Genetische Variabilität und molekulare Populationsstruktur von *Bartonella henselae*

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Juliane Völkel

geb. am 23.09.1978 in Haldensleben

im Oktober 2009

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dr. Andreas Podbielski

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universität Rostock

2. Prof. Dr. Hubert Bahl

Institut für Biowissenschaften/Mikrobiologie, Universität Rostock

Wissenschaftliches Kolloquium: 14. Juni 2010, Rostock

urn:nbn:de:gbv:28-diss2010-0108-6

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

1. Arvand M., Viezens J. 2007. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis and multi-locus sequence typing fort he analysis of clonal relatedness among *Bartonella henselae* isolates. *IJMM* **297**: 255-262
2. Viezens J. and Arvand M. 2008. Simultaneous presence of two different copies of the 16S rRNA gene in *Bartonella henselae*. *Microbiology* **154**: 2881-2886

Meinem Mann Christopher

Abkürzungsverzeichnis 7

1. Einleitung 9

1.1 Gattung *Bartonella* 9

1.1.1 Taxonomie und Geschichte der Gattung *Bartonella* 9

1.1.2 *Bartonella* als Krankheitserreger 10

1.1.3 *Bartonella henselae* 11

1.1.4 Erregertransmission 12

1.1.5 Pathogenese 13

1.1.6 Klinik humaner *B. henselae* Infektionen 15

1.1.6.1 *Cat scratch disease* 15

1.1.6.2 Bazilläre Angiomatose (BA) und Peliosis hepatitis (BP) 16

1.1.7 Diagnostik von *Bartonella*-Infektionen 17

1.1.7.1 Kultureller Nachweis 18

1.1.7.2 Serologischer Nachweis 18

1.1.7.3 Molekularbiologischer Nachweis 19

1.1.7.4 Histopathologie 19

1.1.8 Identifizierung und Typisierung von *Bartonella henselae* 19

1.1.8.1 *Multi-locus sequence typing* (MLST) 21

1.1.8.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) 22

1.2 Zielstellung dieser Arbeit 24

***2.* Material und Methoden** *25*

2.1 Bakterien 25

2.1.1 Bakterienstämme 25

2.1.2 Stammhaltung 25

2.1.3 Wachstumsmedien 25

2.1.4 Anzucht der Bakterien 26

2.1.5 Präparation von Einzelkolonien 26

2.2 Oligodesoxynukleotide (Primer) 27

2.3 Chemikalien, Enzyme und verwendete Kits 28

2.3.1 Chemikalien 28

2.3.2 Enzyme 29

2.3.3 Kits 30

2.4 Elektrophoresepuffer und Lösungen für PFGE-Analysen 30

2.5 Molekularbiologische Methoden 31
2.5.1 Herstellung eines DNA-Lysates 31
2.5.2 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen 31
2.5.3 Herstellung von Gensonden 33
2.5.3.1 Markierung von PCR-Amplifikaten 33
2.5.3.2 Markierung von Oligonukleotiden 34
2.5.4 Polymerase Chain Reaktion (PCR) von DNA 34
2.5.4.1 PCR in der *multi-locus sequence typing*-Methode (MLST) 34
2.5.4.2 16S rRNA-typenspezifische PCR 36
2.5.5 Aufreinigung von PCR-Produkten 38
2.5.5.1 Reinigung von PCR-Produkten mittels Anionenaustauschsäulen 38
2.5.6 DNA-DNA-Hybridisierung 38
2.5.6.1 Transfer von Nukleinsäuren (SOUTHERN, 1975) 38
2.5.6.2 DNA-Hybridisierung 39
2.5.7 Chemilumineszenznachweis 40
2.5.8 Wiederverwendung von Nylonmembranen 41
2.6 DNA-Sequenzierung 42
2.6.1 Sequenzierungsreaktion für den ABI310 Genetic Analyzer 42
2.6.2 Aufreinigung der Sequenzierproben für den ABI310 Genetic Analyzer 43
2.6.3 Sequenzierung mit dem ABI 3730 XL 44
2.6.4 Analyse der Sequenzdaten 44
2.7 Klonierung von PCR-Fragmenten 45
2.8 Standard-Agarosegelelektrophorese 45
2.9 Pulsfeld-Gelektrophorese (PFGE) 46
2.9.1 Präparation von DNA-Agaroseblöckchen 46
2.9.2 Lysozymverdau der in Agarose eingebetteten DNA 47
2.9.3 Proteinase K-Verdau der in Agarose eingebetteten DNA 47
2.9.4 Durchführung der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) 48
2.10 Größenbestimmung von Nukleinsäurefragmenten 49
3. Ergebnisse *51*
3.1 Multi-locus sequence typing von *B. henselae*-Isolaten *51*
3.1.1 Evaluation des *eno*-Gens 55
3.1.2 Geographische Verteilung der MLST-Sequenztypen 56
3.1.3 Verteilung der Sequenztypen zwischen humanen und felinen *B. henselae*-Isolaten 60
3.1.4 Klonale Verwandtschaft der humanen und felinen *B. henselae*-Isolaten 62

3.2 Untersuchungen zur klonalen Verwandtschaft von *B. henselae*-Isolaten mit der Pulsfeld-Gelelektrophorese-Analyse **66**

3.2.1 Klonale Analyse der *B.henselae*-Isolate nach der Restriktion mit *Sma*I und *Not*I 68

3.2.2 Klonale Analyse der *B.henselae*-Isolate nach der Restriktion mit *Apa*I, *Eco*52I und *XmaJI* 70

3.2.3 Vergleich PFGE und MLST in der klonalen Verwandtschaftsanalyse innerhalb von *Bartonella henselae* 71

3.2.4 PFGE-Analyse von *B. henselae*-Primärisolaten 73

3.2.5 MLST-Analyse der PFGE-Varianten innerhalb von Primärisolaten von *B. henselae* 76

3.3 16S rDNA-Amplifikation und -Sequenzierung **76**

3.3.1 Zwei unterschiedliche Nukleotidsequenzen der 16S rDNA in *B. henselae* 77

3.3.2 Bestimmung der 16S rDNA-Genkopienanzahl 77

3.4 Differenzierung der *B. henselae*-Isolate durch 16S rDNA-typenspezifische PCR **80**

4. Diskussion ***82***

4.1 MLST-Analyse von *B. henselae*-Isolaten **82**

4.1.1 Geographische Verteilung der *B. henselae*-Sequenztypen 84

4.1.2 Korrelation zwischen Wirtsspezies und *B. henselae*-Sequenztyp 84

4.1.3 Phylogenetische Untersuchungen der *B. henselae*-Sequenztypen 86

4.1.4 MLST als Methode der Genotypisierung von *B. henselae*-Isolaten 87

4.2 PFGE-Analyse von *B. henselae* **88**

4.2.1 Evaluation verschiedener Restriktionsenzyme für die Verwandtschaftsanalyse von *B. henselae* mittels PFGE 89

4.2.2 Genetische Varianten von *B. henselae*-Primärisolaten 90

4.3. Analyse des 16S rDNA Gens von *Bartonella henselae* 91

5. Zusammenfassung **92**

6. Summary **94**

Literaturverzeichnis **935**

Anhang **111**

Eidesstattliche Erklärung **126**

Danksagung **127**

Lebenslauf **128**

Publikationen **129**

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µ	mikro-
A	Adenin
A. tumefaciens	*Agrobacter tumefaciens*
Abb.	Abbildung
Ad	zum angegebenen Volumen auffüllen
AIDS	aquired immuno-deficiency syndrome
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
Aq. dest.	zweifach destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
BA	Bazilläre Angiomatose
B. henselae	*Bartonella henselae*
B. quintana	*Bartonella quintana*
B. vinsonii	*Bartonella vinsonii*
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaar(e)
BP	Bazilläre Peliose
C	Cytosin
CSD	*Cat scratch desaese*
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2′-(5′-Chloro)Tricyclo-[3.3.1.1.^{3,7}] Decan}-4-yl) Phenylphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
ddUTP	Didesoxyuridinphosphat
dest.	einfach destilliert
DIG	Digoxigenin
DNA	*desoxyribonucleid acid* =Desoxyribonukleinsäure**E**
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et.al.	*et allii*
EtBr	Ethidiumbromid
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
H_2O	Wasser
HCL	Chlorwasserstoffsäure
HIV	*human immundeficiency virus*
k	kilo-
kb	Kilobasebpaar(e)
KKK	KatzenKratzKrankheit
l	Liter
M	molar
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
min	Minute

ml	Milliliter
mm	Millimeter
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
Nr.	Nummer
PCR	*polymerase chain reaction*
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pmol	Picomol
Pu	Purin
Py	Pyrimidin
rpm	*rounds per minute* = Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
spp.	Spezies
SSC	Natriumcitrat
T	Thymin
T_m	Schmelztemperatur
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
U	Uracil
UV	Ultraviolettes Licht
ü.N.	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Masse pro Volumen

1. Einleitung

1.1 Gattung *Bartonella*

1.1.1 Taxonomie und Geschichte der Gattung *Bartonella*

Die Gattung *Bartonella* aus der Familie der *Bartonellaceae* gehört der α2-Untergruppe der Proteobakterien an (Birtles *et al*., 1995). Bartonellen sind gramnegative, leicht gebogene Stäbchen, welche keine Katalase- und Oxidaseaktivität besitzen. Die Gattung zeichnet weiterhin die aerobe-mikroaerophile Wachstumsbedürfnisse und eine kreiselnde Beweglichkeit, die durch Flagellen vermittelt wird, aus. Seit 1991 wurden durch Umklassifizierung und Neuentdeckung 19 Spezies dieser Gattung zugeordnet (O´Connor *et al*., 1991; Brenner *et al*., 1993). So wurde unter anderem die Gattung *Rochalimea* nach molekularbiologischen Vergleichsanalysen (16S-rRNA-Gensequenz-Vergleichen, DNA-Hybridisierungen) mit *Bartonella bacilliformis* in die Gattung *Bartonella* aufgenommen. Seit 1995 wird auch die Familie der *Grahamellen* mit den Spezies *Grahamella talpae* und *G. peromysci* zu den *Bartonellaceae* gezählt (Birtles *et al*., 1995).

In den letzten Jahren ist die Anzahl der neuentdeckten Spezies angestiegen. Exemplarisch dafür wären die Spezies *B. doshiae, B. grahamii*, *B. taylorii* und insbesondere *B. vinsonii* subs. *berkhoffii* zu nennen, die wahrscheinlich die Zecke (*Ixodus ricinus*) als Übertragungsvektor nutzt (Birtles *et al*., 1995; Kordick *et al*.; 1996, Pappalardo *et al*., 1997). Von besonderer klinischer Bedeutung sind weiterhin *B. clarridgeae* und *B. alsatica* (Lawson *et al*., 1996; Heller *et al*., 1997).

Die Beschreibung neuer Spezies dauert bis heute an, da durch verbesserte Kultivierungs- und Analysetechniken erst jetzt eine zuverlässige Systematisierung dieser anspruchsvollen Mikroorganismen möglich ist. So konnten in jüngerer Zeit in Blutkulturen von Rehen aus dem Gebiet Schönbuch (Tübingen, Deutschland) und bei Rehen aus Frankreich die neuen Arten *B. schoenbuchii* und *B. capreoli* isoliert und angezüchtet werden (Dehio, 2001; Bermond *et al*., 2002). Nach heutigem Wissensstand sind von den 19 Spezies der Gattung *Bartonella* acht Arten humanpathogen, wobei vor allem die Arten *B. bacilliformis, B.quintana* und *B. henselae* (Tab.1) für die überwiegende Zahl der Infektionen verantwortlich sind.

Tab. 1: Humanpathogene *Bartonella*-Spezies

***Bartonella*-Spezies**	**Reservoir**	**Vektor**	**Erkrankung**
B. bacilliformis	Mensch	Sandfliege	Oroya-Fieber, Verruga peruana
B. quintana	Mensch	Kleiderlaus	Fünftagefieber, BA/Endokarditis
B. henselae	Katze	Katzenfloh	Katzenkratzkranheit, BA/Endokarditis
B. elisabethae	Ratte	?	Endokarditis, Neuroretinitis
B. clarridgeae	Katze	Katzenfloh	Katzenkratzkrankheit
B. grahamii	Maus	?	Neuroretinitis
B. vinsonii subsp. *arupensisi*	Maus	?	Fieber, Bakterämie
B. vinsonii subsp. *berkhoffii*	Hund	Zecken(?)	Endokarditis
B. washoensis	Erdhörnchen	?	Endokarditis

1.1.2 *Bartonella* als Krankheitserreger

Die höchste klinische Relevanz innerhalb der Gattung *Bartonella* besitzt *B. bacilliformis* (Ihler, 1996). Es ist vor allem als Erreger der Carrion´schen Krankheit bekannt, deren Auftreten auf das Gebiet der Anden, insbesondere Peru beschränkt ist. Grund dafür ist das endemische Vorkommen des Übertragungsvektors der Sandmückenart *Lutzomyia verrucarum*. Die Infektion kann in zwei klinischen Varianten auftreten:

1. Das Oroya-Fieber, eine akute hämolytische Anämie, die durch eine Invasion des Erregers in die Erythrocyten verursacht wird.
2. „Verruga peruana“, die dem Oroya-Fieber nachfolgen kann, zeichnet sich durch tumoröse Hautläsionen aus, die aus proliferierten Endothel- und Epithelzellen bestehen.

B. quintana verursacht das 5-Tage-Fieber („Schützengrabenfieber“), das sich durch rezidivierendes hohes Fieber manifestiert und Kopfschmerz, aseptische Meningitis und weitere unspezifische Symptome zeigt. Hierbei fungiert die Körperlaus (*Pediculus humanus*) als Übertragungsvektor. Im 1. Weltkrieg führte dieser Erreger zu über eine Million Todesfällen unter den Soldaten (Tompkins, 1997). Nach einem vorübergehenden massiven

Rückgang der *B. quintana* Infektionen wurden in den letzten Jahren wieder zunehmend Fälle vor allem bei Obdachlosen beschrieben (Spach *et al*., 1995; Foucault *et al*., 2002).
Des Weiteren wurde eine Reihe von Bartonellen wie *B. henselae, B. quintana, B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* und *B. elisabethae* als Erreger der humanen Endocarditis beschrieben (Matar *et al*., 1999; Roux *et al*., 2000; Fournier *et al*., 2001).

1.1.3 *Bartonella henselae*

1990 wurde *Bartonella henselae* aus dem Blut eines HIV-Infizierten Patienten isoliert und erstmals als Ursache von Fieber und Bakteriämie beschrieben, wobei die von *B. henselae* ausgelösten klinischen Erscheinungsbilder wie die bazilläre Angiomatose sowie die bazilläre Peliosis hepatitis schon länger bekannt waren (Relman *et al*., 1990; Slater *et al*., 1990; Schwartzman *et al*., 1992; Regnery *et al*., 1995). Der französische Augenarzt Henri Parinaud brachte bereits 1889 das okuloglanduläre Syndrom in Zusammenhang mit Tierkontakten und Robert Debre beschrieb 1932 regionale Lymphadenopatien bei von Katzen verursachten Hautläsionen. Der Begriff „Katzenkratzkrankheit“ (KKK) wurde 1950 von Debre und Lamy geprägt (Emmons *et al*., 1976).

