerntet werden, wobei jedoch darauf zu achten ist, kein Agarmaterial einzubringen. Nun werden die Küvetten mit Vortex gemischt und 2 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wird die Gewichts Differenz notiert und die Milligramm Differenz in Mikroliter NaCl zugegeben (Bsp.: 290 mg Differenzbetrag entsprechen 290 µl NaCl). Differenzbeträge unter 200 mg ergeben keine sicher verwertbaren Banden. Eine weitere Charge Küvetten wird nun mit je 0,3 ml TEN-Puffer gefüllt hierzu werden von den Bakteriensuspensionen jeweils 0,04 ml zugegeben, gemischt und jeweils mit 0,34 ml Agarose aufgefüllt und nach nochmaligem Durchmischen in den Gießstand eingefüllt. Anschließend 15 Minuten Erkalten des Gels im Kühlschrank.

Zur Behandlung der Blöckchen werden auf der Gewebekulturplatte 1 ml EC-Puffer /Well eingefüllt, in die die erstarrten Blöckchen gegeben werden. Nun wird jeweils 0,1 ml Lysozym /Well zugegeben und die zum Verdunstungsschutz in Folie eingeschlagene Kulturplatte 5 Stunden bei 37°C schüttelnd (50/min) inkubiert. Danach wird der EC-Puffer entfernt und zweimal mit je 1 ml CHEF-TE-Puffer gewaschen, nach Inkubation für 30 Minuten während derer die Proteinase K aufgetaut wird, wird der CHEF-TE-Puffer entfernt und jeweils 1 ml ES-Puffer sowie 0,1 ml Proteinase K / Well zugegeben und bei 50 °C (Folie!) für 12-16 Stunden inkubiert. Nach Entfernung des ES-Puffers wird nun dreimalig mit jeweils 1 ml CHEF-TE-Puffer jeweils eine Stunde schüttelnd gewaschen. Nach dem letzten Puffertausch ist nun eine Lagerung der Blöckchen bei 4 °C bis zu 6 Monate möglich (Folie!).

Zum enzymatischen Schneiden wird eine Mikrotiterplatte mit 0,3 ml DNS-Puffer /Well befüllt. Nun kann ein ca. 1 mm großes Stück des Blöckchens zugegeben werden und nach Austausch des DNS-Puffers dreimal für jeweils 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Währenddessen wird der Restriktionspuffer für die entsprechende Anzahl Proben vorbereitet, der aus 45µl A.D. und 5µl NEB4 besteht. Nach Entfernung des DNS-Puffers nun Zugabe von jeweils 50µl Restriktionspuffer und Inkubation für 1 Stunde bei 5 °C während derer der Restriktionspuffer mit Enzym angesetzt werden kann, der analog aus 44µl A.D., 1µl Sma I und 5 µl NEB4 besteht. Austausch des Restriktionspuffers ohne Enzym gegen denjenigen mit Enzym und zunächst analoge Inkubation bei 5°C für 1 Stunde gefolgt von 16-18 Stunden Inkubation bei 25°C.

Zur Herstellung des Elektrophoresegels wird 8,625 ml 10-fach TBE und 163,87 ml A.D. sowie 1,72 g Agarose (1%) vermischt und unter Rühren auf 250°C erhitzt und für 15 Minuten kochen gelassen, anschließend im Wasserbad bei 58°C bis zum Gebrauch gelagert. Die Blöckchen werden auf die Enden der Kammzinken platziert mit Gel fixiert und erstarren gelassen. Nach Montage des Gießstandes Auffüllen mit Gel und 30 Minuten erstarren lassen. Einfüllen des Elektrophoresepuffers (100 ml 10-fach TBE +1900 ml A.D.) und entlüften des Systems. Auffüllen der Löcher mit Gel nach Entfernen des Kammes und nach Erstarren des Gels Gießplatte in der Elektrophoresekammer platzieren. Nach Wählen der folgenden Einstellungen am Elektrophoresegerät (Spannung 5,5Volt; Switchtime 3/12 Sekunden; Winkel 120°; Temperatur 14°C; Laufzeit 21 h) kann anfänglich ein Strom von 108-123 mA abgelesen werden.

Zum Färben wird das Gel lichtgeschützt in Ethidiumbromidlösung gelegt (karzinogene Lösung - Handschuhe !) und nach 30 minütiger Einwirkzeit zweimalig für 30 Minuten im Wasserbad gewaschen. Das erste Wasserbad ist wegen des hohen Gehaltes an Ethidiumbromid als Sondermüll zu behandeln. Nun kann das Gel unter UV-Licht fotografiert werden, wobei für den Polaroidfilm T667 eine Sekunde Belichtungszeit bei Blende 8 zu wählen ist.

2.6. Statistische Begriffe und Methoden

In dieser Arbeit sollten verschiedene statistische Parameter bestimmt bzw. überprüft werden:

- die Prävalenz der *B. henselae*-Bakteriämie
- Risikofaktoren für die *B. henselae*-Bakteriämie

Die Prävalenz bezeichnet den Anteil Erkrankter an der Gesamtzahl. Da niemals das ganze Kollektiv (z.B. alle Katzen) untersucht wird, sondern nur eine Stichprobe, ist die Prävalenz ein Schätzwert in Bezug auf die tatsächlichen Verhältnisse.

Als Risikofaktor wird ein Merkmal bezeichnet, das dem Krankheitsstatus zeitlich voran geht und mit ihm kausal verknüpft ist.

Ein gebräuchlicher statistischer Begriff ist der Mittelwert (m), der sich als die Summe aller Messwerte dividiert durch die Anzahl der Messwerte definiert. Er bezeichnet den Schwerpunkt von Messwerten. Der Mittelwert trifft jedoch nur dann den Schwerpunkt der Messwerte, wenn die einzelnen Werte symmetrisch um den Mittelwert verteilt sind.

Im Weiteren wird deswegen der Begriff des Medians \tilde{x} verwendet. Der Median oder auch Zentralwert, liegt in der Mitte aller beobachteten Werte. Er wird von höchstens der Hälfte aller Werte unter- bzw. überschritten. Der Median ist unempfindlich gegen Extremwerte und ist exakter bei asymmetrischen Verteilungen. Der Median ist eine Kennzahl zur Charakterisierung der Stichprobe.

Die ebenfalls verwendete Standardabweichung (σ) ist eine Kenngröße der Streuung von Werten. Je größer die Standardabweichung, desto größer die Streuung der Messwerte um den Mittelwert. In einer Normalverteilung liegen 68% aller Messwerte im Intervall Mittelwert $\pm \sigma$. 95% aller Messwerte liegen im Intervall Mittelwert $\pm 2\sigma$. Zur Berechnung der Standardabweichung dient die Varianz (var), die wiederum auf den Mittelwert zurückgreift. Es gilt:

$$\sigma = \sqrt{\text{var}}$$

$$\text{var} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i^2 - m^2 \quad (m = \text{Mittelwert}, n = \text{Anzahl der Messwerte}, X_i = i\text{-ter Messwert})$$

2.6.1. Relatives Risiko

Das relative Risiko (RR ψ) ist eine Maßzahl zur Einschätzung eines kausalen Zusammenhangs zwischen Risikofaktor und Krankheit. Bei Längsschnittstudien (prospektiv) kann das relative Risiko als Quotient von zwei Erkrankungsraten errechnet werden: $\psi = P(X/Y) : P(X/Y')$

$P(X/Y)$ = Wahrscheinlichkeit an X zu erkranken in Anwesenheit von Faktor Y

$P(X/Y')$ = Wahrscheinlichkeit an X zu erkranken ohne Faktor Y

$P(X'/Y)$ = Wahrscheinlichkeit nicht an X zu erkranken, obwohl Faktor Y vorliegt.

Bei einer Querschnittstudie (retrospektiv) kann das relative Risiko nur geschätzt werden, indem man das Chancenverhältnis (Odd's Ratio, OR) bildet. Der Schätzwert der Odd's Ratio nähert sich dem relativen Risiko umso mehr an, je kleiner die Erkrankungshäufigkeiten (mit und ohne Risikofaktor) sind.

Darüber hinaus müssen folgende Bedingungen gewährleistet sein:

- unverzerrte Information über An- bzw. Abwesenheit des Risikofaktors
- die Gruppen der Erkrankten bzw. der Gesunden müssen repräsentativ für das Gesamtkollektiv und vergleichbar sein

Tab. 2.6.1. OR/RR

Aus Risikofaktorstatus und Krankheit kann OR und RR berechnet werden:

$$OR = a d / b c; \quad RR = a / (a+b) : c / (c+d)$$

	Krankheit +	Krankheit -
Risikofaktor +	a	b
Risikofaktor -	c	d

2.6.2. Ergebnisinterpretation

Ein Faktor gilt dann als Risikofaktor, wenn das dem Faktor zuschreibbare Risiko δ größer als Null ist und der Richtwert ω für die Odds Ratio größer als eins ist.

$$\delta = P(X/Y) - P(X/Y') > 0$$

$$\omega = P(X/Y) \times P(X'/Y') : P(X'/Y) \times P(X/Y') > 1$$

δ und ω errechnen sich aus Wahrscheinlichkeiten. Eine Erkrankungswahrscheinlichkeit $P(X)$ ist im Prinzip die relative Häufigkeit einer Erkrankung X . Der Unterschied zwischen Wahrscheinlichkeit und relativer Häufigkeit besteht darin, dass sich die relative Häufigkeit auf den Umfang einer Stichprobe in der Vergangenheit bezieht; die Wahrscheinlichkeit trifft jedoch eine Aussage über ein zukünftiges Ereignis, sie ist also eine Prognose.

2.6.3. Statistisch signifikantes Risiko

Ein statistisch signifikantes Risiko lässt sich mit Hilfe des χ^2 -Tests nach Pearson sowie mit dem 95%-Konfidenzintervall, das den Wert 1 ausschließt, nachweisen.

$$\chi^2 \text{ Test nach Pearson} = \frac{(n-1) \times (ad-bc)^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

Testbasierter 95%-Vertrauensbereich:

$$1 \pm 1,96 / \sqrt{\chi^2} \quad (> 1)$$

2.6.4. Stichprobenumfang

Sind bei einer Untersuchung schon Informationen über die gesuchten Parameter Risikofaktor bzw. Erkrankungswahrscheinlichkeit bekannt, können die benötigten Stichprobenumfänge errechnet werden. Entscheidend für die Größe der Stichprobe ist, auf wieviel Prozent genau man das relative Risiko bei einem Konfidenzintervall von 95% schätzen will.

Benötigt wird als Vorinformation:

- i) der Anteil der Erkrankten ohne Risikofaktor (c),
- ii) das relative Risiko ψ
- iii) erstrebte Genauigkeit ε (auf wieviel % genau soll geschätzt werden).

Beispiel: Berechnungsgrundlage, um die Stichprobengröße in der vorliegenden Studie abschätzen zu können, sei die von Chomel et al. 1995 in Californien durchgeführte Studie zur *B. henselae*-Bakteriämie bei Katzen (23).

bakteriämische Katzen ohne Risikofaktor (c) 12,5%

relatives Risiko $\psi = 1,64$

$\varepsilon_1 = 10\%$, $\varepsilon_2 = 25\%$, $\varepsilon_3 = 50\%$

bei Einsetzen in die Formel

$$\text{Stichprobengröße } m = \frac{1,96^2 [(1-\psi)c : \psi c + (1-c) : c]}{[\ln(1-\varepsilon)]^2}$$

$m = 733$ (bei 10% Genauigkeit)

$m = 99$ (bei 25% Genauigkeit)

$m = 17$ (bei 50% Genauigkeit)

Die Stichprobengröße von 2 x 733 Tieren würde den konzipierten Rahmen der vorliegenden Studie überschreiten; bei einer Gruppengröße von je 99 untersuchten Tieren mit und ohne Risikofaktor kann RR bereits auf 25% genau geschätzt werden, bei einer Vertrauenswahrscheinlichkeit von 95%.