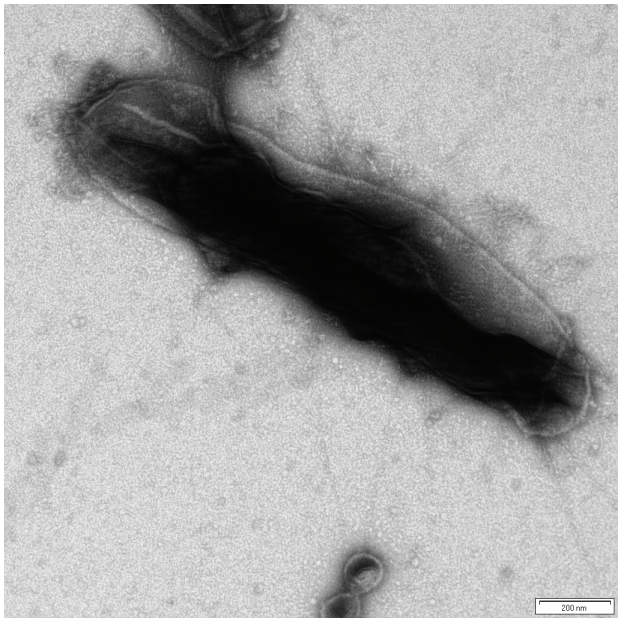


Abb. 1: *Bartonella henselae* Berlin 2

Der als „*emerging pathogen*“ bezeichnete Keim *Bartonella henseleae* (Koehler *et al*., 1992; Anderson *et al*., 1997) ist ein gramnegatives, fakultativ aerobes, pleomorphes Bakterium. Die Zellen, die eine Länge von 1,7 - 2,2 µm und eine Breite von 0,2 - 0,5 µm besitzen (Abb.1), zeigen ein optimales Wachstum bei einer Temperatur von 37 °C, 5 % CO_2 Gehalt und 80 % Luftfeuchtigkeit. Die Generationszeit beträgt unter diesen Bedingungen mindestens 10 Stunden. *B. henseleae* ist bezüglich seiner biochemischen Leistungen relativ inert, Urease-, Oxidase- und Katalasenegativ. Die Kohlenstoffquellen Indol und Glucose können von den Zellen nicht verwertet werden. Daher erfolgt die Kultivierung dieser anspruchsvollen Bakterien am besten auf häminhaltigem Agar (Schokoladen- oder Columbiaagar mit 5 % fibrinfreien Blut) oder in Zellkultur (Regnery *et al*., 1992; Larson *et al*., 1994; Schmidt *et al*., 1996; Brenner *et al*., 1997; Sander *et al*., 1998). Die Anzucht in Flüssigkultur ist nicht geeignet (Schwartzman *et al*., 1993; Wong *et al*., 1995).

Auf Blutagar-Kulturen erscheinen nach 12 - 14-tägiger Inkubation von Erstisolaten kleine weiße Kolonien. Die langwierige Anzuchtphase dieser Primärkulturen aus Blut oder inneren Organen erschwert die Arbeit mit Bakterien der Gattung *Bartonella*. Fortlaufendes Passagieren der Isolate verkürzt die Anzucht auf 3 - 5 Tage, was jedoch eine Änderung der Morphologie zur Folge hat. So weist das äußere Erscheinungsbild des pilierten *B. henselae*-Erstisolates eine raue Oberfläche auf („*rough form*“) während nach mehreren Passagen nicht-pilierte Zellen entstehen, welche schleimige und flache Kolonien bilden („*smooth form*“) (Batterman *et al*., 1995).

Fakultativ lebt der Erreger intrazellulär in Endothelzellen, konnte aber auch in einer Reihe anderer Zelltypen wie Epithelzellen, Zellen des felinen Zentralen Nervensystems und murinen Makrophagen nachgewiesen bzw. kultiviert werden (Conley *et al*., 1994; Batterman *et al*., 1995; Dehio *et al*., 1997; Kempf *et al*., 2001; Munana *et al*., 2001; Musso *et al*., 2001).

Die Größe des Genoms von *B. henselae* umfasst 1,93 x 10^6 Basenpaare. Neben der chromosomalen DNA konnten in *B. henselae* und *B. bacilliformis* zusätzlich noch mehrere 40 nm große Phagenpartikel und eine 40 kb große extrachromosomale doppelsträngige DNA aufgezeigt werden (Anderson *et al*., 1994, Unemori *et al*., 1992).

1.1.4 Erregertransmission

Das natürliche Reservoir von *B. henselae* ist die Hauskatze, wobei streunende Tiere eine höhere Durchseuchung aufweisen als domestizierte Populationen (Regnery *et al*., 1992;

Chomel *et al*., 1995). Von verschiedenen Säugetieren wurden alle anderen *Bartonella*-Arten aus Blutkulturen (meist intrazellulär) isoliert. Jüngste Untersuchungen konnten serologisch nachweisen, dass Bartonella-Antikörper auch in Leopard, Tiger, Löwe und Puma vorkommen (Yamamoto *et al*., 1998), wobei keine nähere Charakterisierung erfolgte. Die Erkrankung durch dieses Pathogen kann somit als Zoonose angesehen werden (Freeland *et al*., 1999).
Die Katzen tragen den Krankheitserreger oft mehrere Monate asymptomatisch im Blut (Sander *et al*., 1997). Die Übertragung der Bakterien von Katze zu Katze findet indirekt durch den Katzenfloh *Ctenocephalides felis* statt (Tappero *et al*., 1993; Koehler *et al*., 1994; Tompkins, 1994; Chomel *et al*., 1996). Ebenso gesichert ist die Infektiösität des Flohfaeces, welcher sich im Fell flohbefallener Katzen anreichert (Chomel *et al*., 1996). Weiterhin ist die Übertragung durch blutsaugende Arthropoden wie der Holzbock *Ixodes ricinus* möglich, da der Erreger intrazellulär in den Katzenerythrocyten vorliegt (Kordick *et al*., 1995; Rolain *et al*., 2001; Schülein *et al*., 2001; Sanogo *et al*., 2003).
Kordick *et. al.* konnten zeigen, dass bei Patienten mit *Cat scratch desease* (CSD, siehe 1.1.6.1) 89 % der untersuchten Katzen mit Kontakt zu den Patienten seropositiv waren (Kordick *et al*., 1995).
Die Infektion des Menschen erfolgt direkt durch Kratzer, Bisse oder Lecken der Katzen, aber auch durch den Biss des Katzenflohs. Eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch wurde noch nicht beobachtet.

1.1.5 Pathogenese

Durch *Bartonellen* hervorgerufene Erkrankungen können sich in einer Vielzahl klinischer Manifestationen äußern z. Bsp. *Catch scratch disease* (CSD), bazilläre Angiomatose, bazilläre Peliosis, Ostitis und Enzephalitis (Koehler *et al*., 1992; Schwartzman *et al*., 1992; Webster *et al*., 1992; Golden *et al*., 1993; Manders, 1996; Demple, 1999; Maeno *et al*., 1999; Maeno *et al*., 2002). Diskutiert wird auch die Beteiligung an weiteren Erkrankungen wie der Ileitis, Leber- und Milzabzessen, persistierendem Fieber, der „kultur-negativen“ Endokarditis sowie neurologische Komplikationen, die sich als Myelitis, Polyneuritis oder aseptischer Menigitis darstellen (Koehler *et al*., 1992; Schwartzman 1992; Webster *at al*., 1992; Golden 1993; Monteil *et al*., 1994; Manders 1996; Demple 1999; Maeno *et al*., 1999; Maeno *et al*., 2002;).

Zu Beginn einer Infektion kommt es typischerweise zu einer granulomatösen abszedierenden Lymphadenitis der regionalen Lymphknoten. Bei einem systemischern Verlauf kann es zu einer Verschleppung des Erregers in tiefere Lymphknoten und im Weiteren zu einer Ansiedlung in allen Organen kommen. Die Folge ist die Bildung von Nekrosen im Zentrum der Läsionen. Zudem wurde gezeigt, dass *B. henselae* angioproliferativ endotheliales Tumorwachstum auslöst. In diesem Zusammenhang wird spekuliert, ob der Erreger sich damit eine optimale Umgebung schafft (Kempf *et al*., 2001; Kempf *et al*., 2002), da auch eine Zunahme der Replikationsrate nach der Invasion der Endothelzellen beobachtet werden konnte (Kempf *et al*., 2000).

Fallstudien zeigten, dass die schwersten klinischen Symptome bei Patienten mit geschwächter zellulärer Immunität z. Bsp. nach Organtransplantationen oder mit HIV-positiven Befund auftreten (Wong *et al*., 1995; Ahsan *et al*., 1998; George *et al*., 1998; Warren *et al*., 1998).

Durch die persistierenden Bakteriämien des Erregers bei Immunsupprimierten und bei Immunkompetenten wurde die Hypothese der intrazellulären Persistenz untersucht (Relman *et al*., 1990; Slater *et al*., 1990; Margileth, 1993). Gestützt wird diese Annahme dadurch, dass eine therapeutische Wirksamkeit nur bei Antibiotika vorliegt, die auch die Zellen penetrieren. Bestärkt wird die Hypothese weiterhin dadurch, dass die Infektion häufig rezidiviert und größere Keimzahlen aus Blutkulturen durch Verwendung eines Lysezentrifugationsschrittes im Vergleich zum konventionellen Ausplattieren erreicht wurden (Beg *et al*., 1996).

Über die Pathogenitätsmechanismen von *B. henselae* ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch sehr wenig bekannt. Bisher weiß man, dass *B. henselae* in der Lage ist, Pili zu exprimieren, die ihn zur Adhäsion an und Invasion in Wirtszellen befähigen. Jedoch verliert *B. henselae* nach langen Passagieren die Fähigkeit zur Pili-Ausbildung, es durchläuft eine sogenannte Phasenvariation. In Folge dessen zeigen diese Bakterien eine deutlich geringere Infektiösität (Arends *et al*., 1991). Ein anderer wichtiger Pathogenitätsmechanismus sind die vorhandenen *virB*-Gene, welche die Ausbildung eines Typ IV-Sekretionssystems mit Homologien zu einem entsprechenden System von *Agrobakterium tumefaciens* ermöglichen (Lai *et al*. 2000). Mit Hilfe dieses Systems können Proteine oder an Translokationsproteine gebundene Einzelstrang-DNA in die Wirtszelle transferiert werden.

Die Wirtsabwehr gegen *B. henselae* beruht auf einer komplementvermittelten Zytolyse des Bakteriums (Rudel *et al.* 1997). Durch die Bindung von C3 wird der alternative Weg der Komplement-Aktivierung initiiert. Aber auch ohne die Anwesenheit eines spezifischen Antikörpers konnte *B. henselae* den klassischen Weg der Komplement-Aktivierung auslösen.

Induziert durch infizierte Zellen wurde zudem eine verstärkte Produktion von Zytokinen und Interleukinen (IL 8) beobachtet (Kempf *et al*., 2001; Resto-Ruiz *et al*., 2002). Die Induktion von Zytokinen könnte eine wichtige Rolle bei infektions-bedingten Gefäßproliferation spielen (Fischer *et al*., 2001).

1.1.6 Klinik humaner *B. henselae* Infektionen

Die klinisch relevantesten Formen von *B. henselae*-Infektionen ist die *Cat scratch disease* (CSD, Katzenkratzkrankheit) (Debré, 1950) sowie die Endokarditis, Enzephalitis und Osteomyelitis, die sich als Komplikation entwickeln und manifestieren können. Weiterhin sind die bazilläre Angiomatose und die Peliosis hepatitis, die einen schweren Krankheitsverlauf zeigen, zu nennen.

1.1.6.1 *Cat scratch disease*

Die *Cat scratch disease* wurde 1950 erstmalig von Debré und Lamy beschrieben und gilt als eine der möglichen Verlaufsformen einer *B. henselae*-Infektion beim Menschen (Debré, 1950). In der Regel tritt diese Erkrankung bei immunkompetenten Patienten auf. Vor allem Kinder und Jugendliche erkranken an CSD (Jackson *et al*., 1993). Typischerweise äußert sich eine Erkrankung in Form einer schmerzhaften Lymphadenopathie des Lymphknotens, der die Stelle des Katzenkratzers oder -bisses drainiert. Histologisch sind diese Lymphknoten durch granulomatöse Strukturen und Abszesse gekennzeichnet. Die befallenen Lymphknoten durchlaufen typischerweise drei unterschiedliche Entwicklungsstadien. Zu Beginn treten eine Hyperplasie der Keimzentren und epitheloidzellige Granulome auf. Häufig können auch Langhans´sche Riesenzellen beobachtet werden. Im zweiten Stadium kommt es zu einer Erhöhung der Anzahl der Granulome, im Weiteren zu einer Fusion. Diese fusionierten Granulome werden von polymorphkernigen Leukozyten infiltriert (Sander *et al*., 1998). Es bilden sich in der Folge zentrale Nekrosen mit progressiver Einschmelzung. Das dritte Stadium ist gekennzeichnet durch eitergefüllte Sinus und durch die Gefahr einer Eiterentleerung in das umliegende Gewebe bei einer vorliegenden Kapselruptur (Kaschula, 1996).

Mehr als die Hälfte der CSD-Patienten klagen über Fieber, Kopfschmerzen und Übelkeit. Aber auch Gewichtsverlust, Halsschmerzen und Splenomegalie können sich im

Krankheitsverlauf entwickeln (Carithers *et al*., 1985; Anderson *et al*., 1997). In 10 % der Fälle kommt es zu atypischen Manifestationen, die fast jedes Organ betreffen können. Häufig kommt es zu dem Parinaud´schen okuloglandulären Syndrom, einer Konjunktivitis mit präaurikularer Lymphadenopathie, der Enzephalitis, zerebraler Arteriitis, Myelitis, granulomatöser Hepatitis, atypischer Pneumonie oder Osteomyelitis (Schwartzman *et al*., 1992; Golden, 1993; Margileth, 1993; Kempf *et al*., 2001). Das klinische Spektrum der schweren möglichen Komplikationen ist sehr breit.

Für die Behandlung von *B. henselae*-Infektionen fehlen jedoch Daten aus kontrollierten Studien. Penicilline und Cephalosporine haben sich trotz in-vivo-Wirkung als klinisch unwirksam erwiesen. Mit unterschiedlichem Therapieerfolg wurden Chinolone und Trimethoprim-Sulfamethoxazol eingesetzt. Empfohlen werden deshalb bei schweren *B. henselae*-, aber auch bei *B. quintana*-Infektionen Makrolide, alternativ auch Doxycyclin oder Rifampicin. Dagegen ist die unkomplizierte CSD eine „gutartige" Erkrankung, welche ohne Antibiotikabehandlung spontan in sechs bis zwölf Wochen ausheilt.

1.1.6.2 Bazilläre Angiomatose (BA) und Peliosis hepatitis (BP)

Bei immunsupprimierten, insbesondere HIV-Patienten, kommt es in der Regel zu einer anderen Manifestation der *B. henselae* Infektion als bei immunkompetenten Personen (Stoler *et al*., 1983; Cockerell *et al*., 1987; Cockerell *et al*., 1990). In diesen Fällen werden durch *B. henselae* angioproliferative Prozesse ausgelöst, die zur Bildung von Tumoren führen. Dabei werden ungeordnete Ansammlungen von Endothelzellen in der Haut als bazilläre Angiomatose (BA, Abb. 2), in inneren Organen wie der Leber oder der Lunge als bazilläre Peliosis (BP) bezeichnet (Stoler *et al*., 1983; Cockerell *et al*., 1987; LeBoit *et al*., 1989).

Die indizierte Behandlung ist eine Antibiotikabehandlung mit Makroliden oder Doxycyclin, die zu einer vollständigen Rückbildung der Gefäßtumore führt. Remissionsraten, die mit 30 % bis 100 % angegeben werden, zeigen jedoch die Schwierigkeit einer erfolgreichen Therapie (Plettenberg *et al*., 2000, Webster *et al*., 1992).

Abb. 2: Kutane Form der Bazillären Angiomatose bei einem HIV-Patienten

1.1.7 Diagnostik von *Bartonella*-Infektionen

Bereits früh nach der Erstbeschreibung der CSD entwickelten Hanger und Rose 1946 auf Basis von Lymphknotengewebeproben erkrankter Patienten einen nach ihnen benannten Hauttest (Hanger und Rose, 1946). Dabei erkannten sie die Katzenkratzkrankheit als infektiöses Ereignis und konnten mit dem Eiter aus befallenen Lymphknoten bei den entsprechenden Patienten einen positiven Hauttest hervorrufen.
Anderson und Neumann erweiterten die Kriterien für eine positive CSD-Diagnose, wobei mindestens drei erfüllt sein mussten (Anderson und Neuman, 1997):

1. Kratzer oder Bisse einer Katze
2. positiver Hauttest
3. regionale Lymphknotenschwellung mit Ausschluss aller anderen in Betracht kommender Erreger bzw. sonstiger entzündlicher oder proliferativer Erkrankungen
4. charakteristische histopathologische Lymphknotenveränderungen.

Nachdem zuverlässige serologische und molekularbiologische Nachweismethoden entwickelt und etabliert wurden, kann heute auf den umstrittenen Hauttest verzichtet werden.

1.1.7.1 Kultureller Nachweis

Der kulturelle Nachweis erfolgt vorwiegend durch Inkubation der befallenen Wirtszellen auf Blutagarplatten bei 37 °C und 5 % CO_2 (siehe 1.1.3). Meist werden Erstisolate von *Bartonella henselae* von immunsupprimierten Patienten (z.B. HIV, AIDS) gewonnen und angezüchtet. In seltenen Fällen gelang auch die Isolation der Erreger von immunkompetenten Patienten mit CSD. Nach einem Zeitraum von 1 bis 3 Wochen erscheinen raue, kleine, am Agar adhärierende Kolonien. Durch den langwierigen Prozess der Anzucht sind kulturelle Nachweisverfahren für *Bartonella*-Isolate allerdings den serologischen bzw. molekularbiologischen Methoden unterlegen.

1.1.7.2 Serologischer Nachweis

Gegenwärtig stellen serologische Nachweisverfahren die Methode der Wahl zur Diagnose der CSD dar. Die Antikörper werden dabei mittels indirekter Immunfluoreszenz (IFT, Abb. 3), ELISA oder Western Blot nachgewiesen. Der Immunfluoreszenztest mit einer Sensitivität von 98 – 100 % und einer Spezifität von 60 – 98 % liefert hierbei die zuverlässigsten Ergebnisse (Zangwill *et al*., 1993; Barka *et al*., 1993; Raoult *et al*., 1994; Dalton *et al*., 1995; Demers *et al*., 1995; Szelc-Kelly *et al*., 1995; Nadal und Zbinden, 1995; Sander *et al*., 1998). Allerdings zeigen die Antikörper in 95 % der Fälle Kreuzreaktionen zwischen *B. henselae* und *B. quintana* auf (Sander *et al*., 1998).
Erste Verlaufskontrollen zeigen, dass der Antikörpertiter schon innerhalb weniger Monate unter die Nachweisgrenze absinken kann. Somit kann man nicht von einer lebenslangen Immunität nach einer CSD-Infektion ausgehen.

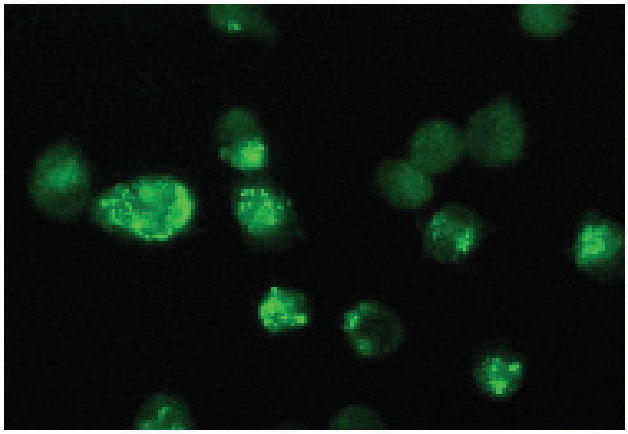


Abb. 3: Immunfluoreszenztest bei einem Patienten mit CSD

1.1.7.3 Molekularbiologischer Nachweis

Eine spezifische und schnelle Methode zum Erregernachweis der *Bartonella* spp. ist die spezifische Polymerasekettenreaktion (PCR). Aus frischen aber auch aus formalinfixierten Gewebeproben kann der DNA-Nachweis durch die Amplifikation des *htrA*-Genes und anschließender Sequenzierung oder Hybridisierung (Southern Blot) erfolgen (Anderson *et al*., 1994; Bergmans *et al*., 1995; Sander *et al*., 1999; Goldenberger *et al*., 1997; Mouritsen *et al*., 1997).

1.1.7.4 Histopathologie

Im Anfangsstadium einer CSD-Erkrankung können Einschmelzungen von zentralen Nekrosen betroffener Gewebe sonographisch erkannt und durch Punktion entlastet werden (s. 1.1.6.1) Gelegentlich sind die Erreger durch die Warthin-Starry-Silberfärbung in Gewebeproben lichtmikroskopisch nachweisbar. Eine Tuberkulose kann jedoch histopathologisch nicht von der CSD unterschieden werden. Hier müssen deshalb molekularbiologische Nachweismethoden zum Einsatz kommen.

1.1.8 Identifizierung und Typisierung von *Bartonella henselae*

Aufgrund der schwierigen und langwierigen Anzucht von *Bartonella*-Spezies aus Gewebeproben von CSD- und HIV-infizierten Patienten ist nur sehr wenig über die Prävalenz von *B. henselae*-Varianten bekannt. Dennoch ist die genaue Typisierung von *B. henselae* von enormer Bedeutung für das Verständnis der Epidemiologie von CSD, BA und BP. Nur so ist es möglich, die komplexen Zusammenhänge der Pathogenese und der Transmission zwischen den verschieden Wirten aufzuklären.
Regnery und Arbeitskollegen etablierten RFLP-Analysen (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus) von PCR-Fragmenten des Citratsynthase-Gens als eine Methode zur Identifikation von kultivierbaren *B. henselae*-, *B. quintana*- und *B. vinsonii*-Isolaten (Regnery *et al*., 1992). Diese Technik erlaubt jedoch keine Differenzierung unterschiedlicher *B. henselae*-Stämme.

Sensibler ist die RFLP-Analye der 16S-23S rDNA intergenen Spacerregion. Sie zeigte laut Matar und Kollegen sieben verschiedene Bandenmuster bei 11 untersuchten *B. henselae*-Isolaten (Matar *et. al.,* 1993). Die Kombination von *Repetitive Extragenic Palindromic* (REP)- und *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC) -PCR ermöglicht ebenfalls eine Differenzierung von 17 Isolaten in fünf charakteristische Bandenmuster (Rodriguez-Barradas *et al*., 1995). Diese Typisierungsmethoden können jedoch nur bei bereits kultivierten *B. henselae*-Isolaten angewendet werden. Zum direkten Erregernachweis aus Gewebeproben sind diese Methoden allerdings ungeeignet.

Zur Lösung des Problems wurden partielle 16S rDNA-Gensequenzen analysiert (Bergmans *et. al.*, 1995). Diese Studie gab erste Hinweise auf die genetische Variabilität von *B. henselae*-Isolaten und es konnte erstmals die Prävalenz zwei verschiedener *B. henselae*-Varianten in acht CSD-Patienten direkt gezeigt werden. Die Arbeitsgruppe Bergmans entwickelte 1996 basierend auf den 16S rDNA Gensequenzen zwei typenspezifische PCR´s, die es ermöglichten, *B. henselae*-Isolate in zwei unterschiedliche Varianten, Genotyp I oder Genotyp II, einzuordnen (Bergmans *et al*., 1996). Repräsentiert werden beide Genotypen jeweils durch humanpathogene Isolate. Der Stamm Houston-1^T repräsentiert den Genotyp I, während der Stamm Marseille den Genotyp II darstellt. Die Unterscheidung zwischen Typ I und II basiert auf einem 3 bp Nukleotidunterschied inklusive einem *gap* in der Nukleinsäuresequenz (Abb. 4) an der Position 173 bis 176 in der 16S rRNA-Gensequenz (bezogen auf die 16S rRNA-Gensequenz Houston-1^T, Ac. Nr. M73229).

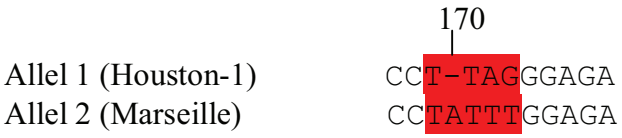


Abb. 4. Darstellung des 3bp-Allelpolymorphismus in der Nukleinsäuresequenz des 16S rDNA-Gens von *B. henselae*

Damit war es nun möglich eine Bakterien-Typisierung direkt an Proben von CSD-Patienten durchzuführen. Eine Kultivierung des Erregers zur genauen Differenzierung war nun nicht mehr notwendig. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist die 16S rRNA-Analyse eine etablierte molekularbiologische Methode bei der Identifizierung und Klassifizierung von *B. henselae*. Korrespondierend zu dieser Studie konnte La Scola zeigen, dass die verschiedenen Genotypen mit den klassifizierten Serotypen übereinstimmen (La Scola *et al*., 2002). Laut Bergmans und Kollegen besitzt Genotyp I, identifiziert in 82 % aller humanen Isolate, eine stärkere

Prävalenz als Genotyp II (Bergmans *et. al.*, 1996; Gurfield *et al.*, 1997; Heller *et al.*, 1997; Sander *et al.*, 1997; Sander *et al.*, 1998).
Die Existenz der beiden distinkten Varianten könnte laut Yamamoto ein möglicher Grund für auftretende Reinfektionen bereits wieder gesundeter Katzen sein (Yamamoto *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 1998).
Die Entwicklung des *multi-locus sequence typing* (MLST) zeigte jedoch, dass die Sensitivität der 16S rDNA-PCR-Methode für die Untersuchung der klonalen Populationsstruktur von *B. henselae* ungenügend ist (Iredell *et al.*, 2003). Diese Methode beruht auf der Sequenzierung neun verschiedener *„housekeeping"* Gene. Die untersuchten *B. henselae*-Isolate konnten so in sieben verschiedene Sequenztypen eingeteilt werden. Eine aktuell stark diskutierte Weiterentwicklung dieser MLST-Analyse, stellen die *multispacer typing* (MST) und die *multilocus variable number tandem repeat analysis* (MLVA) Technik dar, welche soffenbar ein noch höheres Diskriminierungsvermögen aufweisen, aber noch weiter evaluiert werden müssen, da die Anzahl der untersuchten Isolate noch nicht für eine abschließende Bewertung dieser Methoden ausreicht (Li *et al.*, 2006; Monteil *et al.*, 2007).
Eine weitere Methode zur Genotypisierung stellt die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), dar. Sie gilt als Beispiel für eine *band-based* Typisierungsmethode bei der Differenzierung von *B. henselae*-Isolaten und wird als die evaluierte *„golden standard"* Methode mit dem bis jetzt größten Diskriminierungspotential und einer sehr guten Reproduzierbarkeit angesehen.

1.1.8.1 *Multi-locus sequence typing* (MLST)

Multi-locus sequence typing wurde 1998 durch Maiden *et al.* als eine sequenzbasierte Typisierungsmethode entwickelt (Maiden *et al.*, 1998). Durch die Analyse der partiellen Gensequenzen von 6 bis 9 verschiedenen *„housekeeping"* Genen gelang es eine schnelle und exakte Methode zur Genotypisierung zu etablieren (Maiden *et al.*, 1998; Cooper und Feil, 2004; Feil *et al.*, 2004). Das MLST-Schema für *B. henselae* wurde 2003 durch Iredell und Kollegen für die Untersuchungen einer Bakterienpopulation bestehend aus felinen und humanen Isolaten in Australien entwickelt *(*Iredell *et al., 2003)*. Wie bereits erwähnt wurden neun verschiedene Gene einschließlich des 16S rRNA-Genlokus untersucht und es konnten sieben Sequenztypen definiert werden.
Das MLST klassifiziert Sequenztypen (ST) und führt zur Definition klonaler Komplexe innerhalb einer Bakterienspezies. Mit dieser Technik werden Nukleotidvariation für partielle

Gensequenzen aufgedeckt. In Folge dessen wird jeder Sequenz eines zu analysierenden Gens ein Allel zugewiesen (in der Reihenfolge ihrer Entdeckung). Die Allele eines jeden Gens für ein Isolat werden einem Profil zugeordnet und somit einem bestimmten Sequenztyp. Sehr eng verwandte Isolate besitzen somit identische Sequenztypen oder solche, die sich nur in sehr wenigen Loci unterscheiden. Dagegen zeigen nicht verwandte Isolate völlig verschiedene Sequenztypen. Entscheidend für ein geeignetes MLST-Schema sind drei wichtige Elemente (Maiden *et al*., 1998):

1. Auswahl einer diversen Stammsammlung des zu analysierenden Mikroorganismus (unterschiedliche geographische Regionen und Wirte).
2. Auswahl geeigneter Genloci.
   Besonders geeignet sind „*housekeeping"* Gene, da diese proteinkodierenden Gene hochkonserviert sind und somit die genetische Verwandtschaft gut zeigen. Die Gene sollten im Genom des jeweiligen Pathogens gleichmäßig verteilt sein, damit eventuelle Rekombinationsereignisse nicht alle gewählten Loci betreffen. In der Regel sollten in Abhängigkeit der Möglichkeiten eines „s*ingle reads"* des eingesetzten Sequenzierungsautomaten 400 bis 700 bp des Gens analysiert werden.
3. Auswahl von Oligonukleotiden für die Amplifikation und Sequenzierung der Genloci.

MLST ermöglicht eine schnelle Gewinnung von Informationen und stellt eine zuverlässige Methode zur Bestimmung von Sequenztypen aus Gewebeproben dar. Neben schnellen und detaillierten Diagnosen kann MLST auch Einblicke in die evolutionäre Entwicklung bzw. die Populationsbiologie von bakteriellen Organismen geben

1.1.8.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Die PFGE wurde für die Analyse großer DNA-Fragmente entwickelt (Schwartz und Cantor, 1984). Olive und Bean erkannten 1999, dass im Vergleich zu anderen biochemischen molekularbiologischen Methoden die PFGE der Gesamt-DNA als *golden standard* in der Typisierung angesehen werden kann (Olive und Bean, 1999). Mittlerweile wird die PFGE bei vielen Fragestellungen in der Bakteriologie eingesetzt. Exemplarisch sei hier die Kartierung bakterieller Genome mittels PFGE genannt (Salma *et al*., 1992; Taylor *et al*., 1992). Weiterhin findet diese Methode Anwendung in epidemiologischen Studien von infektiösen Erkrankungen wie MRSA- (Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus)* sowie *Salmonella*-Infektionen (Ichiyama *et al*., 1991; Murase *et al*., 1995).

Zu Beginn der Untersuchungen von *Bartonella*-Spezies wurde die PFGE-Methode für die Inter- und Intra-Spezies Identifikation genutzt (Roux und Raoult, 1995). Die Analyse von Makrorestriktionsbandenmustern genomischer DNA mittels PFGE entwickelte sich zu einer etablierten Technik bei der Typisierung von *B. henselae*-Isolaten (Matar *et al*., 1993; Rodriguez-Barradas *et al*., 1995; Koehler *et al*., 1997; Handley und Regnery, 2000; Dillon *et al*., 2002). Untersuchungen und Bewertungen der genetischen Verwandtschaft werden häufig durch diese *band-based* Technik vorgenommen (Sander *et al*., 1998; Arvand *et al*., 2001; Maryama *et al*., 2001; Chang *et al*., 2002).

In diesen Zusammenhang konnte die Existenz von genetischen Varianten eines einzelnen *B. henselae*-Isolates beobachtet werden. Studien zum Verlauf feliner Infektionen zeigten Veränderungen des Makrorestriktionsbandenmusters (Sander *et al*., 1998). Dies kann entweder durch eine gleichzeitige Infektion mit zwei oder mehreren Stämmen oder durch das Auftreten von Veränderungen innerhalb eines Isolates im Verlauf der Infektion erklärt werden. So beschrieben Sander und Arbeitskollegen Unterschiede zwischen *Sma*I-Restriktionsfragmenten in den Isolaten FR96/36 und FR96/36II (Sander *et al*, 1998). Weiterhin wurde gezeigt, dass Variationen im Makrorestriktionsbandenmuster von *Not*I-Fragmenten feliner *B. henselae*-Isolate erhalten wurden (Maryama *et al*., 2000). Bemerkenswert ist, dass fast ausschließlich nur die beiden Restriktionsendonukleasen *Sma*I und *Not*I eingesetzt werden. Eine Bewertung der Eignung der Enzyme bei der molekularen Typisierung von *B. henselae* wurde jedoch noch nicht vorgenommen.