3. Ergebnisse

3.1. Überprüfung der Anzuchtmethodik

3.1.1. Nachweisgrenzen bei festen und flüssigen Medien

Es sollte festgestellt werden, welche niedrigste Bartonellenkonzentration einer (Blut-)Probe mit den verwendeten Nährmedien noch nachgewiesen werden kann.

Zur Überprüfung der festen Medien wurde nach Erstellung einer Bartonellensuspension mit einer Konzentration von 10^7 KBE/ml und geometrischer Verdünnung (siehe Kap. 2) aus jeder Konzentrationsstufe in mehrfachem Ansatz jeweils 0,1 ml auf die zu testenden Agarplatten verimpft. Nach Inkubation für acht Wochen bei 37°C und 5% CO₂ konnte das in Tabelle 3.1.1. gezeigte Ergebnis abgelesen werden. **Die Nachweisgrenze der festen Medien, i.e. für Hirn-Herz-Agar liegt bei 10 KBE/ml.** Hirn-Herz-Agar bietet möglicherweise bessere Wachstumsbedingungen für Bartonellen an als die anderen Agarsorten. Die Differenzen zwischen den Agararten sind jedoch recht gering.

Tab. 3.1.1. Bartonellenanzucht auf festen Medien

Es wird die mediane Anzahl der nachgewiesenen Erregerkolonien nach Ausstrich von bestimmten Verdünnungsstufen gezeigt.

Erregerkonzentration der Suspension nach Verdünnung	median angezüchtete Erreger/Platte		
	Columbia (σ)	Kochblut (σ)	Hirn-Herz-Agar (σ)
10^4 KBE/ml	$1,0 \times 10^3$ (550,75)	$1,0 \times 10^3$ (650,64)	$1,0 \times 10^3$ (550,75)
10^3 KBE/ml	$2,1 \times 10^2$ (142,94)	$1,7 \times 10^2$ (52,12)	$1,7 \times 10^2$ (30,55)
10^2 KBE/ml	8 (0)	2 (1,15)	16 (0)
10 KBE/ml	0 (0,57)	0 (0)	1 (0,44)
1 KBE/ml	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Zur Überprüfung der flüssigen Medien wurde analog vorgegangen. Aus einer Bartonellen-Suspension mit 10^7 KBE/ml wurde eine geometrische Verdünnungsreihe hergestellt. Aus jeder Verdünnung wurde 0,1 ml in 5 ml Medium verimpft. Nach Bebrütung bei 37°C und 5% CO₂ für 1 und 3 Wochen wurden hieraus in mehrfachem Ansatz je 0,1 ml auf Kulturplatten ausgestrichen. **Die Nachweisgrenze der flüssigen Medien liegt bei 1 KBE/ml für BBFH und bei 100 KBE/ml für RPMI.**

Tab. 3.1.1.1. Nachweis der Bartonellen durch flüssige Medien

Ausstriche der verschiedenen Verdünnungsstufen von *B. henselae* Houston-1 nach einer und 3 Wochen Inokulation in den beiden flüssigen Medien. σ sind bei > dreistelligen Nachweiszahlen = 0 und deswegen nicht angegeben. Die Ablesung entsprechender Koloniezahlen basiert auf Hochrechnung.

Erregerkonzentration der Susp. nach Verdünnung vor Inokulation	Nachweis von \bar{x} KBE/Platte innerhalb von 7 Tagen (σ)		Nachweis von \bar{x} KBE/Platte innerhalb von 21 Tagen (σ)	
	BBFH	RPMI	BBFH	RPMI
10 ⁴ KBE/ml	>10 ⁶	150 (15,30)	>10 ⁶	10 ⁴
10 ³ KBE/ml	10 ⁶	5 (1,52)	>10 ⁶	150 (15,25)
10 ² KBE/ml	10 ⁵	0 (0)	10 ⁶	150 (15,42)
10 KBE/ml	10 ⁵	0 (0)	10 ⁵	0 (0)
1 KBE/ml	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Zusammenfassend gilt, dass bei festen und flüssigen Nährmedien unterschiedliche Nachweisgrenzen für *B. henselae* gefunden wurden, die zwischen 1 KBE/ml (BBFH) und 10 KBE/ml (Agar) variierten, sodass sich folglich mit den verwendeten Anzuchtmedien auch sehr niedrige Konzentrationen von *Bartonella* erfassen lassen. Die Verwendung des sensiblen BBFH-Mediums bewirkt eine Sensitivitätssteigerung der Methode. RPMI sowie drei verschiedene, im Nachweisverhalten vergleichbare Agararten bieten ein breites Nährmedienspektrum an, damit die möglicherweise anspruchsvollen Bedürfnisse von Wildstämmen berücksichtigt werden können.

3.1.2. Anreicherungseffekt durch flüssige Medien

Die bereits im vorhergehenden Absatz beobachtete Anreicherung der Bartonellen sollte im Folgenden qualitativ und quantitativ untersucht werden. Von einer Suspension mit 10³ KBE/ml wurden beide Medien in mehrfachem Ansatz mit je 0,1 ml beimpft und für 3 Wochen bebrütet. An den Tagen 1,3,5,7,14 und 21 wurden Ausstriche angefertigt, die nach entsprechender Bebrütung abgelesen wurden. Beide untersuchten Medien reichern Bartonellen an. **BBFH reichert Bartonellen um den Faktor 10⁷ an, RPMI um den Faktor 10³.** Im BBFH-Medium trat nach logarrythmischen Vermehrung bei einer Erregerzahl von 10⁷ KBE/ml die stationäre Phase ein. Im RPMI-Medium konnte während 21 Tagen mit eher flach verlaufender Anstiegskurve keine logarrythmische Vermehrungsphase nachgewiesen werden, wie Abbildung 3.1.2. zeigt. **Innerhalb der ersten 7 Tage kommt es im BBFH-Medium zur logarrythmischen Vermehrung der Bartonellen, im RPMI-Medium kommt es zu keiner logarrythmischen Vermehrung.**

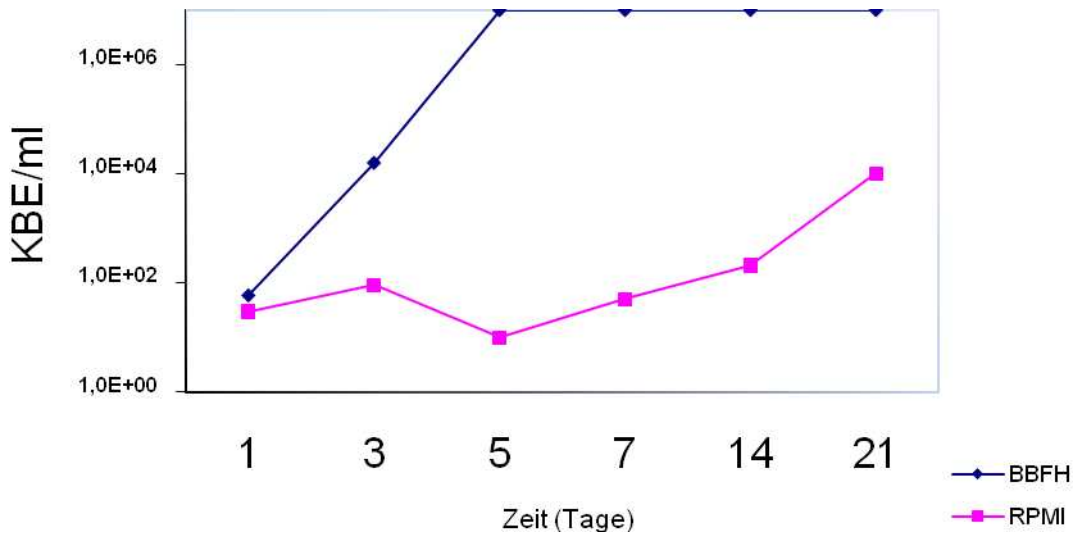


Abb.3.1.2. Anreicherungs kinetik von *B. henselae* Berlin-1 in Flüssigmedien

Anstieg der medianen Konzentration von *B. henselae* Berlin-1 in den beiden Flüssigmedien im Verlauf von 3 Wochen.

σ_{BBFH} ist am Tag 1=0, am Tag 3,5,7,14,21 bei >dreistelligen Konzentrationen nicht exakt bestimmbar, da die Auszählung der Kolonieanzahl per Hochrechnung erfolgt; σ_{RPMI} ist Tag1,3,5,7,14 =0, am Tag 21 ist σ =682.

3.1.3. Auswirkungen des Isolator 1.5-Röhrchens

Zur Überprüfung der Auswirkung der hämolysierenden Zusätze im Isolatorröhrchen auf die Bartonellenkonzentration wurden in mehrfachem Ansatz zwei mit jeweils 1 ml Blut gefüllte Isolator 1.5-Röhrchen mit 10⁴ KBE bzw. 10² KBE beimpft. Zum Zeitpunkt 0, nach 24 und 48 Stunden wurden 0,1ml hiervon auf Agar ausplattiert, bebrütet und abgelesen. **Die im Isolator 1.5-Röhrchen vorhandenen Agenzien haben auch bei längerer Exposition keine relevanten Auswirkungen auf die Erregerzahl.**

Tab. 3.1.3. Erreger im Isolator zu verschiedenen Zeitpunkten

Ausgangskonzentration im Isolator-Röhrchen und die zu drei verschiedenen Zeitpunkten nachweisbaren medianen Erregerzahlen.

Bartonellenkonzentration im Isolator (KBE/ml Blut)		nach 0h × KBE/Platte (σ)	nach 24h × KBE/Platte (σ)	nach 48h × KBE/Platte (σ)
10 ⁴	Ausstrich von 0,1 ml →	2,5x10 ³ (1040,83)	3x10 ³ (707,10)	2x10 ³ (707,10)
10 ²	Ausstrich von 0,1 ml →	15 (0)	13 (0)	18 (9,88)

Die Schwankungen der Erregerzahl im zeitlichen Verlauf könnten dadurch erklärt werden, dass die Inhaltsstoffe der Isolatorröhrchen wie z.B. Saponin zum Zerfallen von Bakterienaggregaten führen. Dadurch ist vermutlich auch

die nachgewiesene Erregerzahl durch Isolatorbehandlung höher als es die Berechnung aus der Ausgangskonzentration erwarten ließe.

3.2. Prävalenz der *B. henselae* -Bakteriämie

Im Rahmen dieser Studie wurden 97 Hauskatzen untersucht. In nur einer Blutprobe konnte *B. henselae* nachgewiesen werden.

Die Prävalenz der *B. henselae*-Bakteriämie bei Hauskatzen ist 1,03% (95%-Konfidenzintervall 0,98 bis 3,04%).

Es wurden 96 streunende Katzen untersucht, von denen 19 Tiere bakteriämisch waren. Von den 19 bakteriämischen Tieren wiesen 18 eine Bakteriämie mit *B. henselae* auf, ein Tier war mit *B. clarridgeiae* infiziert. Somit konnte bei den streunenden Katzen eine Prävalenz für *B. henselae* von 18,7% (95%-Konfidenzintervall 10,94 bis 26,56%) ermittelt werden. Für *B. clarridgeiae* betrug sie 1,04% (95%-Konfidenzintervall -0,99 bis 3,07%).