1.2 Zielstellung dieser Arbeit

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist über die Stabilität des genetischen Fingerabdrucks von Bartonellen nur sehr wenig bekannt. Studien konnten Veränderungen im Makrorestriktionsbandenmuster von *B. henselae*-Isolaten, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus Blutkulturen der gleichen infizierten Katzen gewonnen wurden, zeigen (Kabeya *et al*., 2002). Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Analyse des genetischen Fingerabdruckes von *B. henselae*-Stämmen verschiedener Wirtsspezies (Mensch und Katze) aus unterschiedlichen geographischen Regionen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert wurden. Die molekulare Typisierung wurde mit Hilfe der PFGE und MLST durchgeführt, welche so gleichzeitig einer detaillierten Evaluation unterzogen werden sollten.

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

1. Besteht eine überdurchschnittliche Assoziation zwischen bestimmten *B. henselae*-Isolaten und einer bestimmten Wirtsspezies (Mensch)?
2. Ist ein erkennbares geographisches Verteilungsmuster der Isolate erkennbar?
3. Ist MLST für die Untersuchung der Diversität und Populationsstruktur von *B. henselae* besonders geeignet? Kann man das Diskriminierungspotential der MLST-Methode mit der PFGE-Typisierung gleichsetzen?
4. Wie stabil ist der genetische Fingerabdruck von *B. henselae*-Isolaten nach wiederholten *in vitro* Passagen?

2. Material und Methoden

2.1 Bakterien

2.1.1 Bakterienstämme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *Bartonella henselae*- Isolate sind in Tab. 2 (siehe Anhang) aufgelistet. Die untersuchten Stämme stammten aus der Stammsammlung der Arbeitsgruppe von Prof. Arvand und setzten sich aus 158 felinen Isolaten und 24 humanen Isolaten aus verschiedenen geographischen Regionen zusammen, hauptsächlich aus Europa (121), aber auch aus Nordamerika (31) und Australien (30).
Als Referenzstamm diente das Isolat Houston-1^T (ATCC49882), dessen Gesamtgenom vollständig sequenziert vorliegt.

2.1.2 Stammhaltung

Für eine längerfristige Aufbewahrung der *B. henselae*-Isolate erfolgte die Stammkonservierung in Glycerin bei -20 °C oder -80 °C. Dafür wurde in 1 ml BBFH-Flüssigmedium (s. 2.1.3.)/20%igen Glycerin das Koloniematerial einer zu konservierenden Bakterienkultur von einer Blutagarplatte (Bectin Dickensen, Franklin Lakes, NY, USA) resupendiert. Danach erfolgte das Einfrieren bei -20 °C oder -80 °C.

2.1.3 Wachstumsmedien

Das nachfolgend aufgeführte Komplexmedium BBFH (Brucella Boullion mit Fildes und Hämin) wurde vor dem Gebrauch durch Tyndallisierung sterilisiert.

<u>BBFH</u>

Brucella-Broth	28 g
(Becton Dickenson, Franklin Lakes, NY, USA)	

Hämin (Serva, Heidelberg) 5 %

Aq. bidest. ad 1 liter, pH 7,3 (HCl)

Die BBFH-Lösung wurde an zwei aufeinander folgenden Tagen im Dampftopf bei 100 °C für eine Stunde erhitzt. Zwischen dem 1. und 2. Erhitzen wurde die BBFH-Lösung bei Raumtemperatur gelagert. Nach dem 2. Erhitzen und Abkühlen auf 4 °C wurden noch 80 ml einer sterilen Fildes Extrakt-Lösung (Oxoid, Cambridge, UK) zugegeben. Die BBFH-Lösung wurde dann bei 2 - 8 °C gelagert.

2.1.4 Anzucht der Bakterien

Die Anzucht von *B. henselae*-Isolaten erfolgte entweder in 45 ml BBFH-Flüssigmedium bei 37 °C und 5 % CO_2 oder auf Columbia-Blutagarplatten (Becton Dickenson, Franklin Lakes, NY, USA) ebenfalls bei 37 °C und 5 % CO_2.

2.1.5 Präparation von Einzelkolonien

Ausgehend von vorhandenen Glycerinkulturen von fünf verschiedenen *B. henselae*-Primärisolaten wurden Abimpfungen auf Columbia-Blutagarplatten (CBA, Becton Dickenson, Franklin Lakes, NY, USA) vorgenommen und bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert.
Nach sieben bis zehn Tagen Wachstum wurden vier bis fünf verschiedene Kolonien mit einem unterschiedlichen morphologischen Charakteristikum auf eine einzelne CBA-Platte transferiert. Diese Kulturen wurden bis zum Erhalt eines bakteriellen Zellrasens bei den oben genannten Bedingungen inkubiert und für die Gesamt-DNA-Isolation (s. 2.5.1) eingesetzt.
Im Rahmen der Untersuchung der genetischen Stabilität des genetischen Fingerabdruckes wurden die Einzelkolonien nach dem folgenden Schema weiter *in-vitro* passagiert: Die Einzelkolonien wurden auf Blutagar so ausgestrichen, dass daraus ein Zellrasen anwuchs. Dann wurde aus den Randbereichen des Rasens eine einzelne Kolonie wie im vorangegangenen Schritt auf eine neue CBA-Platte transferiert. In einem regelmäßigen Abstand von fünf Passagen erfolgte die Präparation von DNA für die PFGE-Analyse (s. 2.7.2).

2.2 Oligodesoxynukleotide (Primer)

Für die Amplifikation und die Sequenzierung der zu untersuchenden Genloci wurden jeweils die gleichen Primer eingesetzt. Die nachfolgende Tabelle 3 gibt einen Überblick über die verwendeten Primer, deren Nukleotidsequenz und Referenz. Weiterhin sind die Oligodesoxynukleotide aufgeführt, welche in der 16S rRNA-typenspezifischen PCR Verwendung fanden.

Tab. 3: Verwendete Oligonukleotide für die Amplifikation und Sequenzierung

Genlocus	Primer	5´-3´-Sequenz	Position (Acc.nr.)	Referenz
16S rRNA-Gen	16S rRNA-Forward	AGAGTTTGATCCTGGYTCAG	10 (M73229)	Bergmans *et al*. 1996
16S rRNA-Gen	16S rRNA-Reverse	CTTTCAGCCCARTAAWTCCG	521 (M73229)	Bergmans *et al*. 1996
16S rRNA-Gen	16S rRNA-Reverse (BH1)	CCGATAAATCTTTCTCCCCTAA	185 (M73229)	Bergmans *et al*. 1996
16S rRNA-Gen	16S rRNA-Reverse (BH2)	CCGATAAATCTTTCTCCAAAT	185 (M73229)	Bergmans *et al*. 1996
*fts*Z	*fts*Z-Forward	GCCTTCTCATCCTCAACTTC	1095 (AF061746)	Iredell *et al*. 2003
*fts*Z	*fts*Z-Reverse	CTTTGTTTTAAACGCTGCC	1616 (AF061746)	Iredell *et al*. 2003
*glt*A	*glt*A-Forward	GGGGACCAGCTCATGGTGG	782 (L38987)	Norman *et al*. 1995
*glt*A	*glt*A-Reverse	AATGCAAAAAGAACAGTAAACA	1160 (L38987)	Norman *et al*. 1995
*rib*C	*rib*C-Forward	GCAGGGGATGCGATTTAATA	1230 (AJ132928)	Iredell *et al*. 2003
*rib*C	*rib*C-Reverse	CAACATAACGGGCAAGTTGA	1550 (AJ132928)	Iredell *et al*. 2003
*gro*EL	*gro*EL-Forward	GTTGATGATGCCTTGAAC	1185 (AF014829)	Iredell *et al*. 2003

groEL	*gro*El *Reverse*	TGGTGTGTCTTTCTTTGG	1589 (AF014829)	Iredell *et al.* 2003
*bat*R	*bat*R-Forward	GACCGCAATATTTTGACATC	69 (AJ300267)	Iredell *et al.* 2003
*bat*R	*bat*R-Reverse	GCATCCATCAAAGCATCACGACTT	555 (AJ300267)	Iredell *et al.* 2003
*rpo*B	*rpo*B-Forward	CGTGACGTACATCCTACA	1702 (AF17070)	Iredell *et al.* 2003
*rpo*B	*rpo*B-Reverse	AACAGCAGCTCCTGAATC	2172 (AF17070)	Iredell *et al.* 2003
*nlp*D	*nlp*D-Forward	GGCGCTGGTATGATACAA	1061 (AF484425)	Iredell *et al.* 2003
*nlp*D	*nlp*D-Reverse	GACATCTGTGCGGAAGAA	1554 (AF484425)	Iredell *et al.* 2003
Eno	*eno*-Forward	AGCAGCAGAGTCATTGTC	378 (AY074768)	Iredell *et al.* 2003
Eno	*eno*-Reverse	CTCAGCCATACCATCTTC	849 (AY074768)	Iredell *et al.* 2003
*pap*31	*pap*-Forward	CAGGCTTCATGGGTGGTATT	380 (AF001274)	Iredell *et al.* 2003
*pap*31	*pap*-Reverse	CTGGCGCAATAAAACATTA	877 (AF001274)	Iredell *et al.* 2003

2.3 Chemikalien, Enzyme und verwendete Kits

Die benötigten Chemikalien und Enzyme wurden, falls nicht gesondert vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Roth) SERVA (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

2.3.1 Chemikalien

TG Seaplaque Agarose (Bio Whittaker Molecular Applications)

Seakem GTG Agarose (Bio Whittaker Molecular Applications)

Blocking Reagenz	(Roche)
Brij 58	(Sigma)
Brucella-Broth	(Bectin Dickenson)
dNTP´s	(MBI Fermentas)
EDTA	(Merck)
Ethanol	(Universität Rostock-Zentralapotheke des Klinikums)
Ethidiumbromid	(Sigma)
Fildes Extract	(Oxoid)
Glycerin	(Merck)
Hämin	(SERVA)
HCl	(Merck)
Maleinsäure	(Merck)
$MgCl_2$	(SERVA)
NaCl	(Roth)
NaOH	(Roth)
Na-Citrat	(Roth)
Natrium-Deoxycholate	(Merck)
Peqlab Universal Agarose	(peqlab)
Sarkosyl	(Sigma-Aldrich)
SDS	(SERVA)
Tris	(Sigma)
Tween®20	(SERVA)

2.3.2 Enzyme

Anti-Digoxigenin Alkalische Phosphatase (Fab-Fragmente)	(Roche)
CSPD	(Roche)
Lysozym	(Sigma-Aldrich)
Proteinase K	(Sigma-Aldrich)
Restriktionsenzyme	(MBI Fermentas)
Taq-DNA-Polymerase	(Quiagen)

2.3.3 Kits

QIAquick PCR Purification Kit	(Quiagen)
Dye Ex Spin Kit	(Quiagen)
BigDye®Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	(Applied Biosystem)

2.4 Elektrophoresepuffer und Lösungen für PFGE-Analysen

CHEF-TE-Puffer

Tris, pH7,5	100 mM
EDTA	100 mM

EC-Puffer (pH 7,5)

Tris	6 mM
NaCl	1000 mM
EDTA	10 mM
Brij 58	0,5 %
Deoxycholate	0,2 %
Sarkosyl	0,5 %

TEN-Puffer

Tris, pH 7,5	100 mM
EDTA	100 mM
NaCl	100 mM

Dummy No Salt Puffer (DNS-Puffer)

Tris, pH 8	100 mM
$MgCl_2$	5 mM

10xTBE

Tris	1 M

Borsäure (H_2BO_3)	1 M
EDTA	0,012 M

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Herstellung eines DNA-Lysates

Für die Isolierung von Gesamt-DNA aus *B. henselae* wurde das Koloniematerial einer bebrüteten Blutkulturagarplatte in 1 ml Aq. bidest. resuspendiert und 10 min bei 100 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 min. Der erhaltende Überstand (=DNA-Lysat) wurde sofort zu 250 µl Aliquots bei -20 °C gelagert.

2.5.2 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von DNA erfolgte in einem Volumen von 75 µl. Es wurden pro zu spaltende, in Agarose eingebetteter DNA (s. 2.7.2.1) 20 U der Restriktionsendonuklease eingesetzt. Die Restriktionsenzyme und die entsprechend zehnfach konzentrierte Pufferlösung (Tab. 4) wurden von der Firma MBI Fermentas bezogen. Der Verdau erfolgte über Nacht aber mindestens 6 h lang bei der vom Hersteller angegebenen Inkubationstemperatur. Für den Restriktionsverdau wurden mit einem Skalpell ca. 2 x 3 mm große Stücke der in Agarose eingebetteten DNA abgeschnitten und in die Äquilibrierungslösung (75 µl des eingesetzten 1 x Restriktionspuffer) überführt. Nach einer 1-stündigen Inkubation bei 4 °C wurde der Äquilibrierungspuffer vorsichtig entfernt und durch 75 µl Restriktionslösung ersetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation des Restriktionsverdaus für zunächst 1 h bei 4 °C und dann über Nacht bei der angegebenen Restriktionstemperatur. Für die Restriktion wurde der folgende, in Tab. 4 wiedergegebene Reaktionsansatz pipettiert:

Tab. 4: Restriktionsansatz

Komponente	**Konzentration**	**Volumen**
Restriktionsenzym	10 U/µl	2 µl
10 x Reaktionspuffer		7,5 µl
H_2O bidest.		ad 75 µl

Hierbei entspricht 1 U der Restriktionsendonuklease der Aktivität, die 1 µg DNA in einer Stunde bei der jeweiligen Reaktionstemperatur spaltet. Folgende in der Tab. 5 aufgeführten Enzyme wurden für die Spaltung der DNA eingesetzt:

Tab. 5: Verwendete Enzyme und deren Erkennungsschnittstelle für die Restriktion

Restriktionsendonuklease	**Puffer**	**Erkennungssequenz***
*Apa*I	B	5′GGGCC↓C 3′
		3′C↑CCGGG5′
*Hind*III	R^+	5′G ↓AATTC 3′
		3′CTTAA↑G 5′
*Hinc*II	Y^+-Tango	5′GT Py↓Pu^{Δ} AC3′
		3′CA Pu↑Py^{Δ} TG5′
*Eco*52I	Unique	5′C↓GGCCG 3′
		3′GCCGG↑C 5′
*Eco*81I	Y^+-Tango	5′GC↓TNAGG 3′
		3′GGANT↑CC 5′
*Not*I	O^+	5′GC↓GGCCGC 3′
		3′CGCCGG↑CG 5′
*Sma*I	Y^+-Tango	5′CCC↓GGG 3′
		3′CCC↑GGG 5′
*XmaJ*I	Y^+-Tango	5′C↓CTAGG 3′
		3′GGATC↑C 5′

* Die Schnittstellen der eingesetzten Restriktionsendonukleasen sind mit ↑↓ gekennzeichnet.

$^{\Delta}$ Pu= Purin, Py= Pyrin

2.5.3 Herstellung von Gensonden

2.5.3.1 Markierung von PCR-Amplifikaten

Als Methode für die Markierung von PCR-Amplifikaten kam das „*Random Primed Labeling*“-Verfahren (Feinberg und Vogelstein, 1983) zum Einsatz.
Die Oligonukleotid-Primer aus der Tab. 3 wurden unter dem Zusatz von DIG-1-dUTP verwendet, was zu einer zufällig markierten Amplifikation führt. Die Markierung erfolgte nicht radioaktiv mit einem Digoxigenin gelabelten 11-dUTP (Roche Diagnostics, Penzberg) nach den Angaben des Herstellers. In einer PCR-Reaktion wurden in den neu synthetisierten DNA-Strang Digoxigenin-markierte Nukleotide (DIG-ddUTP) an die Stelle von 2´,5´-dTTP durch die *Taq*-Polymerase eingebaut. Eingesetzt wurde 1 µl eines DNA-Lysates (s.2.5.1). Der 25 µl-Volumenreaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Template-DNA	1 µl
Oligonukleotidprimer (jeweils 10 pmol/µl)	1,25 µl
dNTP`s (2 mM)	2,5 µl
10 x PCR-Puffer	2,5 µl
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
DIG-11-dUTP	0,5 µl
Aqua dest.	15,5 µl

In einem Thermocycler (Biometra, Göttingen) erfolgte die PCR-Reaktion unter den folgenden Bedingungen:

Denaturierung	94 °C	300 s
35 Zyklen:		
Denaturierung	94 °C	30 s
Hybridisierung	50 °C	30 s
Extension	72 °C	60 s

Anschließend folgten eine finale Elongation von 300 s bei 72 °C und ein Abkühlen der Reaktion auf 4 °C. Vor dem Einsatz in Hybridisierungsexperimenten wurde die DIG-

markierte DNA mittels QIAquick PCR Purification Kit (s. 2.5.5.1) aufgereinigt, wobei die verbliebenden dNTP`s und Salze entfernt wurden.