Die Gesamtprävalenz von *Bartonella spp.* betrug bei den Hauskatzen 1% und bei den streunenden Katzen 19,8%; die Gesamtprävalenz der *Bartonella spp.*-Bakteriämie in beiden Populationen zusammen betrug 10,36%. Die Gesamtprävalenz der *B.henselae*-Bakteriämie betrug 9.84%.

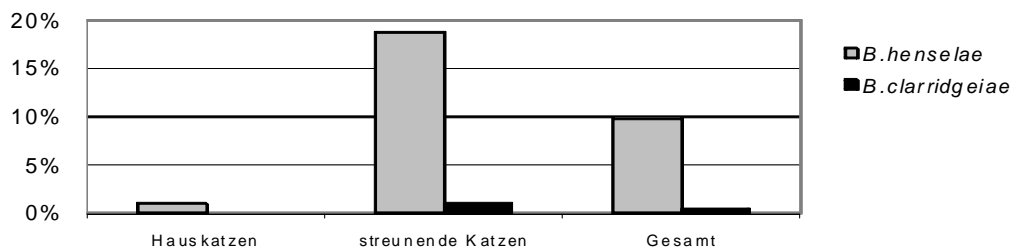


Abb. 3.2. Prävalenz der *Bartonella spp.*-Bakteriämie bei Katzen

Die Prävalenzen der *Bartonella spp.*-Bakteriämie bei den untersuchten Katzen der Studie sind sowohl populationsgetrennt als auch speziesspezifisch dargestellt.

3.2.1. Risikofaktoren bei Haus- und streunenden Katzen

Die bakteriämische Hauskatze war weiblich, 12 Jahre alt, Flohbefall konnte nicht festgestellt werden. Insgesamt waren bei den 97 Hauskatzen 17 Tiere jünger als zwei Jahre (17,5%); 2 Tiere wiesen Flohbefall auf (2%).

Von den 96 streunenden Katzen waren 18 Tiere (18,7%) jünger als zwei Jahre, drei dieser Tiere (16% der < Zweijährigen) wiesen eine Bakteriämie auf. Flohbefall wurde bei 47 Tieren festgestellt (48,5%), acht dieser Tiere (17% der flohbefallenen Tiere) waren bakteriämisch.

Das Risiko für Tiere unter zwei Jahren, eine *B. henselae*-Bakteriämie zu haben, ist in der vorliegenden Studie statistisch nicht relevant ($\delta < 0$; OR 0,77; 95% - Konfidenzintervall 8,8 bis 10,8).

Flohbefall ist ein Risikofaktor für die *B. henselae*-Bakteriämie (OR 2,14). Eine statistische Signifikanz lässt sich aufgrund dieser Untersuchung jedoch nicht sicher belegen ($\delta < 0$; 95% - Konfidenzintervall - 0,23 bis 2,23).

Tab. 3.2.a/b Bakteriämie und Alter bzw. Flohbefall

Verteilung von Bakteriämie bei Katzen unter und über zwei Jahren (a) bzw. bei flohbefallenen und nicht befallenen Katzen (b).

a)

	Bakteriämie	Keine Bakteriämie
< 2 Jahre (n = 35)	3 (8,6%)	32 (91,4%)
> 2 Jahre (n = 158)	17 (10,7%)	141 (89,3%)
Σ (n = 193)	20 (10,4%)	173 (89,6%)

b)

	Bakteriämie	Keine Bakteriämie
Flohbefall + (n = 49)	8 (16,3%)	41 (83,7%)
Flohbefall - (n = 144)	12 (8,3%)	132 (91,7%)
Σ (n = 193)	20 (10,4%)	173 (89,6%)

3.2.2. Kulturergebnisse

Die *B. henselae*-Isolate wuchsen in der Primärkultur auf festen Nährmedien zwischen dem 6. und 20. Tag, mit einem Median (\bar{d}) von 7 Tagen. *B. clarridgeiae* wuchs am 14. Tag. In der Subkultur ließ sich generell eine Wachstumsbeschleunigung auf den 5. Tag (\bar{d}) feststellen. Nach Primäranreicherung in BBFH wuchsen die Erreger zwischen dem 2. und 22. Tag (\bar{d} 5) schneller auf Agar. Bei RPMI war dies nicht der Fall (\bar{d} 13). Bei den bakteriämischen Proben wiesen feste Medien in 95 % der Fälle die Erreger nach, mit flüssigen Medien gelang in 70% der Fälle der Nachweis von Erregerwachstum. Auf Kochblutagar wuchsen bei 90% der bakteriämischen Proben Erreger. Besonders bei der Isolation von *B. clarridgeiae* hat sich der Kochblutagar als sehr geeignet erwiesen, da beide *B. clarridgeiae*-Isolate (eines hiervon mutmaßlich, da es noch in der Subkultur verloren wurde) ausschließlich auf Kochblutagar wuchsen. Columbia-Agar wies bei 80% und Hirn-Herz-Agar bei 50% der bakteriämischen Proben Erregerwachstum nach. BBFH zeigte in 75% und RPMI in 20% der bakteriämischen Proben Erregerwachstum.

Die 19 bakteriämischen Blutkulturen mit *B. henselae* wiesen Erregerzahlen zwischen 10 KBE/ml und 16.000 KBE/ml (Abb. 3.2.2.) auf. Die Blutkultur mit *B. clarridgeiae* wies eine Erregerzahl von 200 KBE/ml auf.

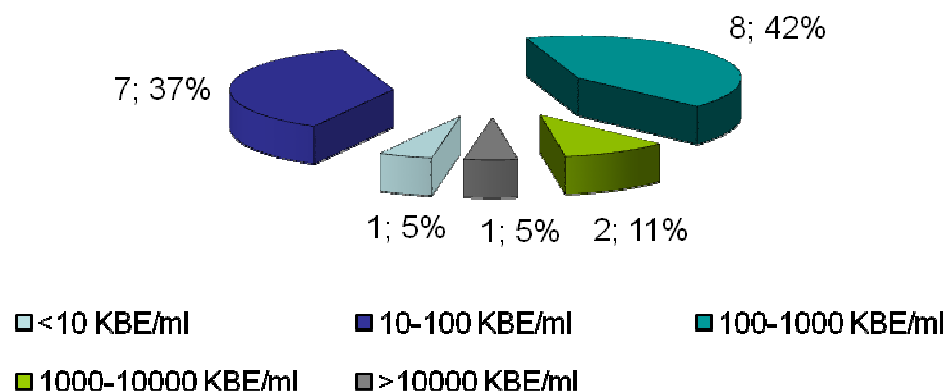


Abb. 3.2.2. Erregerzahlen (nur *B. henselae*) bei infizierten Katzen

Absolute und relative Zahl der mit *B. henselae* infizierten Tiere, und die bei ihnen bestimmte *B. henselae*-Konzentration. Die Mehrheit der Tiere (15 von 19) weist Konzentrationen zwischen 10-1000 KBE/ml auf.

Tab. 3.2.2.1. Synopse der Kulturergebnisse

Für alle Katzenblutproben mit *Bartonella*-Nachweis werden die qualitativen und quantitativen Kulturergebnisse der Agarsorten und flüssigen Medien gezeigt.

Proben-Nr.	Primärwachstum	Wachstum Subkultur	Wachstum Columbia (KBE/ml)	Wachstum Kochblut (KBE/ml)	Wachstum Hirn-Herz (KBE/ml)	Wachstum nach I (3) W.o. BBFH	Wachstum nach I (3) W.o. RPMI	Max. E.-zahl in BFH: KBE/ml	Max. E.-zahl in RPMI: KBE/ml
K56	d10	d5-6	210-360	620	KW	d3 (KW)	d16 (KW)	10 ⁶	10
K108	d19	d4-5	KW	10	KW	KW (KW)	KW (KW)	E	E
K111	d6	d5-6	150-210	220	130	d5 (d5)	K (K)	10 ⁶	E
K116	d6	d5-6	170-230	200	190	d4 (d4)	d21 (K)	10 ⁶	10
K118	d6	d5-6	10 ³	210	180	d5 (d5)	KW (KW)	10 ⁵	E
K123	d7	d4-5	170-230	210	180	K (k)	K (K)	E	E
K132	d6	d4-5	1,6 x 10 ³	1,6 x 10 ³	1,6 x 10 ³	d3 (d3)	KW (KW)	>10 ⁷	E
K135	E	d5-6	K	K	K	d4 (KW)	K (K)	10 ⁵	E
K143	d20	d7	KW	20	K	K (K)	KW (KW)	E	E
K153	d8	d4-5	1,5 x 10 ³	2x 10 ³	1,5 x 10 ³	KW (d2)	d5 (KW)	10 ⁶	10 ⁶
K156	d7	d4-5	50	100	KW	K (K)	KW (KW)	E	E
K158	d7	d4-5	300	300	K	d22 (KW)	KW (KW)	>10 ⁷	E
K161	d10	d4-5	10-100	100	80	d3 (d3)	K (K)	10 ⁶	E
K169	d8	d3	20	30	KW	K (K)	K (K)	E	E
K172	d6	d3	40-100	40	80	K (K)	KW (KW)	E	E
K181	d7	d4	5x 10 ³	5x 10 ³	10 ³	d3 (d3)	d13 (d5)	>10 ⁷	3x10 ³
K182	d6	d4	500-600	600	KW	d5 (d5)	KW (KW)	>10 ⁷	E
K185	d14	d7	KW	200	KW	d3 (KW)	K (K)	10 ⁶	E
K186	d6	d5	600	440	600	d14 (d5)	KW (KW)	>10 ⁷	E
K193	d8	d6	70	K	KW	d10 (d5)	K (KW)	>10 ⁷	E

3.2.3. Sensitivität der Kulturmedien

Die geringste Bartonellenkonzentration einer Blutkultur konnte mit Kochblutagar nachgewiesen werden und betrug 10 KBE/ml (Probe K108 in Tabelle 3.2.2.1.). Columbia-Agar wies als geringste Konzentration 20 KBE/ml (K169) nach, die Nachweisgrenze für Hirn-Herz-Agar betrug im Gegensatz zu den Versuchen zur Anzuchtmethodik 80 KBE/ml (K161). Kein Nachweis von Bartonellen trotz Konzentrationen in der Blutkultur über der Nachweisgrenze konnte bei Columbia-Agar in drei Fällen (15%) und bei Hirn-Herz-Agar in 7 Fällen (41%) beobachtet werden. Kochblutagar erwies sich als zuverlässigster Anzuchtagar ohne einen Ausfall. Mit Hilfe des BBFH-Mediums konnte in 93% der Proben, die nicht wegen Kontamination ausgeschlossen werden mussten, der Erreger angezüchtet werden, in einem Fall gelang der Erregernachweis sogar nur mit Hilfe des BBFH-Mediums (K135). In 86% der Nachweisfälle gelang auch eine Anreicherung des Erregers, wie Tabelle 3.2.3. zeigt. Mit RPMI gelang der Nachweis nur in 4 Fällen, Anreicherung nur in einem Fall, während in zehn Fällen (71%) kein Erregernachweis beobachtet werden konnte. Bezüglich der Kontaminationsrate zeigten sich beide Medien vergleichbar anfällig.

Tab. 3.2.3. Ergebnisse der Anreicherungsmedien

Nachweis von *Bartonella* spp., durch die flüssigen Medien. Bei Erregernachweis wird dabei der Anreicherungseffekt gesondert ausgewiesen; bei ausbleibendem Erregernachweis wird zwischen kontaminierten und nicht kontaminierten Proben differenziert.