2.5.3.2 Markierung von Oligonukleotiden

Die DIG-Markierung von Oligonukleotiden erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die Markierung von PCR-Amplifikaten (s. 2.5.3.1) mit dem „DIG Oligonucleotide 3´-End Labeling Kit“ (Roche Diagnostics, Penzberg). Es wurde entsprechend den Herstellerangaben verfahren. Ausgangspunkt für die Markierung waren 100 pmol des verwendeten Oligonukleotid.

2.5.4 Polymerase Chain Reaktion (PCR) von DNA

2.5.4.1 PCR in der *multi-locus sequence typing*-Methode (MLST)

Diese Methode, entwickelt von Saiki *et al.* (1985) dient zur Amplifikation von DNA zwischen zwei Abschnitten auf einem bekannten Genomabschnitt. Synthetische hergestellte Oligonukleotide unterschiedlicher Sequenz werden als Primer in der PCR eingesetzt. Abgeleitet werden die Primer mit der gewünschten Nukleotidsequenz für den jeweils komplementären Strang aus der Umgebung des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes. Sie dienen als Startpunkt für die *in vitro*-DNA-Synthese, welche von der *Taq*-Polymerase katalysiert wird. Die Amplifikation der DNA erfolgt durch sich wiederholende Zyklen aus Denaturierung, Annealing der Primer und Extension. Die Denaturierung der Template-DNA erfolgt bei 94 °C, dabei trennen sich beide Stränge der DNA. Anschließend wird die Temperatur in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur der Primer abgesenkt, so dass die im Überschuss eingesetzten Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige DNA hybridisieren können. Die spezifischen Annaeling-Temperaturen sind der Tab. 6 zu entnehmen. Die Annaeling-Temperaturen wurden so gewählt, dass diese 5 bis 10 °C unter der ermittelten Schmelztemperatur T_m der eingesetzten Primer lag. Zur Bestimmung der Schmelztemperatur wurde die Formel nach BERTRAM und GASSEN (1991) angewendet:

T_m= 2 °C × Anzahl der A/T-Paare + 4 °C × Anzahl der G/C-Paare

Danach kommt es durch Erhöhung auf 72 °C dem Temperaturoptimum der hitzstabilen *Taq*-DNA-Polymerase zur Extension, wobei der Primer verlängert wird, bis eine doppelsträngige DNA vorliegt. Das entstandene Amplifikat eines Zyklus dient wieder als Template des nächsten Zyklus. Zur Auffüllung noch vorhandener einzelsträngiger Enden wurde die Reaktion nach 35 Zyklen 5 Minuten bei 72 °C inkubiert. Das PCR-Produkt und deren Länge in dieser exponentiellen Reaktion ist durch die 5´-Enden der Primer festgelegt sowie durch die Distanz der beiden Primer.
Die Größe der Primer liegt meist zwischen 18 und 24 Nukleotiden. Für die Reaktionen wurden Primer verwendet, die von der Firma biomers.net (Ulm) bezogen wurden und der Tab. 6 zu entnehmen sind. Der 50 µl-Volumenreaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Template-DNA	5 µl (20-50 ng)
Oligonukleotidprimer (jeweils)	2 µl (10 pmol/µl)
dNTP`s	5 µl (2 mM)
10 x PCR-Puffer	5 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,15 µl(5 U/µl)
Aqua dest.	30,85 µl

Dieser Ansatz wurde in einen Thermocycler gestellt (Primus, Biometra). Die Reaktionsbedingungen der PCR sind im Folgenden dargestellt:

Denaturierung	94 °C	300 s
<u>35 Zyklen:</u>		
Denaturierung	94 °C	60 s
Hybridisierung	Annealingtemperatur	30-45 s
Extension	72 °C	40-50 s (*)

Die Extensionszeit (*) richtet sich hierbei nach der Größe des Amplifikates, wobei die Syntheseleistung der *Taq*-Polymerase von 1000 bp pro Minute ebenfalls die Grundlage für die gewählten Bedingungen war. Anschließend erfolgen eine finale Elongation von 350 s bei 72 °C und ein Abkühlen der Reaktion auf 4 °C. Zur Kontrolle wurden 5 µl des PCR-

Produktes in einer Agarosegelelektrophorese untersucht. Vor der Verwendung in Sequenzierungsreaktionen wurde die amplifizierte DNA mittels QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen, Hilden) aufgereinigt, wobei die verbliebenden dNTP`s und Salze entfernt wurden (s. 2.5.5.1).

2.5.4.2 16S rRNA-typenspezifische PCR

Für die typenspezifische Amplifikation des 16S rRNA-Genlocus von *B. henselae* wurden zwei spezifische Reverse-Primer eingesetzt, welche auf der Grundlage von zwei verschiedenen 16S rRNA-Gensequenzen entwickelt wurden (Bergmans *et. al*., 1996). Basis der Untersuchungen war das DNA-Material, das aus den klinischen Proben von CSD-Patienten (*Cat Scratch Desease*) isoliert werden konnte. Dabei ist der Primer BH1 von der 16S rRNA-Gensequenz des Typs 1 (bezogen auf Gensequenz des Isolates Houston-1^T) und der Primer BH2 von Gensequenzen des Typs 2 (bezogen auf die Gensequenz des Isolates Marseille) abgeleitet wurden. Der jeweils verwendete Forward-Primer wurde in der Arbeit vom Bergmann *et al.* von dem *broad host range* Primer 16SF abgeleitet. Die erwartete Größe des PCR-Amplifikates der genomischen DNA der *B. henselae* Isolate mit diesem Primern beträgt 185 bp. Das Reaktionsvolumen betrug 50 µl und enthielt folgende Komponenten:

Template-DNA	5 µl (20-50 ng)
Oligonukleotidprimer (jeweils)	2 µl (10 pmol/µl)
dNTP`s	5 µl (2 mM)
10 x PCR-Puffer	5 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,4 µl (5 U/µl)
Aqua dest.	30,60 µl

Die PCR-Reaktion wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung	95 °C	180 s
<u>30 Zyklen:</u>		
Denaturierung	95 °C	20 s

Hybridisierung	56 °C	30 s
Extension	72 °C	60 s

Anschließend erfolgen analog der Standard-PCR (s. 2.5.4.1) eine finale Elongation von 350 s bei 72 °C und ein Abkühlen der Reaktion auf 4 °C. Zur Kontrolle wurden 5 µl des PCR-Produktes in einer Agarosegelelektrophorese untersucht. Alle Amplifikationsreaktionen wurden in einem Biometra Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

Tab. 6: Annealingtemperaturen der verwendeten Primer

Genlokus	Primer	Annealingtemperatur (°C)
16S rRNA-Gen	16S rRNA-Forward	59
16S rRNA-Gen	16S rRNA-Reverse	59
16S rRNA-Gen	BH1	57
16S rRNA-Gen	BH2	56
*fts*Z	*fts*Z-Forward	54
*fts*Z	*fts*Z-Reverse	54
*glt*A	*glt*A-Forward	50
*glt*A	*glt*A-Reverse	50
*rib*C	*rib*C-Forward	55
*rib*C	*rib*C-Reverse	55
*gro*EL	*gro*EL-Forward	50
*gro*EL	*gro*EL-Reverse	50
*bat*R	*bat*R-Forward	60
*bat*R	*bat*R-Reverse	60
*rpo*B	*rpo*B-Forward	49
*rpo*B	*rpo*B-Reverse	49
*nlp*D	*nlp*D-Forward	49
*nlp*D	*nlp*D-Reverse	49
eno	*eno*-Forward	49
eno	*eno*-Reverse	49
*pap*31	*pap*-Forward	55
*pap*31	*pap*-Reverse	55

2.5.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

2.5.5.1 Reinigung von PCR-Produkten mittels Anionenaustauschsäulen

Vorraussetzung für die Sequenzierung von PCR-Amplifikaten war deren Aufreinigung. Mit dieser Methode können einzel- oder doppelsträngige PCR-Produkte mit einer Größe von 100 bp bis 10 kb von Primer-, Nukleotid-, Polymerase- und Lösungsrückständen gereinigt werden, welche in der anschließenden Sequenzierungsreaktion stören könnten. Die Aufreinigung erfolgte mittels Anionenaustauschsäulen des QIAquick-System (PCR Purification Kit, Quiagen, Hilden) entsprechend den Herstellerangaben. Dabei wird die DNA wird in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen auf die Silika-Membran der Anionenaustauschsäulen gebunden, während die Kontaminanten durch die Membran gelassen werden. Anschließend wird die DNA mit H_2O bidest. eluiert.

2.5.6 DNA-DNA-Hybridisierung

2.5.6.1 Transfer von Nukleinsäuren (SOUTHERN, 1975)

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass die DNA, die durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt wurde, durch einen „Vakuumblotter“ (HyBAID Vacu-Aid Blot processing Pump, Biometra, Göttingen) auf eine ungeladene Nylonmembran Biodyne B (Pall Gelman Laboratory, Dreieich, Germany) transferiert wird. Bei dieser Technik wird die DNA zusammen mit dem Transferpuffer durch den angelegten Unterdruck aus dem Agarosegel auf die Membran gesaugt. Der hohe Salzgehalt des eingesetzten Transferpuffers hält die DNA im denaturierten Zustand. Anschließend wird die DNA mittels UV-Licht durch die GS Gene Linker®UV Chamber (BIORAD, München) auf der Membran fixiert.
In dieser Arbeit wurde zunächst die DNA in einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert. Es erfolgte nun im Anschluss eine Depurinierung der doppelsträngigen DNA durch eine 10-minütige Inkubation des Gels in 0,25 N HCl. Dies erleichterte besonders den Transfer großer DNA-Fragmente. Im Weiteren erfolgte die Inkubation in einer Denaturierungslösung (2 x 20 min) um die doppelsträngige DNA zu denaturieren, sowie die Inkubation (2 x 20 min) in Neutralisierungslösung. Alle Schritte wurden auf einer Laborwippe (CM-9 Sarstedt, Nürnbrecht) durchgeführt. Die auf

Gelgröße zugeschnittene Nylonmembran und eine Lage Filterpapier (Whatman, Schleicher und Schüll, Dassel) wurden gleichzeitig 1 min in der Transferlösung äquilibriert. Das Agarosegel wurde anschließend ebenfalls in der Transferlösung für 2 min äquilibriert. Der Transfer der DNA erfolgte für ca. 2 h durch einen erzeugten Unterdruck auf einer Vakuumapparatur (HyBAID Vacu-Aid Blot Processing Pump, Biometra, Göttingen) auf der von unten nach oben folgende Schichten aufgelegt waren:

Apparatur des Vakuumblotters
1 x Whatmanpapier
Nylonmembran
Maske
Agarosegel (pro Seite 5 mm die Maske überlappend)

Während des Transfers musste darauf geachtet werden, dass das Agarosegel immer mit der Transferlösung bedeckt war. Im Anschluss wurde die Nylonmembran auf Filterpapier getrocknet und durch eine UV-Licht-Bestrahlung mit 150 mJoule (GS Gene Linker®UV Chamber BIORAD, München) fixiert. Die Membran konnte nun zur Hybridisierung eingesetzt oder trocken zwischen Filterpapier gelagert werden.

Transferlösung:	Na_2HPO_4 x 2 H_2O	0,2 M
Denaturierungslösung:	NaCl	1,5 M
	NaOH	0,5 M
Neutralisierungslösung:	Tris-HCl	1 M
	NaCl	1,5 M
	pH 7,4 (HCl)	

2.5.6.2 DNA-Hybridisierung

Die Nylonmembran mit der fixierten DNA wurde in ein Hybridisierungsröhrchen (Thermo Hybaid, Thermo SCIENTIFIC, Dreieich) überführt und 1 h in 25 ml DIG-Easy-Hyb-Puffer (Roche Diagnostics, Penzberg) im Hybridisierungsofen (Biometra, Göttingen) prähybridisiert.

Dadurch sollten unspezifische Bindungen der eingesetzten Sonde während der Hybridisierung verhindert werden. Danach erfolgte für min. 16 h die Hybridisierung in 20 – 30 ml DIG-Easy-Hyb-Hybridisierungspuffer (Roche Diagnostics, Penzberg) nach der Zugabe von 15 – 20 µl Digoxigenin-markierter Sonde (s. 2.5.3.1). Die DIG-markierte PCR-Sonde wurde vor der Zugabe 10 min durch Erhitzen auf 100 °C denaturiert. Die Hybridisierungstemperatur lag bei diesen homologen Sonden bei 70 °C. Mit Oligonukleotiden wurde bei der jeweils entsprechenden Annealingtemperatur hybridisiert. Die Hybridisierungslösung mit Sonde konnte noch zwei- bis dreimal wieder verwendet werden, und wurde deshalb bei –20 °C gelagert. Nach der Hybridisierung wurde die Nylonmembran zuerst 2 × 5 min bei Raumtemperatur in 2 × SSC und 0,1 % SDS (w/v) und danach 2 × 15 min bei der jeweiligen Hybridisierungstemperatur in 0,1 × SSC und 0,1 % SDS (w/v) gewaschen.
Durch die Erniedrigung der SSC-Konzentration von 2 × auf 0,1 × wurde eine höhere Stringenz der Waschschritte erreicht, da die Spezifität der Bindung durch einen niedrigeren Salzgehalt erhöht wird.

2.5.7 Chemilumineszenznachweis

Diese Methode basiert auf der Bindung eines Antikörperkonjugates AP (Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase, Fab-Fragmente, Roche Diagnostics, Penzberg) an die mit Digoxigenin markierte Sonde und der anschließenden Dephosphorylierung eines Chemilumineszenz-Substrates (CSPD, Roche Diagnostics, Penzberg) durch die immobilisierte alkalische Phosphatase. Dies führt zur Entstehung eines instabilen Zwischenproduktes, welches zerfällt und dabei Licht emittiert. Mittels eines Röntgenfilmes erfolgt die Detektion des emittierten Lichtes.
Die nachfolgenden Schritte wurden alle bei Raumtemperatur im Hybridisierungsröhrchen bzw. in einer Laborschale durchgeführt. Die Membran wurde zunächst für 1 min in Puffer 1 äquilibriert, dann 30 min in Puffer 2 zur Verhinderung unspezifischer Bindungen des Antikörperkonjugates. Anschließend wurde die Membran 30 min mit dem Antikörperkonjugat 1:10.000 verdünnt in Puffer 2 geschwenkt. Es folgten Waschschritte von 2 × 15 min mit Puffer 1, bevor die Membran kurz in Puffer 3 äquilibriert wurde. Die Membran wurde nun zwischen saubere Plastikfolien gelegt und mit CSPD (1%ig (v/v) in Puffer 3) überschichtet. Die Membran wurde auf einen Röntgenfilm aufgelegt (CHRONOS

Chronex 5 X-Ray-Film, AGFA, Mortsel, Belgien). Die Expositionszeit richtete sich hierbei nach der Intensität des Signals.

20 x SSC:	NaCl	3 M
	Na-Citrat	0,3 M
	pH 7,0	
Puffer 1:	Maleinsäure	0,1 M
	NaCl	0,15 M
	pH 7,5 (NaOH)	
	Tween®20	3,0 % (v/v) frisch zugegeben
Puffer 2:	Maleinsäure	0,1 M
	NaCl	0,15 M
	pH 7,5 (NaOH)	
	Blockingreagenz	1,0 % (w/v) frisch zugegeben
Puffer 3:	Tris-HCl	0,1 M
	NaCl	0,1 M
	pH 9,5 (HCl)	
Substratlösung	Puffer 3	
	CSPD	1 % (v/v)

2.5.8 Wiederverwendung von Nylonmembranen

Nach der Chemilumineszenzdetektion war es möglich, die gebundene Sonde wieder von der Nylonmembran zu entfernen. Dazu wurde die Nylonmembran kurz in destilliertem Wasser gespült und anschließend 2 × 15 min bei 37 °C mit 0,2 M NaOH und 0,1 % SDS unter leichten Schwenken inkubiert. Danach wurde die Nylonmembran 5 min mit 2 × SSC gewaschen. Die so behandelte Membran wurde entweder feucht in 2 × SSC oder trocken zwischen Filterpapier gelagert. Sie konnte nun für Hybridisierungen mit anderen Sonden verwendet werden.