Medium	Anzahl Proben <i>mit</i> Erregernachweis (Anreicherung)	Anzahl Proben <i>ohne</i> Erregernachweis (davon kontaminiert)
RPMI (n = 20)	4 (1)	16 (6)
BBFH (n =20)	14 (12)	6 (5)

3.2.4. Biochemische Leistungsprüfung

Unter Verwendung von Rapid ID 32 A wurde bei 3 der Isolate das Testprofil 0000 073705 (Profil 1) identifiziert. Bei 8 der 19 *B. henselae*-Isolate ergab sich jedoch ein anderes Profil mit dem Zahlencode 0000 053705 (Profil 2). In der sechsten Ziffer weichen Profil 1 und 2 voneinander ab. Mit Profil 1 (0000 073705) werden das Vorhandensein von Arginin-, Prolin- und Leucylglycin Arylamidase nachgewiesen, während mit Profil 2 nur das Vorhandensein von Arginin- und Leucylglycin-Arylamidase bestätigt wird. 8 Isolate konnten auch nach mehrmaliger Wiederholung des Tests weder Profil 1 noch Profil 2 zugeordnet werden, da sich die sechste Position nicht sicher als 5 oder 7 identifizieren ließ. Alle 19 Isolate wurden jedoch durch die Sequenzierung als *B. henselae* identifiziert. Für *B. clarridgeiae* ist bisher der Einsatz des Rapid ID 32A nicht beschrieben worden. Bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergab die Testung des ATCC-Stamm 51734 und die Testung des Isolates K185 übereinstimmend das Profil 0000 013705

3.2.5. Sequenzierung des 16S rRNA-Gens

Die amplifizierten Sequenzen der 16S rRNA-Gene von 18 der 19 *B. henselae*-Isolate waren untereinander zu 100% identisch. Bei diesen 18 Isolaten wurden 456 Basenpaaren sequenziert, die eine Übereinstimmung zu 100% mit den Sequenzen der Isolate FR96/BK3 bzw. FR96/BK38 aufwiesen, die Sander et al. 1998 bei Katzen in Freiburg fanden (71). Mit dem von Relman et al. beschriebenen *B. henselae*-Isolat BA-TF (1) besteht eine Homologie von 99,8%, sodaß die 18 Isolate dem 16S rRNA-Typ II entsprechen. Bei dem *B. henselae*-Isolat K186 zeigte die Sequenzierung eine Homologie von 99,5% mit der Referenzsequenz von FR97/K7 einem Katzenisolat aus Freiburg, das wie der Stamm Houston-1 den 16S rRNA-Typ I bildet (71). Bei dem Isolat K185 besteht eine Übereinstimmung zu 99,7% des sequenzierten Abschnitts mit der Referenzsequenz eines *B. clarridgeiae*-Stamms (ATCC 51734), den Kordick et al. 1997 isolierten (9). Die sequenzierten 435 Basenpaare unterschieden sich in einer Position von der Referenzsequenz. Die 16S rRNA-Gensequenz des *B. clarridgeiae*-Isolates K185 ist bei EMBL unter der Zugangsnummer AJ299444 verfügbar.

K186 204 - g t g a g g t **g** a c [---] g a g t t a t g - 362
FR97/K7 217 - g t g a g g t **a** a c [---] g a g t **g** a t g - 387

Abb.3.2.5.a Gensequenzen von *B. henselae*-Isolaten (16S rRNA TypI)

K185 290 - g t g a g t t a t g - 300
ATCC 51734 350 - g t g a g t **g** a t g - 360

Abb.3.2.5.b 16S rRNA-Gensequenz von *B. clarridgeiae*-Isolaten

Es werden die Nukleotidabfolgen von einem *B. henselae*-Referenzstamm (FR97/K7) bzw. einem *B. clarridgeiae*-Referenzstamm (ATCC 51734) im Vergleich mit zwei unterschiedlichen, im Rahmen dieser Studie nachgewiesenen, Stämmen gezeigt. Datenquelle der Referenzsequenz waren die bei Genbank, EMBL bzw. DDBJ gespeicherten Nukleotidabfolgen.

3.2.6. Typisierung mit PFGE

Unter Berücksichtigung der Kriterien zur Interpretation der Restriktionsbandenmuster, wie sie von Tenover et al. beschrieben wurden (72), lassen sich bei den im Rahmen dieser Studie isolierten 19 *B. henselae*-Stämmen nach Restriktion durch Sma I und PFGE sieben Typen unterscheiden. Diese Typen beinhalten zum Teil wiederum mehrere Varianten, wie aus den Abbildungen 3.2.6. und 3.2.6.1. deutlich wird.

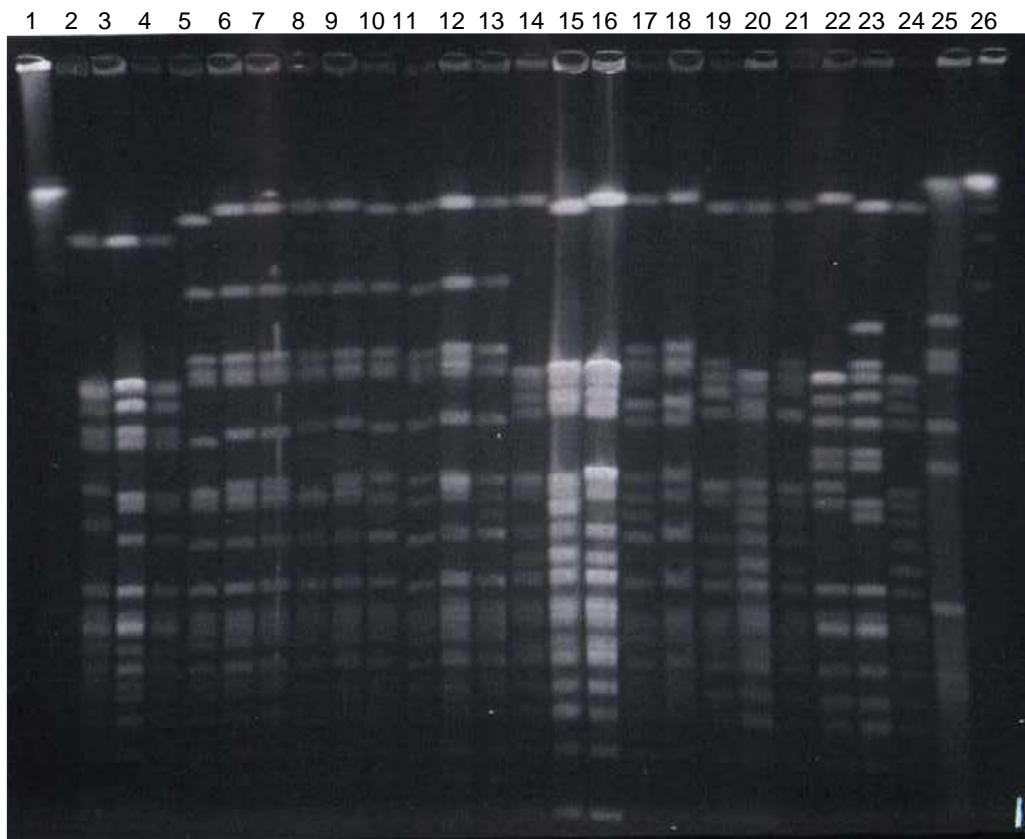


Abb.3.2.6. Bandenmuster der *Bartonella*-Isolate nach enzymatischer Restriktion mit Sma I

Foto eines Agarosegels mit fluoreszierenden Banden. Die Banden sind durch enzymatische Verdauung des bakteriellen Genoms mit Sma I entstanden. Bahn 1 enthält λ -Ladder, einen Molekulargewichtsmarker, Bahn 2 – 5 zeigt die *B. henselae*-Referenzstämme ATCC 49793 „Oklahoma“ (2), ATCC 49882 „Houston-1“ (3), Berlin-1 (4), Berlin-2 (5). Bahn 6 – 24 zeigt die im Rahmen der Studie nachgewiesenen *B. henselae*-Isolate K56 (6), K111 (7), K118 (8), K132 (9), K135 (10), K181 (11), K182 (12), K169 (13), K108 (14), K116 (15), K158 (16), K156 (17), K161 (18), K123 (19), K172 (20), K186 (21), K143 (22), K153 (23), K193 (24). Bahn 25 zeigt *B. elizabethae* ATCC 49927 und Bahn 26 zeigt *Saccharomyces cerevisiae*, ebenfalls einen Molekulargewichtsmarker.

Die 19 *B. henselae*-Isolate lassen sich sieben PFGE-Typen zuordnen. Die PFGE-Typen können als eigenständige Stämme aufgefasst werden, ein Stamm kann jedoch wiederum mehrere Varianten (Subtypen) umfassen. Nach computergestützter Auswertung der PFGE-Bandenmuster können die Verwandtschaftsverhältnisse wie in Abbildung 3.2.6.1 dargestellt werden.

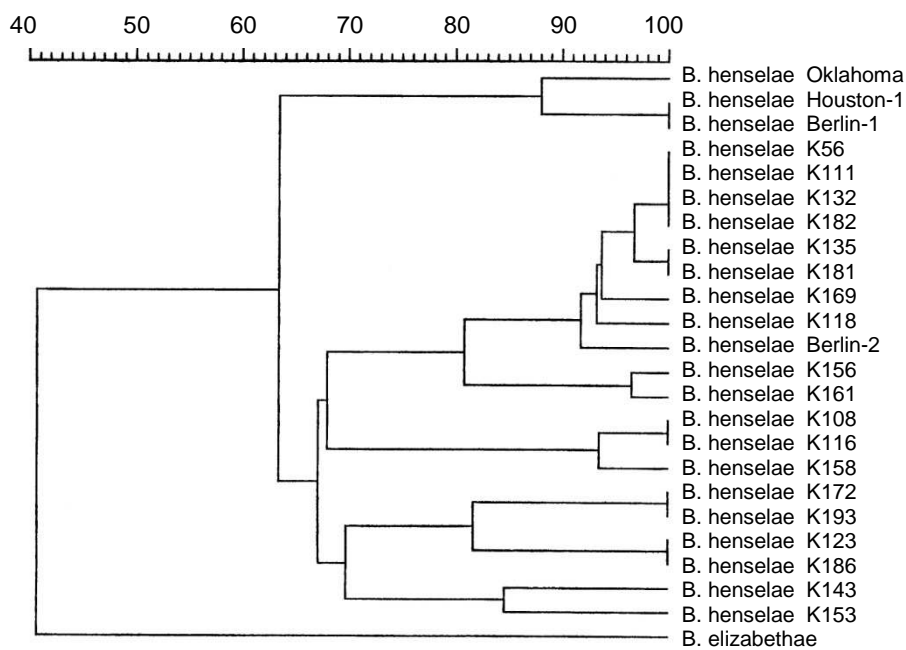


Abb. 3.2.6.1 Dendrogramm der *B. henselae*-Isolate und Referenzstämme

Das Dendrogramm zeigt anhand der prozentualen Übereinstimmung der PFGE-Banden die Verwandtschaftsverhältnisse der in der Studie nachgewiesenen *B. henselae* Stämme und der Referenzstämme *B. henselae* „Houston-1“, *B. henselae* Berlin-1, *B. henselae* „Oklahoma“, *B. henselae* Berlin-2 und *B. elizabethae*.

Typ A ist das Isolat Oklahoma (ATCC49793). **Typ B** beinhaltet das Muster von Berlin-1 sowie Houston-1. Typ A und Typ B sind mit allen anderen *B. henselae*-Isolaten gleichermaßen nur entfernt verwandt. **Typ C** umfasst sowohl Berlin-2, als auch acht Isolate, die sich 4 Subtypen zuordnen lassen. Die Isolate K56, K111, K132 und K182 bilden den Subtyp C₁, die Isolate K135 und K181 den Subtyp C₂, K169 ist Subtyp C₃ und K118 entspricht dem Subtyp C₄. C₂, C₃ und C₄ sind untereinander enger verwandt als mit C₁. **Typ D** unterscheidet sich in mehr als sechs Positionen von allen anderen Isolaten. Es gibt mit K108 und K116 als D₁ und K158 als D₂ zwei Varianten dieses Typs, der enger mit Typ C und E verwandt ist, als mit den anderen Typen F, G, H und I. **Typ E** beinhaltet zwei Varianten E₁ (K156) und E₂ (K 161), lediglich drei unterschiedlichen Banden zeigen eine engere Verwandtschaft zum Typ C. **Typ F** umfasst zwei identische Isolate K186 und K123, ebenso **Typ G** mit zwei identischen Isolaten K172 und K193. Typ G und Typ F sind enger mit Typ H und I verwandt als mit Typen C, E und D. **Typ H** (K143) und **Typ I** (K153) weisen untereinander 6 Bandenunterschiede auf, zu den anderen Typen jedoch mehr als 8 unterschiedliche Banden.

4. Diskussion

4.1. Vergleich der Kulturmedien

In dieser Studie wurden zur Anzucht von *Bartonella spp.* verschiedene Nährmedien benutzt. Ein kompletter Satz bestand aus 4 Columbiaagar, 1 Kochblutagar, 1 modifizierter Hirn-Herz-Agar sowie aus den flüssigen Nährmedien BBFH (69) und modifiziertem RPMI-Medium (70). Mit diesem breiten Angebot an Nährböden sollten unterschiedliche Bedürfnisse von Wildstämmen berücksichtigt werden und bei Kontamination einzelner Platten ein kompletter Ausfall einer untersuchten Probe verhindert werden. In Übereinstimmung mit anderen Studien ließ sich die Zuverlässigkeit von Columbiaagar (3,7) und Kochblutagar (34,79) bestätigen. Wie schon in der durchgeführten Testreihe zur Klärung der Nachweisgrenze gezeigt (siehe 3.1.1.), ist BBFH-Medium in der Anreicherung von *Bartonella spp.* dem RPMI-Medium deutlich überlegen. Wong und Mitarbeiter berichteten 1995 in ihrer Studie von guten Anzuchtergebnissen mit dem RPMI-Medium (70). In der vorliegenden Studie konnte dies nicht bestätigt werden. Ein Grund für das unterschiedliche Verhalten des Mediums könnte in der unterschiedlich großen Einsaat des Erregers liegen. In der vorliegenden Studie lag die durchschnittliche Einsaat bei 10-100 KBE in einem Volumen von 5 ml Medium; Wong et al. hingegen begannen ihren Anreicherungsversuch mit Erregerzahlen von 10^4 KBE in einem Volumen von 1 ml Medium. RPMI scheint weniger wachstumsstimulierend auf Wildstämme zu wirken, da mit vielfach subkultivierten institutseigenen Stämmen ein Anreicherungseffekt um den Faktor 100 erzielt werden konnte. BBFH erwies sich mit einer Anreicherung um den Faktor 10^6 jedoch auch hier als überlegen.

4.2. Prävalenzvergleich - Einflußgrößen

In dieser Studie wurde in einer gemischten Katzenpopulation in Berlin eine Prävalenz von 9,8% für *B. henselae*-Bakteriämie ermittelt. Andere Studien zur Prävalenz der *B. henselae*-Bakteriämie bei Katzen in anderen geographischen Regionen ermittelten z.T. deutlich höhere Prävalenzraten (4,7,23,34,38). Z.B. konnten Chomel und Mitarbeiter 1995 in Kalifornien eine Bakteriämieprävalenz von 39,5% nachweisen (23), ebenfalls ermittelte die Arbeitsgruppe um Chomel 1999 auf den Philippinen eine Bakteriämieprävalenz für *B. henselae* von 61% (38). Zur Bewertung der in Berlin deutlich niedrigeren Prävalenz der *B. henselae*-Bakteriämie bei Katzen muss man jedoch weitere Überlegungen einbeziehen.

Zum einen sind im Untersuchungsraum Berlin die Bedingungen für den Vektor Katzenfloh mit einer Jahresdurchschnittstemperatur von 9°C schlechter. Jameson und Mitarbeiter zeigten in der 1993 durchgeführten Studie die enge Korrelation von guten Lebensbedingungen für den Katzenfloh (warmes Klima, hohe Luftfeuchte) und der *B. henselae*-Bakteriämie bei Katzen (42). Bei Studien in klimatisch vergleichbaren Orten wurden deutlich niedrigere Prävalenzen der *B. henselae*-Infektion nachgewiesen. So ermittelten Sander et al. in Freiburg eine Prävalenz für die *B. henselae*-Bakteriämie von 13% (34) und Bergmans et al. wiesen 1997 in den Niederlanden eine Prävalenz von 22% nach (7).

Diese Tendenz zeigt sich auch bei Studien zur Prävalenz der *B. henselae*-Antikörper. So konnten Jameson und Mitarbeiter in den USA Seroprävalenzen von *B. henselae* von 54,6% ermitteln (42). Glaus et al. fanden 1997 in der Schweiz eine Seroprävalenz von 8,3% (39). Dabei muß beachtet werden, dass Seroprävalenzraten auf Grund des Summationseffektes in der Regel höher ausfallen als die tatsächliche Prävalenz der akuten Infektion (39,62,75,76). Zum anderen wurde die in der vorliegenden Studie festgestellte Gesamtprävalenz von 9,84% in zwei verschiedenen Katzenpopulationen ermittelt. Nach Populationen getrennt betrachtet, wurde für Hauskatzen eine Bakteriämieprävalenz von 1,03%, für streunende Katzen hingegen von 18,75% ermittelt. Beim Vergleich von Prävalenzen muss auch berücksichtigt werden, welcher Population die untersuchten Tiere entstammen. Chomel et al., die in Kalifornien die Prävalenz der *B. henselae*-Bakteriämie ebenfalls nach Populationen aufschlüsselten (23), konnten mit Prävalenzraten von 4,4% bei Hauskatzen und 53% bei streunenden Katzen eine vergleichbare Tendenz nachweisen. Ein weiterer Faktor, der die Prävalenz der *B. henselae*-Bakteriämie beeinflusst, ist die Auswahl der untersuchten Tiere. Die 1997 von Bergmans et al. ermittelte Prävalenz der *B. henselae*-Bakteriämie bei niederländischen Katzen zeigt ein Beispiel für Selektion bakteriämischer Tiere (7), da alle untersuchten bakteriämischen Katzen aus Tierheimen stammten, und somit entweder selber streunende Katzen waren, oder aber zusammen mit zuvor streunenden Katzen untergebracht waren. Der hier anzutreffende starke Flohbefall ist sowohl ein höheres Risiko für die befallenen Tiere selbst, als auch für andere Tiere, die zusammen mit ihnen untergebracht waren, da der Floh von Tier zu Tier springen kann. Unter der Annahme einer Übertragung von Katze zu Katze durch den Katzenfloh, lässt die gemeinsame Unterbringung die Prävalenz höher ausfallen. Die gleiche Studie stellte eine hohe Durchseuchungsrate mit Flöhen in den Tierheimen fest. Die gleiche Art der Selektion liegt bei der von Sander et al. durchgeführten Untersuchung von mehreren Katzen eines Haushalts vor (34), ebenso wie bei Heller et al., die in Frankreich mehrere Katzen einer Kolonie untersuchten (37). In der vorliegenden Studie wurde versucht, diese Selektion zu vermeiden, da Katzen aus räumlich weit entfernten Stadtteilen, bzw. nur ein Tier pro Haushalt untersucht wurden.

4.3. Risikofaktoren für die Bartonellen-Infektion bei Katzen

Seitdem bekannt ist, dass Katzen das Reservoir für *B. henselae* darstellen, sind viele Untersuchungen zu Risikofaktoren für die Infektion mit *B. henselae* durchgeführt worden. Als wesentliche Risikofaktoren für die *B. henselae*-Infektion werden jedoch immer wieder das Alter der Katze und der Befall mit Flöhen herausgearbeitet (4,7,23,34,37,71).

4.3.1. Risikofaktor: Alter

Heller et al. beschreiben eine um etwa 30% höhere Prävalenz der *B. henselae*-Bakteriämie für Katzen mit einem Lebensalter unter einem Jahr (37), während Sander und Mitarbeiter eine fast dreimal höhere Bakteriämieprävalenz bei Katzen unter 2 Jahren (34) beschreiben. Chomel und Mitarbeiter bestimmen ein relatives Risiko von 1.64 für Katzen unter einem Jahr (23). Bergmans et al. fanden bei ihren Studien heraus, dass die Erregerzahl im Blut umso höher ausfällt, je jünger die Katze ist (7).

Die in dieser Studie ermittelte Gesamtprävalenz der *B. henselae*-Bakteriämie von 9,8% für Katzen lässt sich gemäß dem Alter der Tiere genauer differenzieren. Die Bakteriämieprävalenz bei Tieren unter 2 Jahren beträgt 8,6%, die Prävalenz bei Tieren über 2 Jahren Alter liegt bei 10,1% (RR 0,77). Durch die vorliegende Untersuchung konnte die 2-Jahres Altergrenze nicht als statistisch signifikanter Risikofaktor bestätigt werden. Möglicherweise liegt die Diskrepanz zwischen der vorliegenden Untersuchung und den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen in der Tatsache, dass die Gruppe der Tiere unter zwei Jahren in beiden Populationen nur jeweils ca. 1/5 der Gesamttiere umfasste. Die zwar praktikable, weil von detaillierteren Informationen unabhängige, Einteilung der Tiere anhand äußerer Merkmale in Gruppen von älter oder jünger als zwei Jahren (s. Kap. 2), ist möglicherweise ebenfalls zur Beurteilung des Risikofaktors Alter nicht ausreichend differenziert. Schließlich muss in Betracht gezogen werden, dass bei einer Gruppengröße von < 100 Tieren lediglich eine Schätzgenauigkeit von 25% intendiert war.

4.3.2. Risikofaktor: Flohbefall

In vielen Studien wurde die Rolle des Katzenflohs (*Ctenocephalides felis*) als Risikofaktor für die Infektion mit Bartonella bei Katzen beschrieben (7,23,33,34). Die eigentliche Bedeutung als Vektor für die *B. henselae*-Infektion wiesen Chomel et al. (33) nach: Übertragung von *B. henselae* von einer bakteriämischen Katze auf eine nicht-bakteriämische Katze fand nur in Gegenwart des Katzenflohs statt, nicht jedoch bei Spielen oder in Kämpfen zwischen den Katzen, was in der Studie von der Arbeitsgruppe um Abbott bestätigt wird (76). In der vorliegenden Studie wurde ebenfalls der Flohbefall der untersuchten Tiere bestimmt. In der Population der Hauskatzen konnte mit 2% Flohbefall eine deutlich niedrigere Rate gefunden werden als Chomel et al., die 1999 auf den Philippinen 54% befallene Katzen fanden. Ursächlich könnte sein, dass die untersuchten philippinischen Tiere zum größten Teil im Freien lebten, wobei die Philippinen mit einem wärmeren Klima bessere Lebensbedingungen für den Katzenfloh bieten. Soziokulturelle Unterschiede der Besitzer (anderer Stellenwert eines Haustieres) könnten ebenfalls von Einfluss sein. Von anderen Arbeiten, die höhere Prävalenzraten bei Hauskatzen gefunden haben, sind keine Daten zum Flohbefall vorhanden (34,37,39). In der Population der streunenden Katzen wiesen 49 % Flohbefall auf. Bergmans und Mitarbeiter fanden bei einer vergleichbaren Population Tierheimkatzen (frühere Streuner) 22% (7).