2.6 DNA-Sequenzierung

Der Sequenzierungsprozess besteht aus der Aufreinigung der zu sequenzierenden DNA, der Sequenzierungsreaktion, der Auftrennung und Detektion. Die Analyse der Sequenzabfolgen wird mit Hilfe von Computerprogrammen durchgeführt. Das Prinzip der Sequenzierungsreaktion umfasst die Durchführung einer linearen PCR, bei der nur ein Oligonukleotid als Primer eingesetzt wird und der Abbruch der Strangpolymerisation durch ein Fluoreszenz-markiertes ddNTP erfolgt. Dies hat zur Folge, dass es statistisch während der Polymerisation an jeder Nukleotidposition zum Abbruch kommen kann und daraus nun die DNA-Sequenz ermittelt werden kann.
Die Sequenzierung der doppelsträngigen PCR-Produkte erfolgte am automatischen ABI PRISM DNA 3730 xl sowie am ABI310 Analyzer (Applied Biosystem, Franklin Lakes, USA) nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.* 1977). Bei dieser nichtradioaktiven Sequenziermethode dient die einzelsträngige DNA als Matrize für eine *Taq*-Polymerase, die in einer Polymerisationsreaktion die Synthese des komplementären Stranges linear vom 5´ bis zum 3´-Ende katalysiert.

2.6.1 Sequenzierungsreaktion für den ABI310 Genetic Analyzer

Unter Verwendung des `ABI Dye Terminator Cycle Sequencing` Reaktionsmix (Applied Biosystem, Franklin Lakes, USA) wird die Sequenzierung in einer PCR durchgeführt. Dieses Kit ist eine Mischung aus markierten ddNTP´s, Amplitaq DNA Polymerase FS und $MgCl_2$ (Endkonzentration 1 mM).
Die Denaturierung der DNA, die Annealing-Temperatur der Primer und die Extension-Reaktion richtete sich dabei nach der eingesetzten *Cycle Sequencing*-Methode. Die Zyklen wiederholten sich 24 mal. Die als Template eingesetzte DNA lag nach der Reinigung mit dem QIAqick PCR Purification Kit (Quiagen, Hilden) in H_2O bidest. gelöst vor. Der Einbau unterschiedlich Fluoreszenz-markierten ddNTP´s führte zum Kettenabbruch und es entstanden Fragmentpopulationen in dem Reaktionsansatz, welche an einem Applied Biosystems Sequenzierautomaten analysiert werden konnten.
Eine typische Sequenzierungsreaktion fand in einem Volumen von 15 µl statt und enthielt:

Template	2 µl (50-100 ng)
Primer	20 pmol
BigDye Terminator Ready Reaktions-Mix	3 µl
Aqua bidest.	ad. 15 µl

Die Durchführung der Reaktion erfolgte im Thermocycler (Primus25/96 Thermocycler, MWG Biotech) mit 24 Zyklen nach einer einminütigen Inkubation bei 96 °C unter den folgenden Bedingungen:

Denaturierung	94 °C	20 s
Annealing	52 °C	30 s
Extension	60 °C	240 s

Anschließend wurde die Reaktion durch Abkühlen der Proben auf 4 °C abgebrochen.

2.6.2 Aufreinigung der Sequenzierproben für den ABI310 Genetic Analyzer

Vor der Analyse wurden die Proben mit dem kommerziellen Dye Ex Spin-Kit (Quiagen, Hilden) nach den Herstellerangaben aufgereinigt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Proben für 20 min im SpeedVac Concentrator (Therma Elektron Corporation, Milford, USA) und die Resuspension des entstandenen Pellets mit 15 µl Hi-Di^{TM}-Formamide (Applied Biosystems, Franklin Lakes, USA). Dann wurde die gelöste DNA im Thermoblock (PerkinElmer, Waltham, USA) unter den folgenden Bedingungen denaturiert:

Denaturierung	97 °C	2 min

Nach dieser Inkubation wurden die Proben auf 4 °C gekühlt und dann im ABI PRISM310 Genetic Sequenzer analysiert.
Die Sequenzierung erfolgte in der Arbeitsgruppe von Dr. Koczan des Immunologischen Instituts der Universität Rostock.

2.6.3 Sequenzierung mit dem ABI 3730 XL

Die Sequenzierung der amplifizierten PCR-Produkte am ABI 3730 XL erfolgte durch die Firma AGOWA (AGOWA, DNA Sequencing Service, Berlin).

2.6.4 Analyse der Sequenzdaten

Die von dem ABI PRISM310 automatisch ermittelten Rohsequenzen wurden mit der Software Chromas (Version 1.43, Brisbane Australia) manuell ausgewertet. Weiter fand das Analyseprogramm Seq-Man (DNA STAR Lasergene v7, Madison, USA) Anwendung.

Internetanwendungen:
Mit Hilfe der Programme FASTA (PERSON und LIPMAN,1988), dem Algorithmus BLAST (*basic local alignmen search tool*): BLASTP 2.0.1. und BLASTX (ALTSCHUL *et al.* , 1997) wurden über das „*National Center for Biotechniological Information*“ (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) die in den Datenbanken EMBL, SWISS-PROT, PIR, PDB und PRF gespeicherten DNA-Sequenzen mit den Nukleinsäuresequenzen verglichen. Vollständige Sequenzvergleiche und multiple Alignments von DNA-Sequenzen wurden mit dem Programm CLUSTAL W (1.74, Matrix „*blossum*“. THOMPSON et al., 1994) über das „*European Bioinformatics Institute*„ (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html) durchgeführt. Folgende Parameter fanden dabei Anwendung:

CLUSTAL:	K-Tulpe value	1
	Gap penalty	5
	Filtering level	2,5
	Window size	10
	Open gap cost	10
	Unit gap cost	10

2.7 Klonierung von PCR-Fragmenten

Für die Klonierung wurden unter der Verwendung des 16S-rRNA-Forward- und des 16S rRNA-Reverse-Primer (s. Tab. 3) 512 bp große 16sRNA-Fragmente ausgehend von DNA-Proben der *B. henselae*-Isolate Is-479-1 und Is-479-2 Isolates amplifiziert. Die Klonierung dieser PCR-Amplifikate erfolgte unter Verwendung des TOPO TA Cloning Kit´s mit dem pCR2.1-TOPO-Vektor in *Escherichia Coli* (Invitrogen, Karlsruhe). Es wurden jeweils 5 - 9 verschiedene Klone jedes Isolates sequenziert (GATC Biotech, Konstanz).

2.8 Standard-Agarosegelelektrophorese

Für die Analyse und präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten zur Größenbestimmung wurden 0,8% bis 1,2%ige Agarosegele eingesetzt. Die DNA-Fragmente wurden mittels Elektrophorese aufgetrennt und durch die Färbung mit dem fluoreszierenden Farbstoff Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.
Die abgewogene Agarose (peqlab GmbH, Erlangen) wurde in 1 × TBE-Puffer gelöst und im Mikrowellengerät aufgekocht. Nach Abkühlung auf 60 °C wurde die Lösung dann in die vorbereiteten Gießstände (Biorad, München) gegossen. Das Gel wurde nach dem Erstarren in die Elektrophoresekammer gelegt und mit 1 × TBE-Puffer überschichtet. Für die Elektrophorese wurden die DNA-Proben mit 1/6 Volumen des 6 × Loading Dye Probenpuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt, in die Geltaschen pipettiert und 45 min mit einer Spannung von 90 – 100 V aufgetrennt.

6 × Loading Dye Solution:	Tris-HCl (pH 7,6)	10 mM
(MBI Fermentas, St. Leon Rot)	Bromphenolblau	0,03 % (w/v)
	Xylencyanol	0,03 % (w/v)
	Glycerin	60 % (w/v)
	EDTA	60 mM

Nach Ende der Elektrophorese wurden die Agarosegele für ca. 20 min in einer Ethidiumbromidlösung (Standardkonzentration: 80 µl/l Aq. dest.) gefärbt und anschließend kurz mit Aq. dest. gespült. Die angefärbten DNA-Fragmente wurden mit UV-Licht des Intas

Gel Jet Imager Dokumentationssystem (Intas, Göttingen) visuell wiedergegeben und photographiert.

2.9 Pulsfeld-Gelektrophorese (PFGE)

Die Trennung von DNA unterschiedlicher Fragmentgröße durch Elektrophorese ist seit den frühen 70er Jahren eine etablierte Methode. Typischerweise wurde intakte DNA in ausreichend kleine Fragmente durch Restriktionsenzyme geschnitten, die in Agarose- oder Acrylamidgelen durch Elektrophorese der Größe nach getrennt werden konnten. Jedoch war es nicht möglich Fragmente größer 50 kb zu trennen.
Die Pulsfeld-Gelelektrophorese wurde Anfang der 80er Jahre für die Auftrennung großer DNA-Fragmente entwickelt. Schwartz und Cantor beschrieben 1984 die Auftrennung von Hefe Chromosomen (> 100 kb). Dabei wurde gezeigt, dass die Trennung der DNA-Fragmente abhängig von den Zeitintervallen in einem alternierenden elektrischen Feld ist. Der Reorientierungswinkel, d.h. der Winkel dem sich ein Molekül bei einem Wechsel des Feldes angleichen muss, ist variabel. Werden DNA Moleküle gezwungen die Richtung während der Elektrophorese zu ändern, können unterschiedlich große Fragmente voneinander separiert werden. Mit jeder Reorientierung des elektrischen Feldes beginnen die kleineren Moleküle schneller in die neue Richtung zu wandern als die großen Fragmente.

2.9.1 Präparation von DNA-Agaroseblöckchen

Für die Präparation der DNA wurden die zu untersuchenden *B. henselae*- Isolate durch Beimpfen von einer Blutagar-Kulturplatte (CBA, Bectin-Dickensen, Heidelberg) beimpft und über 7 bis 10 Tage bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutinkubator (Hereus, Hanau) angezüchtet. Die Kulturen eines Isolates von einer Kulturplatte wurden dann in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) und 10 % Tween® resuspendiert. Die so erhaltene Bakteriensuspension wurde in einer Zentrifuge bei 4 °C und 4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Überstandes wurde das entstandene Bakterienpellet gewogen. Das Pellet wurde mit 10 µl 0,9%iger NaCl-Lösung pro mg Pelletgewicht resuspendiert. Ausgehend von dieser vorliegenden Suspension wurden 30 µl in 300 µl TEN-Puffer überführt und gemischt.

Zum Gießen der Agaroseblöckchen wurde eine mit Aqua bidest. hergestellte 2%ige *Low-Melting*-Agaroselösung (Seaplaque GTG Agarose, Bio Whittaker Molecular Applications, Wilkersville, USA) eingesetzt, die nach dem Aufkochen durch Inkubation in einem 56 °C warmen Wasserbad flüssig gehalten wurde. Die Bakteriensuspension, welche nun in TEN-Puffer resuspendiert vorlag, wurde mit 330 µl warmer Agarose vermischt und anschließend luftblasenfrei in gereinigte Gießstände (Biorad, München) überführt. Die Gießstände wurden zum Abkühlen für ca. 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

2.9.2 Lysozymverdau der in Agarose eingebetteten DNA

Die erstarrten Agaroseblöckchen wurden in eine 24 well- Zellkulturplatte mit jeweils 1 ml Lysozymlösung gegeben und für mindestens 5 h bei 37 °C (Inkubator, Hereus cell 240, Hanau) ohne Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lysozymlösung vorsichtig abgenommen und die Blöckchen 3 x über 20 min mit CHEF-TE-Puffer bei Raumtemperatur gespült.

Lysozymlösung:	EC-Puffer
	Lysozym (20 mg/ml)

2.9.3 Proteinase K-Verdau der in Agarose eingebetteten DNA

Nach dem Spülen der Agaroseblöckchen wurde der CHEF-TE-Puffer durch 1 ml Proteinase K-Lösung ersetzt. Die Inkubation der Agaroseblöckchen erfolgte 10 h über Nacht bei 50 °C im Brut-Inkubator (Memmert Omnilab, Schwabach). Nach dem Abnehmen der Proteinase K-Lösung wurden die Agaroseblöckchen mit jeweils 1 ml CHEF-TE-Puffer gewaschen und 3 × über 3 Stunden gespült. Hierbei inkubierten die Agaroseblöckchen in der ersten Stunde bei 50 °C und anschließend bei Raumtemperatur. Die so behandelten Agaroseblöckchen konnten nun zur Restriktion für die PFGE verwendet werden oder konnten bei 4 °C im CHEF-TE-Puffer gelagert werden.

Proteinase K-Lösung:	ES-Puffer Proteinase K (20 mg/ml)
ES-Puffer	EDTA 0,5 M Sarkosyl frisch zugegeben

2.9.4 Durchführung der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Zur Durchführung der PFGE wurde das CHEF-III-DR-System von Biorad (Penzberg) eingesetzt. Bei dieser CHEF (*contour clamped homogenous electric field*)-Apparatur werden 24 hexagonal angeordnete Elektroden verwendet. Die Spannung wird so zwischen den Elektroden aufgeteilt, dass die Feldstärke über das gesamte Gel konstant bleibt. Der Winkel ist dabei auf 120 °C festgelegt. Für die PFGE wurde ein 1%iges Agarosegel (Seakem GTG Agarose, Bio Whittaker Molecular Applications, Wilkersville, USA) verwendet. Je nach Art des verwendeten Kammes konnten bis zu 29 verschieden Proben gleichzeitig analysiert werden.

Ein ca. 3 mm großer Agaroseblock mit verdauter DNA (s 2.5.2) wurde mittels geschmolzener Agarose auf den Zahn des Kammes fixiert. Als Molekülgrößenstandard wurde der ebenfalls in Agarose eingebetteter Megabase DNA-Lambda-Ladder (Biozym, Cambrex Bio Science Rockland, Inc., USA Rockland) verwendet. Nach dem Erstarren der Agarose wurde der Kamm in den Gießstand platziert und die flüssige Agarose vorsichtig hineingegossen. Die Slots wurden anschließend mit flüssiger Agarose verschlossen. Die Elektrophorese fand bei einer Temperatur von 14 °C oder 16 °C in 0,5 x TBE Puffer statt. Dafür wurde die PFGE-Kammer mit 2 Litern 0,5 x TBE gefüllt und auf die notwendige Temperatur abgekühlt. Im Folgenden ist eine Übersicht über die Programme am CHEF-III-DR dargestellt:

Tab. 7: Verwendete Programme des CHEF-III-DR

	***Sma*I**	***Not*I**	***Apa*I**	***Mss*I**	***Eco*52I**	***Xma*JI**
Run time	22 h	34 h	22 h	23 h	22 h	Block 1: 16 h Block 2: 14 h
Initial time	3 s	5 s	3 s	5 s	3 s	Block 1: 5 s Block 2: 2 s
Final time	14 s	120 s	12s	15 s	12 s	Block 1: 15 s Block 2: 10 s
Volt/cm	*5,5*	*4,5*	*5,5*	*6*	*5,5*	*5,5*

Nach Ablauf der Elektrophorese wurde das Agarosegel für 60 min in Ethidiumbromid gefärbt (Stammlösung 10 mg/ml, Arbeitskonzentration: 80 µl/l Aq. dest.) und anschließend für 60 min in Aq. dest. entfärbt.
Die Auswertung der Agarosegele erfolgte computergestützt mit dem Programm GelCompar der Firma Applied Maths (Kortrijk, Belgien).