Chomel et al. ermittelten in Kalifornien 69% flohbefallene Tiere (23). Tiere, die hauptsächlich im Freien und/oder ohne festen Besitzer leben, haben eine deutlich höhere Durchseuchungsrate. Diese Tendenz wird durch klimatische Bedingungen noch akzentuiert. In der vorliegenden Studie konnte die Bedeutung des Flohbefalls als Risikofaktor für *B. henselae*-Infektion bei Katzen untermauert werden. Es wurde eine Prävalenz der Bakteriämie von 16,3% bei den mit Flöhen befallenen Tieren gegenüber einer Prävalenz von 7,6% bei den Tieren ohne Flöhe (RR 1,95) gefunden. Die ermittelten Prävalenzdaten weisen daraufhin, dass das Risiko bei Katzen für eine Infektion mit *B. henselae* durch Wohnungshaltung einer Katze und regelmäßiger Kontrolle des Tieres auf Ektoparasiten, z.B. Flöhe auf ein geringes Maß reduziert werden kann. Streunende Katzen hingegen stellen eine Infektionsquelle dar, weil sie die Infektion an zeitweilig freilaufende Wohnungstiere weitergeben können bzw. den Erreger direkt auf den Menschen übertragen können.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in Zukunft bei entsprechenden Risikogruppen wie immunkompromittierten Patienten und Kindern, eine detaillierte Haustieranamnese unerlässlich ist. Bei positiver Anamnese und Vorliegen von Infektionssymptomen (lokal oder generalisiert), sollte auch die bislang eher unterdiagnostizierte Infektion mit *Bartonella spp.* in Erwägung gezogen werden.

4.4. Typisierung der *B. henselae*-Isolate

Die PFGE ist als Instrument zur Typisierung von *B. henselae*-Isolaten gut geeignet (71,72). Alle im Rahmen dieser Studie gefundenen *B. henselae*-Isolate wurden nach enzymatischer Restriktion mit Sma I mittels PFGE auf phylogenetische Verwandtschaft untereinander und mit bereits bekannten Stämmen (Berlin-1, Berlin-2) untersucht. Die 19 *B. henselae*-Isolate aus der vorliegenden Studie konnten sieben unterschiedlichen PFGE-Typen (C-I) zugeordnet werden. Von den Restriktionsbandenmustern der humanpathogenen *B. henselae*-Stämme Berlin-1, Houston-1 oder ATCC 49793 unterschieden sich die Muster aller Isolate jedoch erheblich. Wie auch schon andere Arbeitsgruppen zeigen konnten, sind humanpathogene *B. henselae*-Stämme nur zu einem geringen Prozentsatz an den *B. henselae*-Bakteriämien bei Katzen beteiligt (34). Die Tatsache, dass bisher von keinem Patienten Erreger isoliert wurden, die Bandenmuster entsprechend den (felines) PFGE-Typen C-I aufwiesen, wirft die Frage auf, ob es sich möglicherweise bei manchen Isolaten um weniger virulente Stämme handelt (34,63,78). Diese These wird auch durch die Verteilung der Isolate entsprechend der 16S-rRNA-Typen gestützt, die in der vorliegenden Studie wie von anderen Arbeitsgruppen vorbeschrieben ausfiel (7,34). Nur 5,2% der Isolate (K186, PFGE-TypG) entsprachen dem – vermutlich für Menschen virulenteren - 16S-Typ I, 94,8% ließen sich dem 16S-Typ II zuordnen, der bislang von Patienten nicht isoliert werden konnte. Interessanterweise zeigte das andere Isolat des PFGE-Typs G bei identischem Bandenmuster den 16S-Typ II. Mithin sind weitere Untersuchungen von humanen und felines Isolaten notwendig, um die Frage nach Virulenzunterschieden verschiedener *B. henselae*-Stämme abschließend beurteilen zu können.

5. Zusammenfassung

Aufgrund des zunehmenden Stellenwertes der Infektionen durch *Bartonella* spp. im Allgemeinen und *B. henselae* im Besonderen, war es Ziel dieser Arbeit, Daten aus Berlin zur Prävalenz von *Bartonella*-Infektion bei Katzen, dem Erregerreservoir für Bartonellen zu erheben, sowie die molekulare Epidemiologie der gefundenen Erreger zu untersuchen. Die Prävalenzraten für *Bartonella*-spp. wurden in zwei Katzenpopulationen (Hauskatzen und streunende Katzen) ermittelt, die die verschiedenen Risikoexpositionen, denen Katzen ausgesetzt sind, repräsentierten. Es wurde eine Gesamtprävalenz von 10,36% für *Bartonella* spp. gefunden. Diese Gesamtprävalenz unterteilt sich in eine Prävalenz von 9,84% für die *B. henselae*-Bakteriämie und eine Prävalenz von 0,52% für die *B. clarridgeiae*-Bakteriämie.

Auf die zwei Populationen bezogen, erhält man folgendes Ergebnis: In der Population der Hauskatzen hatte die *B. henselae*-Bakteriämie eine Prävalenz von 1,03%; für die *B. clarridgeiae*-Bakteriämie von 0%. In der Population der streunenden Katzen konnte für die *B. henselae*-Bakteriämie eine Prävalenz von 18,75% festgestellt werden, die Prävalenz der *B. clarridgeiae*-Bakteriämie betrug hier 1,4%.

Ferner wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Stellenwert von bekannten Risikofaktoren für die *B. henselae*-Infektion bei Katzen untersucht. Als Risikofaktoren gelten in der Literatur Alter und Flohbefall. Es wurde eine höhere Prävalenz der *B. henselae*-Bakteriämie bei Katzen mit Flohbefall ermittelt (16,3% bei flohbefallenen Tieren versus 7,6% bei nicht befallenen Katzen). Die 2-Jahres Altersgrenze konnte in der vorliegenden Studie nicht als Risikofaktor nachvollzogen werden.

Die 16S rRNA-Gensequenzierung zur Speziesidentifizierung der 19 *B. henselae*-Isolate konnte zwei verschiedene 16S-Typen nachweisen, wobei 18 Isolate dem 16S-Typ II, und nur eines dem Typ I entsprachen. Dieses Verteilungsverhältnis mit Überwiegen des 16S-Typ II bei den felines Isolaten deckt sich mit Ergebnissen anderer Studien (7,34).

Die molekulare Typisierung mittels PFGE zeigte, dass die im Rahmen dieser Studie isolierten Erreger sieben PFGE-Typen zugeordnet werden können, die nur eine geringe Verwandtschaft mit den humanpathogenen Stämmen *B. henselae* Berlin-1 bzw. Houston-1 und ATCC 49793 aufweisen. Diese Daten untermauern die Hypothese, dass bestimmte *B. henselae*-Stämme eine höhere Virulenz für den Menschen besitzen könnten, sodass sie häufiger als Infektionserreger vom Menschen isoliert werden, trotz prozentual niedrigem Vorkommen im tierischen Erregerreservoir.

6. Literatur

1. Relman DA, Loutit JS, Schmidt TM, Falkow S, Tomkins LS. The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. *N Engl J Med.* **1990**; 323: 1573-80
2. Welch DF, Pickett DA, Slater LN, Steigerwalt AG, Brenner DJ. *Rochalimaea henselae* sp. nov., a cause of septicemia, bacillary angiomatosis, and parenchymal bacillary peliosis. *J Clin Microbiol.* **1992**; 30: 275-80
3. Slater LN, Welch DF, Hensel D, Coody DW. A newly recognized fastidious gram-negative pathogen as a cause of fever and bacteremia. *N Engl J Med.* **1990**; 323: 1587-93
4. Koehler JE, Glaser CA, Tappero JW. *Rochalimaea henselae* infection. A new zoonosis with the domestic cat as reservoir. *JAMA.* **1994**; 271: 531-5
5. Koehler JE, Quinn FD, Berger TG, LeBoit PE, Tappero JW. Isolation of *Rochalimaea species* from cutaneous and osseous lesions of bacillary angiomatosis. *N Engl J Med.* **1992**; 327: 1625-31
6. Maurin M, Roux V, Stein A, Ferrier F, Viraben R, Raoult D. Isolation and characterization by immunofluorescence, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, western blot, restriction fragment length polymorphism-PCR, 16S rRNA gene sequencing, and pulsed-field gel electrophoresis of *Rochalimaea quintana* from a patient with bacillary angiomatosis. *J Clin Microbiol.* **1994**; 32: 1166-71
7. Bergmans AM, deJong CM, van Amerongen G, Schot CS, Schouls LM. Prevalence of *Bartonella species* in domestic cats in The Netherlands. *J Clin Microbiol.* **1997**; 35: 2256-61
8. Clarridge JE, Raich TJ, Pirwani D, Simon B, Tsai C, Rodriguez-Barradas MC, Regnery R, Zollo A, Jones DC, Rambo C. Strategy to detect and identify *Bartonella species* in routine clinical laboratory yields *Bartonella henselae* from human immunodeficiency virus-positive patient and unique *Bartonella* strain from his cat. *J Clin Microbiol.* **1995**; 33: 2107-13
9. Kordick DL, Hilyard EJ, Hadfield TI, Wilson KH, Steigerwalt AG, Brenner DJ, Breitschwerdt EB. *Bartonella clarridgeiae*, a newly recognized zoonotic pathogen causing inoculation papules, fever, and lymphadenopathy (cat scratch disease). *J Clin Microbiol.* **1997**; 35: 1813-8
10. Warwick WJ. The cat-scratch syndrome, many diseases or one disease? *Prog Med Virol.* **1967**; 9: 256-301
11. Wear DJ, Margileth AM, Hadfield TL, Fischer GW, Schlagel CJ, King FM. Cat scratch disease: a bacterial infection. *Science.* **1983**; 221: 1403-5
12. Stoler MH, Bonfiglio TA, Steigbigel RT, Pereira M. An atypical subcutaneous infection associated with acquired immune deficiency syndrome. *Am J Clin Pathol.* **1983**; 80: 714-8
13. Koehler JE, LeBoit PE, Egbert BM, Berger TG. Cutaneous vascular lesions and disseminated cat-scratch disease in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *Ann Intern Med.* **1988**; 109: 449-55
14. Regnery RL, Anderson BE, Clarridge JE, Rodriguez-Barradas MC, Jones DC, Carr JH. Characterization of a novel *Rochalimaea species*, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile human immunodeficiency virus-positive patient. *J Clin Microbiol.* **1992**; 30: 265-74