2.10 Größenbestimmung von Nukleinsäurefragmenten

Um die Größe der zu analysierenden DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde in jedem Agarosegel ein DNA-Größenstandard (Marker) aufgetragen. Für den Bereich 80 bis 1031 bp kamen der MassRuler™ DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon Rot), der 100 bp GeneRuler™ DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon Rot) sowie der 1 kb Ladder (Invitrogen, Karlsruhe) mit den folgenden Fragmentgrößen zum Einsatz:

MassRuler™ DNA Ladder (in kb):
1,031/0,9/0,8/0,7/0,6/0,5/0,4/0,3/0,2/0,1/0,08

100bp GeneRuler™ DNA Ladder (in kb):
1,031/0,9/0,8/0,7/0,6/0,5/0,4/0,3/0,2/0,1/0,08

1 kb Ladder (in kb):
11,198/9,162/7,126/5,030/4,072/3,054/2,036/1,636/1,018/0,506/0,396/0,344/0,298/0,220/

0,201/0,154/0,134/0,075

Für die PFGE-Analysen wurde zur Größenbestimmung der Restriktionsfragmente der Lambda-Ladder (Biozym, Cambrex Bio Science Rockland, Inc., USA Rockland) verwendet.

Lambda-Ladder (in kb):
873/824,5/776/727,5/679/630,5/582/533,5/485/436,5/388/339,5/2917242,5/194/145,5/97/48,5

Bei den Southern Blot-Hybridisierungsexperimenten wurde für die Bestimmung der Fragmentgrößen zusätzlich ein mit Digoxigenin markierter Längenstandard (DNA Molecular Weight Marker II, Roche Diagnostics, Mannheim) auf die entsprechenden Agarosegele aufgetragen und auf die Nylonmembran transferiert.

DNA Molecular Weight Marker II, Digoxigenin-markiert (in kb):
23,13/9,4/6,5/4,3/2,3/2,0/0,5/0,1

3. Ergebnisse

3.1 *Multi-locus sequence typing* von *B. henselae*-Isolaten

Für ein MLST-Schema zur Typisierung von 184 *B. henselae*-Isolaten (s. Anhang Tab. 2) wurden die Sequenzdaten des 16S rDNA Gens und acht weiterer verschiedener *housekeeping genes* untersucht. Der partielle Genabschnitt des *eno*-Gens wurde für den Einsatz in der MLST-Analyse für *B. henselae* anhand 50 verschiedener *B. henselae*-Isolate, welche aus jedem der nachfolgend definierten Sequenztypen (ST) ausgewählt wurden, evaluiert (s. 3.1.1). Die eingesetzten Primer wurden durch Iredell *et al.* (Iredell *et al.*, 2003) entwickelt. Die Größe der partiellen Genabschnitte, welche durch Sequenzierung analysiert wurden, betrug zwischen 281 bp und 423 bp (Tab. 8). Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden die Genabschnitte jeweils auf beiden DNA-Strängen sequenziert.

Tab. 8: Matrizengröße der untersuchten, partiellen Genabschnitte

Genlocus	Größe des Genabs. (bp)	Referenz
16S rDNA	405 bzw. 404 *	M73229
*fts*Z	417	AF061746
*gro*EL	332	AF014829
*rib*C	404	AJ132928
*bat*R	423	AY289790
*glt*A	281	L38987
nlp	405	AF484425
*rpo*B	385	AF17070
eno	400	AY0747768

*Die unterschiedliche Größe ist bedingt durch den 3 bp-Nukleotidunterschied der zwei verschiedenen 16S rDNA-Genvarianten, welcher zusätzlich ein *gap* aufweist.

Für jeden untersuchten Genlokus ausschließlich des *eno*-Gens konnten Nukleotidvariationen festgestellt werden, welche einem entsprechenden Allelprofil zugeordnet wurden. Die Allelpolymorphismen sind in der Abb. 5 dargestellt. Die Anzahl der detektierten Allele liegt zwischen eins (*eno*-Genlokus) und vier (*batR*-Genlokus).

16S rDNA Gen

```
                                                                  |170
Allel 1          TACGGAATAACACAGAGAAATTTGTGCTAATACCGTATACGTCCT-TAGGGAGA
Allel 2          TACGGAATAACACAGAGAAATTTGTGCTAATACCGTATACGTCCTATTTGGAGA
```

batR-Gen

```
                                                          |65  |68
Allel 1          GCTATACAGATGGAGCATCTGCTCTCAAAGGTTTAACACTCCACCCCCCACATTT
Allel 2          GCTATACAGATGGAGCATCTGCTCTCAAAGGTTTAACACTCCACCCCCCACATTT
Allel 3          GCTATACAGATGGAGCATCTGCTCTCAAAGGTTTAACACTCCATCCCACCACATTT
Allel 4          GCTATACAGATGGAGCATCTGCTCTCAAAGGTTTAACACTCCATCCCCCACATTT
                 ****************************************** ** ********

                           |218
Allel 1          GTCTTAAAATGGGAGCAGACGATTTTATTACCAAACCTTTTTCTCAACGTCTTCT
Allel 2          GTCTTAAAATGGGAGCAGACGATTTTATTACCAAACCTTTTTCTCAACGTCTTCT
Allel 3          GTCTTAAAATGGGAGCGGACGATTTTATTACCAAACCTTTTTCTCAACGTCTTCT
Allel 4          GTCTTAAAATGGGAGCGGACGATTTTATTACCAAACCTTTTTCTCAACGTCTTCT
                 ***************** ************************************

                                                       |302
Allel 1          AGCGGGTGAAAGCTATTTTGCGCCGTGCAAGTACTCGTAATCAACCGCTTACAAC
Allel 2          AGCGGGTGAAAGCTATTTTGCGCCGTGCAAGTACTCGTAACCAACCGCTTACAAC
Allel 3          AGCGGGTGAAAGCTATTTTGCGCCGTGCAAGTACTCGTAACCAACCGCTTACAAC
Allel 4          AGCGGGTGAAAGCTATTTTGCGCCGTGCAAGTACTCGTAACCAACCGCTTACAAC
                 ************************************** **************
```

gltA-Gen

```
                           |1026
Allel 1          TCTTGATATTGCTATCACGCTTGAAAATATTGCTCTAAATGATGAATATTTTATTG
Allel 2          TCTTGATATTGCTATTACGCTTGAAAATATTGCTCTAAATGATGAATATTTTATTG
                 *************** ************************************
```

ftsZ-Gen

```
                         |1185
Allel 1          ATGTTCAATCACCACCCTTGCGCTCTGAGTCAATGGTAGAAGTGATCGAAGCACTT
Allel 2          ATGTTCAATCACCTCCCTTGCGCTCTGAGTCAATGGTAGAAGTGATCGAAGCACTT
Allel 3          ATGTTCAATCACCTCCCTTGCGCTCTGAGTCAATGGTAGAAGTGATCGAAGCACTT
                 ************* ****************************************

                                                                |1404
Allel 1          AGATATCAAATGCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTT
Allel 2          AGATATCAAATGCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATAGTT
Allel 3          AGATATCAAATGCGCCACGTGTGCAAGTAAGCCGTAGTTCGCAATCCTCTATGGTT
                 ************************************************** ***

                                                                     |1467
Allel 1          CAGTGAGTATGGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCGTTGTGCAG
Allel 2          CAGTGAGTATGGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCGTTGTGCAT
Allel 3          CAGTGAGTATGGAGGCGACGGCGCATGTTCTTGATGAGATGACAGGCGTTGTGCAT
                 ***************************************************
```

***groEL*-Gen**

```
                                    1343
Allel 1          TTGTTCGTCGTGCACTCCAAGCGCCAGCACGCCAAATTGCTACCAATGCCGGTGAA
Allel 2          TTGTTCGTCGTGCACTCCAAGCACCAGCACGCCAAATTGCTACCAATGCCGGTGAA
                 ********************* *********************************
```

***nlpD*-Gen**

```
                      1453
Allel 1          ATCCCAGTCTCAATCTGCATCTTCCATAAGACACAAGAAGTATTCATCTACAGAGA
Allel 2          ATCCCAGTCTCAGTCTGCATCTTCCATAAGACACAAGAAGTATTCATCTACAGAGA
                 ************ ****************************************
```

***ribC*-Gen**

```
                                                              1310
Allel 1          TTTGCTGTAGAAGCGTGGGAAGAAGCGTTGCGTTTGACTAATCTTACACAATGGAC
Allel 2          TTTGCTGTAGAAGCGTGGGAAGAAGCGTTGCGTTTGACTAATCTTGCACAATGGAC
                 ******************************************** **********
                                             1360
Allel 1          GGAACATTTATTAATTTAGAACGTTCGCTACGATTGGGTGATGAAATGGGTGGGCA
Allel 2          GGAACATTTATTAATTTAGAACGTTCGCTACGATTAGGTGATGAAATGGGTGGGCA
                 ********************************** ********************

Allel 1          GTTTCTGGTCATATTGATGGTTTGGCTGAGATTATTGATCAGAAAAGCGAAGGTGA
Allel 2          GTTTCTGGTCATATTGATGGTTTGGCTGAGATTATTGATCAGAAAAGCGAAGGTGA
                 ************************************************************
                                                                1494  1499
Allel 1          GTTCGTTTTTTCCTACAAGTACCAAAGCGTTTTATACCTTTTATTGTAAATAAAGG
Allel 2          GTTCGTTTTTTCCTACAAGTACCAAAGCGTTTTATACCTTTTATTGTAAGTAAAGA
                 ************************************************ *****
```

***rpoB*-Gen**

```
                                    1779
Allel 1          ATATTGGTCTGATTAATTCCTTAGCAACCTTTGCGCGTGTTAATAAATATGGTTTT
Allel 2          ATATTGGTCTGATTAATTCCTTAGCAACCTTTGCACGTGTTAATAAATATGGTTTT
Allel 3          ATATTGGTCTGATTAATTCCTTAGCAACCTTTGCGCGTGTTAATAAATATGGTTTT
                 ********************************** ********************

                                2063
Allel 1          TATTCCGTTTTTGGAAAATGATGATGCGAATCGTGCGTTGATGGGATCTAATATGC
Allel 2          TATTCCGTTTTTGGAAAATGATGATGCGAATCGTGCGTTGATGGGATCTAATATGC
Allel 3          TATTCCGTTTTTGGAAAATGGTGATGCGAATCGTGCGTTGATGGGATCTAATATGC
                 ******************* **********************************
```

Abb. 5: Nukleotidvariationen der untersuchten Gene in *Bartonella henselae*. Die Nummern über den fett markierten Nukleotiden geben die Positionen an, welche Nukleotidpolymorphismen aufweisen. Identische Nukleotide im Vergleich zu Allel 1 sind durch einen Stern markiert. Mit Rot hervorgehoben ist das in dieser Arbeit neu identifizierte *rpo*B-Allel 3 des felinen *B. henselae*-Isolates Is-959.

Von den sequenzierten PCR-Produkten des Stammes *B. henselae* Berlin-2 wurden drei partielle Gensequenzen des Stammes in *GenBank* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi) veröffentlicht (s. Tab. 9).

Tab. 9: Veröffentlichung partieller Gensequenzen von *B. henselae* Berlin-2

Genabs.	*GenBank Accession Number*
gltA	EF451789
ftsZ	EF451788
ribC	EF451790

Im Rahmen dieser Arbeit konnte weiterhin ein neuer Nukleotidpolymorphismus für den *rpoB*-Genlokus (Abb. 5) identifiziert werden. Das feline Isolat Is-959 zeigte im Genlokus an der Position 2063 (partielle *rpoB*-Genssequenz Houston-1^T, Accession Nr. AF17070) eine neue Nukleotidvariation, welche bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht beschrieben wurde. Dieses neue Allel wurde als *rpoB*-Allel 4 bezeichnet und die neue Nukleinsäuresequenz wurde ebenfalls in *GenBank* hinterlegt (*Accession* Nr. EU289215).

Auf der Grundlage des resultierenden Allelprofils wurden die Stämme einem Sequenztyp zugeordnet (s. Anhang Tab. 10). Von den 184 untersuchten *B. henselae*-Isolaten konnten 182 in insgesamt 14 verschiedene Sequenztypen eingeordnet werden (s. Anhang Tab. 10).

Zwei felinen Isolaten konnte kein ST zugewiesen werden. Aufgrund des Vorhandenseins von zwei unterschiedlichen Genkopien des 16S rDNA-Gens in deren Genomen (s. 3.3) war es nicht möglich für diesen Lokus ein Allel und somit einen für das Isolat ein Sequenztyp zuzuordnen.

157 *Bartonella*-Isolate wurden zu den bereits sieben (ST 1 bis ST 7) publizierten ST´s zugeordnet (Iredell *et al*., 2003). Erstmals konnten im Rahmen dieser Arbeit sechs neue ST`s definiert werden, welche in der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit ST 9 bis 14 bezeichnet wurden. Das jeweilige Allelprofil eines jeden ST`s wird in der Tab. 11 gezeigt.

In der vorliegenden Studie repräsentiert das Marseille (Urlly8)-Isolat den Referenzstamm für das *rpoB*-Allel 2 und wurde im Zuge der ST-Klassifizierung dem ST 6 zugeordnet. Diese Ergebnisse stehen in Kongruenz zu bereits publizierten Arbeiten (Renesto *et al*., 2001; Iredell *et al*., 2003; Arvand und Viezens, 2007), weichen aber von den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Lindroos ab (Lindroos *et al*., 2006). Die Daten hatten einen zusätzlichen Polymorphismus im *rpoB*-Allel des Marseille-Isolates aufgezeigt, welche die Gruppe Lindroos veranlasste einen neuen ST für dieses Isolat zu definieren. Für das Isolat Ca-1wurde in dieser Arbeit das Allel 2 für das 16S rDNA und das *groEL*-Gen bestimmt und damit in den ST 5 eingeordnet. Dies stimmt mit zuvor veröffentlichten Daten (Ehrenborg *et al*., 2000; Zeaiter *et al*., 2002; La Scola *et al*., 2002) überein. Erneut weichen diese Ergebnisse von denen der Lindroos-Untersuchung ab, die den 16S rDNA und *gro*EL-Genabschnitten das

Allel 1 und somit ST 1 zuwiesen. Die in dieser Arbeit vorlegten Daten sind jeweils durch eine doppelsträngige Sequenzierung abgesichert.

Die dominierenden Sequenztypen unter den humanen und felinen Isolaten sind ST1, ST5 und ST6, welche insgesamt 109 der 184 Isolate zugeordnet werden konnten. Ebenfalls stark repräsentiert ist ST 7 unter den felinen Isolaten mit 43 Vertretern. Jeweils ein felines Isolat wurde als ST 3, ST 11, ST 12, ST 13 und ST 14 identifiziert. Dabei wird dem Isolat Is-959 ein neues *rpoB*-Allel zugewiesen und wird infolgedessen als ST 12 charakterisiert. Weiterhin wird einem Vertreter der humanen Isolate der ST 2 zugeordnet. Insgesamt 13 feline Isolate repräsentieren ST 8, ST 9 und ST 10.

Tab. 11: Allelprofil der 14 Sequenztypen von *B. henselae*-Isolaten

	16S rDNA	***batR***	***gltA***	***ftsZ***	***gro*EL**	***nlpD***	***rib*C**	***rpoB***
ST-1	1	1	1	1	1	1	1	1
ST-2	1	1	1	1	2	1	1	1
ST-3	1	2	1	1	2	1	1	1
ST-4	2	2	1	1	2	1	1	1
ST-5	2	1	1	1	2	1	1	1
ST-6	2	3	2	2	2	1	1	2
ST-7	2	4	2	3	1	2	2	1
ST-8	1	2	1	1	1	1	1	1
ST-9	2	1	1	1	1	1	1	1
ST-10	2	3	2	1	2	1	1	2
ST-11	2	3	2	2	1	1	1	1
ST-12	2	1	1	1	2	1	1	3
ST-13	2	3	1	2	1	1	1	1
ST-14	1	2	1	2	2	1	1	1

3.1.1 Evaluation des *eno*-Gens

Studien über das *eno*-Gen bei der Spezies *Bartonella henselae* konnten bereits zeigen, dass dieser Genlokus keine Allelvariationen aufweist (Iredell *et al*., 2003; Lindroos *et al*., 2006). Zur Bestätigung der getroffenen Aussagen wurden 50 verschiedene Isolate (human und felin) der 14 definierten Sequenztypen untersucht. Es wurden auch bei diesen *B. henselae*-Isolaten keine Nukleotidvariationen detektiert. Dieser partielle Genabschnitt ist für eine MLST-Analyse von *B. henselae* nicht geeignet und wird deshalb im weiterem Verlauf dieser Studie kein Bestandteil des MLST-Schemas darstellen.