15. Regnery RL, Olson JG, Perkins BA, Bibb W. Serological response to „*Rochalimaea henselae*“ antigen in suspected cat-scratch disease. *Lancet*. **1992**; 339: 1443-5
16. Kinloch-de Loes S, Masouye I, Salomon D, Harms M, Chamot E, Louis O, Saurat JH. Bacillary angiomatosis: apropos of a case. *Schweiz Med Wochenschr*. **1992**; 122: 1168-72
17. Arvand M, Wendt C, Regnath T, Ullrich R, Hahn H. Characterization of *Bartonella henselae* isolated from bacillary angiomatosis lesions in a human immunodeficiency virus-infected patient in Germany. *Clin Infect Dis*. **1998**; 26: 1296-9
18. Brenner DJ, O'Connor SP, Winkler HH, Steigerwalt AG. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* *comb. nov.*, and *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*. **1993**; 43: 777-86
19. Anderson BE, Neuman MA. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clin Microbiol Rev*. **1997**; 10: 203-19
20. Regnery RL, Martin M, Olson J. Naturally occurring „*Rochalimaea henselae*“ infection in domestic cat. *Lancet*. **1992**; 340: 557-8
21. Kordick DL, Wilson KH, Sexton DJ, Hadfield TL, Berkhoff HA, Breitschwerdt EB. Prolonged *Bartonella* bacteremia in cats associated with cat-scratch disease patients. *J Clin Microbiol*. **1995**; 33: 3245-51
22. Margileth AM. Cat scratch disease. *Adv Pediatr Infect Dis*. **1993**;8: 1-21
23. Chomel BB, Abbott RC, Kasten RW, Floyd-Hawkins KA, Kass PH, Glaser CA, Pedersen NC, Koehler JE. *Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. *J Clin Microbiol*. **1995**; 33: 2445-50
24. Groves MG, Harrington KS. *Rochalimaea henselae* infections: newly recognized zoonosis transmitted by domestic cats. *J Am Vet Med Assoc*. **1994**; 204: 267-71
25. Keret D, Giladi M, Kletter Y, Wientroub S. Cat-scratch disease osteomyelitis from a dog scratch. *J Bone Joint Surg Br*. **1998**; 80: 766-7
26. Tsukkahara M, Tsuneoka H, Iino H, Ohno K, Murano I. *Bartonella henselae* infection from a dog. *Lancet*. **1998**; 352: 1682
27. Carithers HA, Carithers CM, Edwards RO Jr. Cat-scratch disease: its natural history. *JAMA*. **1969**; 207: 312-6
28. Tappero JW, Mohle-Boetani J, Koehler JE, Swaminathan B, Berger TG, LeBoit PE, Smith LL, Wenger JD, Pinner RW, Kemper CA, et al. The epidemiology of bacillary angiomatosis and bacillary peliosis. *JAMA*. **1993**; 269: 770-5
29. Zangwill KM, Hamilton DH, Perkins BA, Regnery RL, Plikaytis BD, Hadler JL, Cartter ML, Wenger JD. Cat scratch disease in Connecticut. Epidemiology, risk factors, and evaluation of a new diagnostic test. *N Engl J Med*. **1993**; 329: 8-13
30. Holmes AH, Greenough TC, Balady GJ, Regnery RL, Anderson BE, O'Keane JC, Fonger JD, McCrone EL. *Bartonella henselae* endocarditis in an immunocompetent adult. *Clin Infect Dis*. **1995**; 21: 1004-7

31. Lucey D, Dolan MJ, Moss CW, Garcia M, Hollis DG, Wegner S, Morgan G, Almeida R, Leong D, Greisen KS, et al. Relapsing illness due to *Rochalimaea henselae* in immunocompetent hosts: implications for therapy and new epidemiological associations. *Clin Infect Dis*. **1992**; 14: 683-8
32. Dolan MJ, Wong MT, Regnery RL, Jorgensen JH, Garcia M, Peters J, Drehner D. Syndrome of *Rochalimaea henselae* adenitis suggesting cat scratch. *Ann Intern Med*. **1993**; 118: 331-6
33. Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins K, Chi B, Yamamoto K, Roberts-Wilson J, Gurfield AN, Abbott RC, Pedersen NC, Koehler JE. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J Clin Microbiol*. **1996**; 34: 1952-6
34. Sander A, Buhler C, Pelz K, von Cramm E, Bredt W. Detection and Identification of two *Bartonella henselae* variants in domestic cats in Germany. *J Clin Microbiol*. **1997**; 35: 584-7
35. Wong MT, Dolan MJ, Lattuada CP Jr., Regnery RL, Garcia ML, Mokulis EC, LaBarre RA, Ascher DP, Delmar JA, Kelly JW, et al. Neuroretinitis, aseptic meningitis, and lymphadenitis associated with *Bartonella (Rochalimaea) henselae* infection in immunocompetent patients and patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Clin Infect Dis*. **1995**; 21: 352-60
36. Adal KA, Cockerell CJ, Petri WA Jr. Cat scratch disease, bacillary angiomatosis and other infections due to *Rochalimaea*. *N Engl J Med*. **1994**; 330: 1509-15
37. Heller R, Artois M, Xemar V, De Briel D, Gehin H, Jaulhac B, Monteil H, Piemont Y. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in stray cats. *J Clin Microbiol*. **1997**; 35: 1327-31
38. Chomel BB, Carlos ET, Kasten RW, Yamamoto K, Chang CC, Carlos RS, Abenes MV, Pajares CM. *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* infection in domestic cats from The Phillipines: *Am J Trop Med Hyg*. **1999**; 60: 593-7
39. Glaus T, Hofmann-Lehmann R, Greene C, Glaus B, Wolfensberger C, Lutz H. Seroprevalence of *Bartonella henselae* infection and correlation with disease status in cats in Switzerland. *J Clin Microbiol*. **1997**; 35: 2883-5
40. Flexman JP, Lavis NJ, Kay ID, Watson M, Metcalf C Pearman JW. *Bartonella henselae* is a causative agent of cat scratch disease in Australia. *J Infect*. **1995**; 31: 241-5
41. Allerberger F, Schonbauer M, Zangerle R, Diereich M. Prevalence of antibody to *Rochalimaea henselae* among Austrian cats. *Eur J Pediatr*. **1995**; 154: 165
42. Jameson P, Greene C, Regnery R, Dryden M, Marks A, Brown J, Cooper J, Glaus B, Greene R. Prevalence of *Bartonella henselae* antibodies in pet cats throughout regions of North America. *J Infect Dis*. **1995**; 172: 1145-9
43. Kelly PJ, Matthewman LA, Hayter D, Downey S, Wray K, Bryson NR, Raoult D. *Bartonella (Rochalimaea) henselae* in southern Africa—evidence for infections in domestic cats and implications for veterinarians. *J S Afr Vet Assoc*. **1996**; 67: 182-7
44. Ueno H, Muramatsu Y, Chomel BB, Hohdatsu T, Koyama H, Morita C. Seroepidemiological survey of *Bartonella (Rochalimaea) henselae* in domestic cats in Japan. *Microbiol Immunol*. **1995**; 39: 339-41
45. Jackson LA, Perkins BA, Wenger JD. Cat scratch disease in the United States: an analysis of three national databases. *Am J Public Health*. **1993**; 83: 1707-11

46. Haimerl M, Tenter AM, Simon K, Rommel M, Hilger J, Authenrieth IB. Seroprevalence of *Bartonella henselae* in cats in Germany. J Med Microbiol. **1999**; 48: 849-56
47. English CK, Wear DJ, Margileth AM, Lissner CR, Walsh GP. Cat scratch disease. Isolation and culture of the bacterial agent. JAMA. **1988**; 259: 1347-52
48. Margileth AM, Wear DJ, English CK. Systemic cat scratch disease: report of 23 patients with prolonged or recurrent severe bacterial infection. J Infect Dis. **1987**; 155: 203-19
49. Schwartzman WA. Infections due to *Rochalimaea*: the expanding clinical spectrum. Clin Infect Dis. **1992**; 15: 893-900
50. Wear DJ, Malatay RH, Zimmerman LE, Hadfield TL, Margileth AM. Cat scratch disease bacilli in the conjunctiva of patients with Parinaud's oculoglandular syndrome. Ophthalmology. **1985**; 92: 1282-7
51. Noah DL, Bresee JS, Gorenssek MJ, Rooney JA, Cresanta JL, Regnery RL, Wong J, del Toro J, Olson JG, Childs JE. Cluster of five children with acute encephalopathy associated with cat-scratch disease in south Florida. Pediatr Infect Dis J. **1995**; 14: 866-9
52. Jacobs RF, Schutze GE. *Bartonella henselae* as a cause of prolonged fever and fever of unknown origin in children. Clin Infect Dis. **1998**; 26: 80-4
53. Spach DH, Kanter AS, Daniels NA, Nowowiejski DJ, Larson AM, Schmidt RA, Swaminathan B, Brenner DJ. *Bartonella (Rochalimaea) species* as a cause of apparent „culture-negative“ endocarditis. Clin Infect Dis. **1995**; 20: 1044-7
54. Delahoussaye PM, Osborne BM. Cat-scratch disease presenting as abdominal visceral granulomas. J Infect Dis. **1990**; 161: 71-8
55. Koehler JE, Tappero JW. Bacillary angiomatosis and bacillary peliosis in patients infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis. **1993**; 17: 612-24
56. Schneider T, Ullrich R, Schmitt-Graff A, Bergs C, Reiterer L, Dissmann T, Zeitz M, Riecken EO. Bacillary angiomatosis in a German patient with AIDS. Clin Investig. **1993**; 72: 50-4
57. Koehler JE, Cederberg L. Intra-abdominal Mass associated with gastrointestinal hemorrhage: a new manifestation of bacillary angiomatosis. Gastroenterology. **1995**; 109: 2011-4
58. Liston TE, Koehler JE. Granulomatous hepatitis and necrotizing splenitis due to *Bartonella henselae* in a patient with cancer: case report and review of hepatosplenic manifestations of *bartonella* infection. Clin Infect Dis. **1996**; 22: 951-7
59. Goldenberger D, Zbinden R, Perschil I, Altwegg M. Detection of *Bartonella (Rochalimaea) henselae/B. quintana* by polymerase chain reaction (PCR). Schweiz Med Wochenschr. **1996**; 126: 207-13
60. Goral S, Anderson B, Hager C, Edwards KM. Detection of *Rochalimaea henselae* DNA by polymerase chain reaction from suppurative nodes of children with cat-scratch disease. Pediatr Infect Dis J. **1994**; 13: 994-7
61. Brenner SA, Rooney JA, Manzewitsch P, Regnery RL. Isolation of *Bartonella (Rochalimaea) henselae*: effects of methods of blood collection and handling. J Clin Microbiol. **1997**; 35: 777-86
62. Foley JE, Chomel B, Kikuchi Y, Yamamoto K, Pedersen NC. Seroprevalence of *Bartonella henselae* in cattery cats: association with cattery hygiene and flea infestation. Vet Q. **1998**; 20: 1-5

63. Bergmans AM, Schellekens JF, van Embden JD, Schouls LM. Predominance of two *Bartonella henselae* variants among cat-scratch disease patients in the Netherlands. *J Clin Microbiol.* **1996**; 34: 254-60
64. La Scola B, Raoult D. Culture of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* from human samples: a 5-year experience (1993-1998). *J Clin Microbiol.* **1999**; 37: 1899-905
65. Musso D, Drancourt M, Raoult D. Lack of bactericidal effect of antibiotics except aminoglycosides on *Bartonella (Rochalimaea) henselae*. *J Antimicrob Chemother.* **1995**; 36: 101-8
66. Margileth AM. Antibiotic therapy for cat-scratch disease: clinical study of therapeutic outcome in 268 patients and a review of the literature. *Pediatr. Infect Dis J.* **1992**; 11: 474-8
67. Chomel BB. Cat-scratch disease and bacillary angiomatosis. *Rev Sci Tech.* **1996**;15: 1061-73
68. Bass JW, Freitas BC, Freitas AD, Sisler CL, Chan DS, Vincent Jm, Person DA, Claybaugh JR, Wittler RR, Weisse ME, Regnery RL, Slater LN. Prospective randomized double blind placebo-controlled evaluation of azithromycin for treatment of cat-scratch disease. *Pediatr Inf Dis J.* **1998**; 17: 447-52
69. Schwartzman WA, Nesbit CA, Baron EJ. Development and evaluation of a blood-free medium for determining growth curves and optimizing growth of *Rochalimaea henselae*. *J Clin Microbiol.* **1993**; 31: 1882-5
70. Wong MT, Thornton DC, Kennedy RC, Dolan MJ. A chemically defined liquid medium that supports primary isolation of *Rochalimaea (Bartonella) henselae* from blood and tissue specimens. *J Clin Microbiol.* **1995**; 33: 742-4
71. Sander A, Ruess M, Bereswill S, Schuppler M, Steinbrueckner B. Comparison of different DNA fingerprinting techniques for molecular typing of *Bartonella henselae* isolates. *J Clin Microbiol.* **1998**; 36: 2973-81
72. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* **1995**; 33: 2233-9
73. Sachs L. *Angewandte Statistik.* 8. Auflage, Springer-Verlag. **1997**
74. Yamamoto K, Chomel BB, Kasten RW, Chang CC, Tseggai T, Decker PR, Mackowiak M, Floyd-Hawkins KA, Pedersen NC. Homologous protection but lack of heterologous protection by various species and types of *Bartonella* in specific pathogen-free cats. *Vet Immunol Immunopathol.* **1998**; 65: 191-204
75. Guptill L, Slater L, Wu CC, Lin TL, Glickman LT, Welch DF, HogenEsch H. Experimental infection of young specific pathogen-free cats with *Bartonella henselae*. *J Infect Dis.* **1997**; 176: 206-16
76. Abbott RC, Chomel BB, Kasten RW, Floyd-Hawkins KA, Kikuchi Y, Koehler JE, Pedersen NC. Experimental and natural infection with *Bartonella henselae* in domestic cats. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* **1997**; 20: 41-51
77. Rolain JM, Brouqui P, Koehler JE, Maguina C, Dolan HJ, Raoult D. Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella species*. *Antimicrob Agents Chemother.* **2004**; 48: 1921-33

78. Branley J, Wolfson C, Waters P, Gottlieb T, Bradbury R. Prevalence of *Bartonella henselae* bacteremia, the causative agent of cat scratch disease, in an Australian cat population. *Pathology*. **1996**; 28: 262-5
79. Debre R, Lamy M, Jammet M-L, Costil L, Mozziconacci P. La Maladie des griffes de chat. *Bull Mem Soc Med Hop Paris*. **1950**; 66: 76-9
80. Spach DH, Kanter AS, Dougherty MJ, Larson AM, Coyle MB, Brenner DJ, Swaminathan B, Matar GM, Welch DF, Root RK, Stamm WE. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* in inner-city patients with chronic alcoholism. *N Engl J Med*. **1995**; 332: 424-8
81. Drancourt M, Mainardi JL, Broqui P, Vandenensch F, Carta A, Lehnert F, Etienne J, Goldstein F, Acar J, Raoult D. *Bartonella (Rochalimaea) quintana* endocarditis in three homeless men. *N Engl J Med*. **1995**; 332: 419-23
82. Daly JS, Worthington MG, Brenner DJ. *Rochalimaea elizabethae* sp. nov. isolated from a patient with endocarditis. *J Clin Microbiol*. **1993**; 31: 872-81
83. Roux V, Eykyn SJ, Wyllie S, Raoult D. *Bartonella vinsonii* subsp. *Berkhoffii* as an agent of afebrile blood culture-negative endocarditis in a human. *J Clin Microbiol*. **2000**; 38: 1698-700
84. Caceres AG. Geographic distribution of *Lutzomyia verrucarum*, vector of human bartonellosis in Peru. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. **1993**; 35: 485-90
85. Matar GM, Swaminathan B, Hunter SB, Slater LN, Welch DF. Polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism analysis of a fragment of the ribosomal operon from *Rochalimaea* species for subtyping. *J Clin Microbiol*. **1993**; 31:1730-4
86. Waldvogel K, Regnery RL, Anderson BE, Caduff R, Nadal D. Disseminated Cat-scratch disease: detection of *Rochalimaea henselae* in affected tissue. *Eur J Pediatr*. **1994**; 153: 23-7
87. Tappero JW, Koehler JE, Berger TG, Cockerell CJ, Lee T-H, Busch MP, Stites DP, Mohle-Boetani J, Reingold AL, LeBoit PE. Bacillary Angiomatosis and Bacillary splenitis in Immunocompetent Adults. *Ann Intern Med*. **1993**; 118: 363-5
88. Slater LN, Welch DF, Min K-W. *Rochalimaea henselae* causes bacillary angiomatosis and peliosis hepatis. *Arch Intern Med*. **1992**; 152: 602-6
89. Spach DH, Panter LA, Thorning DR, Dunn JE, Plorde JJ, Miller RA. Intracerebral bacillary angiomatosis in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Ann Intern Med*. **1992**; 116: 7440-2
90. Roux V and Raoult D. Inter- and intraspecies identification of *Bartonella (Rochalimaea)* species. *J Clin Microbiol*. **1995**; 33: 1573-9
91. Rodriguez-Barradas MC, Hamill RJ, Houston ED, Georghiou PR, Clarridge JE, Regnery RL, Koehler JE. Genomic fingerprinting of *Bartonella* species by repetitive element PCR for distinguishing species and isolates. *J Clin Microbiol*. **1995**; 33: 1089-93
92. Relman DA, Lepp PW, Sadler KN, Schmidt TM. Phylogenetic relationships among the agent of bacillary angiomatosis, *Bartonella bacilliformis*, and other alpha-proteobacteria. *Mol Microbiol*. **1992**; 6: 1801-7
93. Chang CC, Chomel BB, Kasten RW, Romano V, Tietze N. Molecular evidence of *Bartonella* spp. in questing adult *Ixodes pacificus* ticks in California. *J Clin Microbiol*. **2001**; 39: 1221-6

94. Kerkhoff FT, Bergmans AMC, Van der Zee A, Rothova A. Demonstration of *Bartonella grahamii* DNA in ocular fluids of a patient with neuroretinitis. J Clin Microbiol. **1999**; 37: 4034-8
95. Heller RM, Kubina M, Mariet P, Riegel P, Delacour G, Dehio C, Lamarque F, Kasten RW, Boulouis HJ, Monteil H, Chomel BB, Piemont Y. *Bartonella alsatica* sp. nov., a new *Bartonella* species isolated from the blood of wild rabbits. Int. J. Syst. Bacteriol. **1999**; 49: 283-8
96. Chang CC, Chomel BB, Kasten RW, Heller RM, Ueno H, Yamamoto K, Bleich VC, Pierce BM, Gonzales BJ, Swift PK, Boyce WM, Jang SS, Boulouis HJ, Piemont Y, Rossolini GM, Riccio ML, Cornaglia G, Pagani L, Lagatolla C, Selan L, Fontana R. *Bartonella* spp. isolated from wild and domestic ruminants in North America. Emerg. Infect. Dis. **2000**; 6: 306-11
97. Dehio C, Lanz C, Pohl R, Behrens P, Bermond D, Piemont Y, Pelz K, Sander A. *Bartonella schoenbuchii* sp. nov.; isolated from the blood of wild roe deer. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **2001**; 51: 1557-65
98. Bermond D, Boulouis HJ, Heller RM, Van Laere G, Monteil H, Chomel BB, Sander A, Dehio C, Piemont Y. *Bartonella bovis* Bermond et al. sp. nov. and *Bartonella capreoli* sp. nov., isolated from European ruminants. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **2002**; 52: 383-90
99. Zeaiter Z, Fournier PE, Raoult D. Genomic Variation of *Bartonella henselae* Strains Detected in Lymph Nodes of Patients with Cat Scratch Disease. J. Clin. Microbiol. **2002**; 40: 1023-30
100. La Scola B, Davoust B, Boni M, Raoult D. Lack of correlation between *Bartonella* DNA detection within fleas, serological results, and results of blood culture in a *Bartonella*-infected stray cat population. Clin. Microbiol. Infect. **2002**; 8: 345-51
101. Cachay Diaz H. Verruga peruana or Carrion's disease. Rev Med Cordoba. **1953**; 41: 164-5
102. Kostrzewki J. Epidemiology of trench fever. Med Dosw Mikrobiol. **1950**; 2: 19-51.

7. Anhang

7.1. Publikation

Arvand M, Klose AJ, Schwartz-Porsche D, Hahn H, Wendt C.
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 Pathogenetic for Humans. J.Clin. Microbiol. **2001**; 39: 743-6

7.2. Abkürzungen

A.D.	Aqua destillata
AIDS	acquired Immunodeficiency syndrom
BA	bazilläre Angiomatose
BBFH	Brucella-Broth-Fildes-Hämin
BPH	bazilläre Peliosis hepatis
CSD	Cat Scratch Disease (Katzenkratzkrankheit)
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	entfällt
EKH	Europäisch-Kurzhaar
IFT	Immunfluoreszenztest
K	kontaminiert
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
KW	kein Wachstum
m	Mittelwert
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
n	Anzahl
N.D.	nicht durchgeführt
NaCl	Kochsalz, Natrium Chlorid
OR	Odd's Ratio
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PFGE	Pulsed-Field-Gel-Elektrophorese
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Nährmedium nach Wong (70)
RR	Relatives Risiko
<i>spp.</i>	Spezies
USA	United States of America
\dot{x}	Median
ε	Epsilon, erwartete Genauigkeit
ω	Omega, Richtwert für die Odds Ratio
ψ	Psi, relatives Risiko
λ	Lambda
ξ	Zäta
σ	Sigma, Standardabweichung
δ	Delta, das einem Faktor zuschreibbare Risiko
Σ	Sigma(Großbuchstabe), Summe

7.3. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

7.4. Eidesstattliche Erklärung

Ich, Alexander Klose, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Prävalenz und molekulare Epidemiologie der *Bartonella henselae*-Infektion bei Katzen in Berlin“, die auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt, selbst, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Berlin, den 30.09.2009

Alexander Klose

7.5. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. Mardjan Arvand, die mit viel Engagement, Geduld, ungezählten Gesprächen zur inhaltlichen Durchdringung des Themas und gezielten Ratschlägen zur praktischen und organisatorischen Durchführung sowie unermüdlichen Korrekturhinweisen bei der schriftlichen Abfassung dieser Arbeit entscheidend zu deren Gelingen beigetragen hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dagmar Piske, die mir bei vielen Laborhürden mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei den Tierärztinnen und Tierärzten der Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin, namentlich bei Frau Prof. Dr. med. vet. D. Schwarz-Porsche, sowie bei Frau Karin Bartel, ohne deren beherzte Zugriffe es keine Proben für die Untersuchungen dieser Arbeit gegeben hätte.

Nicht zuletzt danke ich Frau Dr. med. Silke Weixler für mannigfache, teilweise notfallmäßige Beratung, sowie meinem Bruder Burkhardt Klose für pragmatische EDV-Unterstützung.

Schlußendlich gilt mein Dank meinen Eltern, als auch den Dres. Ralph Debbert und Michael Stöhr, die nicht müde wurden, Motivation zur endgültigen Fertigstellung beizusteuern.

Diese Arbeit ist meiner Frau und meinem Sohn gewidmet – Danke...