3.1.2 Geographische Verteilung der MLST-Sequenztypen

Die *B. henselae*-Isolate und die ihnen zugeordneten 14 MLST-Sequenztypen wurden hinsichtlich ihrer geographischen Verteilung untersucht (Tab. 12). Die im Anhang in der Tabelle 2 aufgeführten *B. henselae*-Isolate wurden in den USA (34 Isolate), Europa (127 Isolate einschließlich der Isolate aus Israel) und Australien (33 Isolate) aus den Blut- und Gewebeproben von Patienten und Katzen isoliert. Dabei setzen sich die humanen Proben aus Blutkulturen von Katzen-Kratz-Krankheit-(CSD)- und HIV-positiven Patienten zusammen. Weiterhin sind Kulturen der *B. henselae*-Stammsammlung Bestandteil, welche aus dem Lymphknotenmaterial von CSD-Patienten gewonnen wurde. Es gab dabei keine festgelegten Zeitpunkte, an denen die Isolate gesammelt wurden. Der am zahlenmäßig am stärksten vertretende Sequenztyp ist mit 23,6 %, 20,9 %, 15,4 % und 23,6 % die folgenden ST´s: ST1, ST5, ST6 und ST7. Der geographische Ursprung der Isolate von ST1, ST5 und ST6 liegt dabei in Europa, Amerika und Australien. Dagegen tritt ST7 ausschließlich in Europa auf. Sieben ST´s mit besonders geringer Anzahl von Isolaten (ST2, ST3, ST10, ST11, ST12, ST13 und ST14) wurden nur auf einen Kontinent gefunden.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch die Untersuchung der Verteilungseigenschaften im Bezug auf die Gesamtanzahl der analysierten *B. henselae*-Isolate. Zwei verschiedene Signifikanztests wurden dabei eingesetzt. Durch den Fisher´s *exact* Test und den Chi-Quadrat Test wurde gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit gering ist, dass die geographische Verteilung der am häufigsten auftretenden Sequenztypen ein zufälliges Ereignis darstellt. ST1 und ST7 ($p<0{,}00001$) und ST6 ($p<0{,}039$) zeigen eine signifikante, geographische Verteilung (s. Tab. 12). Dagegen erfolgte die Verteilung von ST5 wahrscheinlich zufällig über die drei untersuchten Kontinente ($p>0{,}1$). Das Signifikanzniveau, die maximal zulässige Irrtumswahrscheinlichkeit, lag bei $\alpha=0{,}05$ für 5 % maximal zulässige Irrtumswahrscheinlichkeit.

Tab. 12: Geographischer Ursprung und Verteilung der Sequenztypen

Sequenztyp (ST)	Europa*	USA	Australien	*p*
1	13	17	13	<0,00001
2	0	0	1	0,165^
3	0	0	1	0,165^
4	7	0	4	0,090^
5	25	10	3	0,203

6	19	1	8	0,085
7	43	0	0	<0,00001
8	7	0	0	0,281ˆ
9	1	3	0	0,020ˆ
10	2	0	0	0,630ˆ
11	1	0	0	0,835ˆ
12	1	0	0	0,073ˆ
13	1	0	0	0,835ˆ
14	1	0	0	0,835ˆ

*****eingeschlossen sind Isolate aus Israel
ˆWert unter Vorbehalt zu sehen, da nur eine geringe Anzahl von Isolaten zur Verfügung stand

Von den 120 europäischen Isolaten werden 43 Isolate ST7, 19 Isolate ST6 und 25 Isolate ST5 zugeordnet (Abb. 6). Auf die Sequenztypen 5, 6 und 7 verteilen sich somit die Mehrheit mit 87 der 120 europäischen Isolate. Mit 72,5 % werden die Isolate aus dem europäischen Bereich nur in drei der 14 definierten ST´s eingeordnet. Dabei ist die Verteilung von Sequenztyp 7 signifikant (p=0,001). Den Sequenztypen 2 und 3 konnte kein *B. henselae*-Isolat, welches in Europa und auch den USA isoliert wurden war, zugewiesen werden. Weiterhin weicht die Verteilung in den einzelnen Regionen innerhalb Europas ab. Auffallend war die Prävalenz des ST1 in Italien und Israel, die jedoch in den anderen europäischen Bereichen wie Frankreich und Deutschland nahezu eine geringe Verteilungsrate aufwiesen. Für weitere Untersuchungen erfolgte deshalb nochmals eine Untertrennung der europäischen Region in zwei Bereiche: 1.) Israel, Italien und Marseille (mediterran) und 2.) alle anderen Isolate aus Europa (Nord-West-Europa).

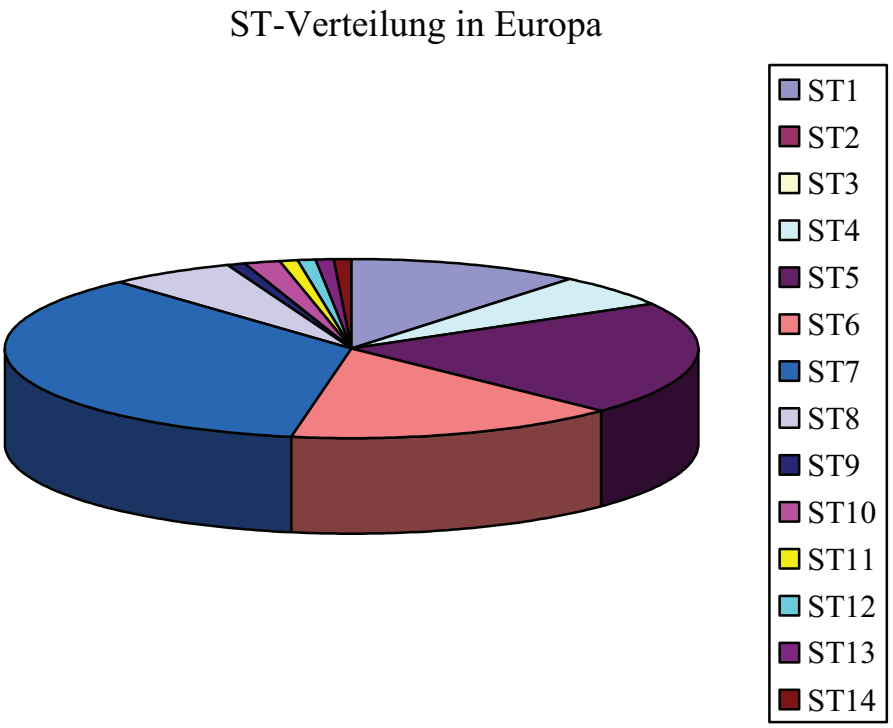


Abb. 6: Diagramm der Verteilung europäischer *B. henselae*-Isolate (human und feline Isolate) und ihrer Einordnung in die definierten Sequenztypen (ST).

Innerhalb Europas wurde ebenfalls die Prävalenz der ST´s untersucht (s. Tab. 13 und Abb. 7). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Verteilung nicht zufällig ist im Bezug auf die ST´s 1 und 7. Während im mediterranen Gebiet ST1 mit 12 Isolaten überrepräsentiert auftritt, ist dies für ST7 mit 42 Isolaten in Nord-West-Europa festgestellt wurden.

Tab. 13: Sequenztyp-Verteilung der *B. henselae*-Isolate innerhalb Europas

ST	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**
mediter. Europa*	**12**	0	0	0	5	3	1	1	0	0	0	1	0	0
NW-Europaˆ	1	0	0	7	**20**	**16**	**42**	6	1	2	1	0	1	1

* mediterraner Bereich Europas: Israel, Italien sowie das Isolat Marseille (Frankreich)
ˆ Nord-West-Europa: Groß Britannien, Deutschland und Frankreich

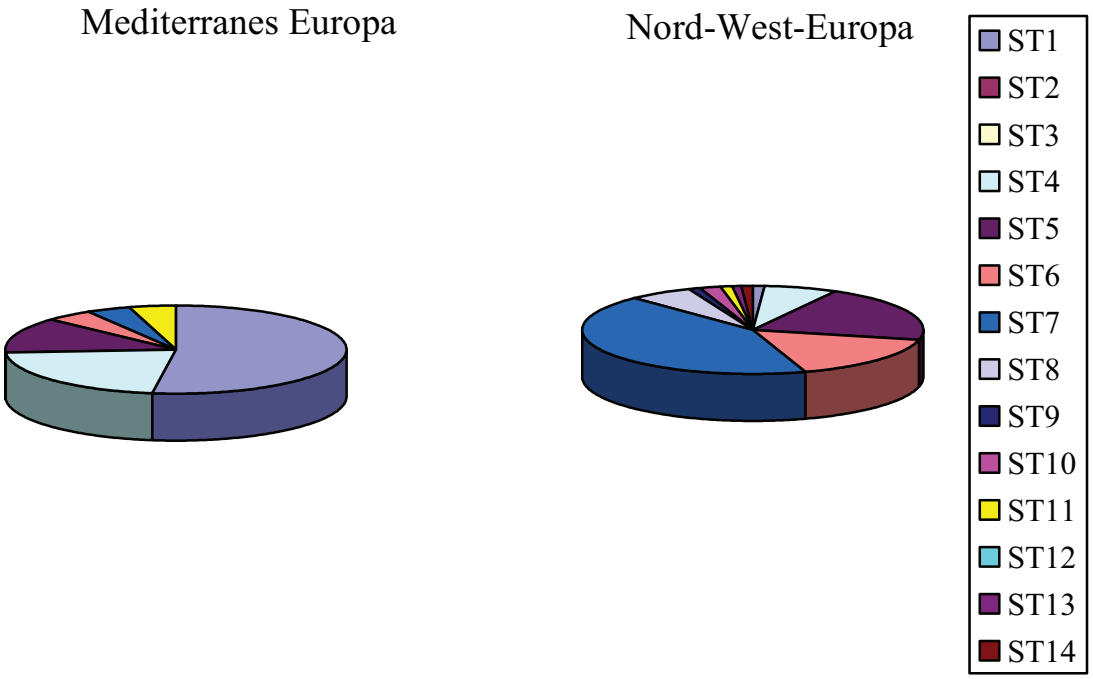


Abb.7: Geographische Verteilung der 14 Sequenztypen von *B. henselae* in Europa.

Vier der ermittelten Sequenztypen (ST1, ST5, ST6 und ST9) werden ebenfalls durch Isolate aus den USA repräsentiert (Abb. 8). Hierbei verteilen sich 54,83 % (= 17 Isolate) auf den ST1; 32,25 % auf ST5; 9,67 % auf ST9 und nur 3,22 % auf ST6. Im Gegensatz zu den europäischen Isolaten repräsentieren die Isolate aus dem Bereich Nord-Amerika hauptsächlich den ST1 und nicht ST7.

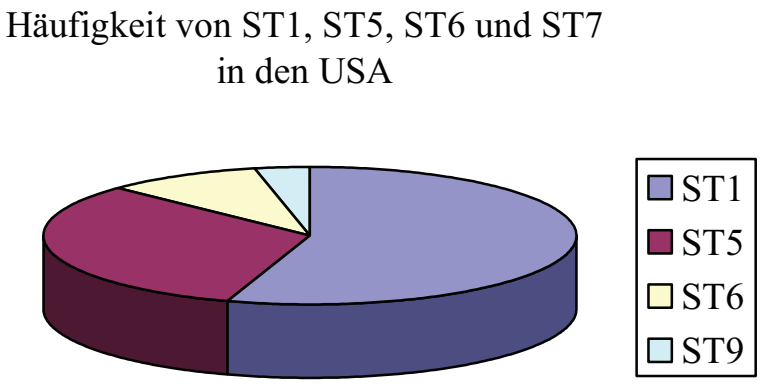


Abb. 8: Diagramm der Verteilung von ST1, ST5, ST6 und ST9 der *B. henselae*-Isolaten in den USA.

Die 30 Isolate aus Australien (einschließlich Neuseeland) sind ST1 bis ST6 zugeordnet wurden. Hierbei repräsentieren 43.33 % der Isolate hauptsächlich ST1 bzw. ST6 mit 26,66 % (Abb. 9). Der Sequenztyp 7 bis 14 konnte keinem der Isolate aus Australien zugewiesen werden. Im Vergleich zu den Isolaten aus Nord-Amerika repräsentieren auch diese Isolate zum überwiegenden Teil ST1, welcher durch den humanen Referenzstamm Houston-1^T dargestellt wird.

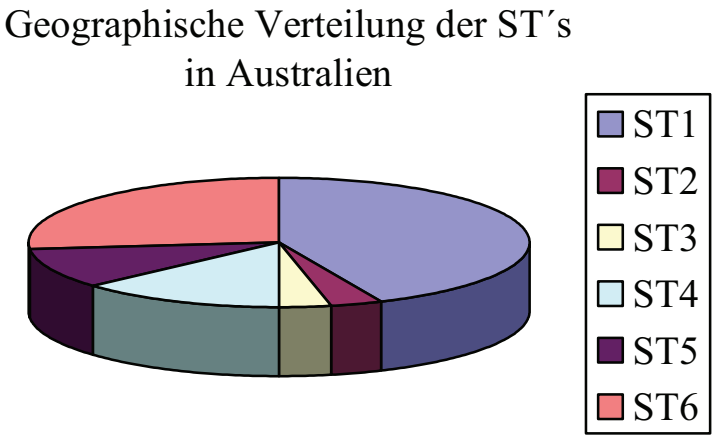


Abb. 9: Diagramm der Verteilung australischer *B. henselae*-Isolate und ihrer Zuordnung zu den Sequenztypen (ST). ST2 und ST3 repräsentieren jeweils nur ein Isolat aus der geographischen Region Australien. Diese beiden Sequenztypen traten ausschließlich bei Isolaten aus dieser Region auf.

3.1.3 Verteilung der Sequenztypen zwischen humanen und felinen *B. henselae*-Isolaten

Die Verteilung der definierten 14 verschiedenen MLST-Sequenztypen zwischen den felinen und humanen Isolaten wurde untersucht (Tab. 14). Die analysierten Isolate entstammen verschiedenen geographischen Regionen, wobei diese Studie 24 humane und 160 feline Isolate umfasste (Tab. 2 siehe Anhang). 158 feline Isolate wurden zu 13 verschiedenen Sequenztypen zugeordnet (Tab. 10, siehe Anhang).

Interessanterweise wird der ST 7 nur durch feline Isolate repräsentiert (Abb. 10), wobei der geographische Ursprung dieser Isolate sich nur auf europäische Region beschränkt. Von den 121 felinen Isolaten aus Europa repräsentieren 43 Vertreter (35,5 %) den Sequenztyp 7. Die Sequenztypen 3 und 4 bzw. 8 bis 14 werden ebenfalls ausschließlich durch feline Isolate repräsentiert. Weiterhin konnten 33 feline Isolate den ST5 und 26 Isolate ST6 zugeordnet werden. Humane Isolate konnten nur in vier verschiedene ST`s eingeordnet werden: ST1 (16),

ST5 (5), ST6 (2) und ST2 (1). Dabei ist eine Überrepräsentation der humanen Isolate in ST1 und ein unterproportionales Auftreten im Zusammenhang mit ST7 besonders auffällig. Dies wurde in der statistischen Auswertung der Daten mit dem Fisher´s *exact*-Test als p< 0,001 und somit als signifikant bewertet. Die anderen ST´s zeigten dagegen kein abweichendes Verteilungsmuster (Tab. 14).

Tab. 14: Verteilung der ST´s zwischen 182 humanen und felinen *B.henselae*-Isolaten

Sequenztyp	**Anzahl humaner Isolate**	**Anzahl feliner Isolate**	**Total**	**p**
1	16	27	43	<0,00001
2	1	0	1	0,132
3	0	1	1	1
4	0	11	11	0,364
5	5	33	38	1
6	2	26	28	0,542
7	0	43	43	0,00001
8	0	7	7	0,597
9	0	4	4	1
10	0	2	2	1
11	0	1	1	1
12	0	1	1	1
13	0	1	1	1
14	0	1	1	1

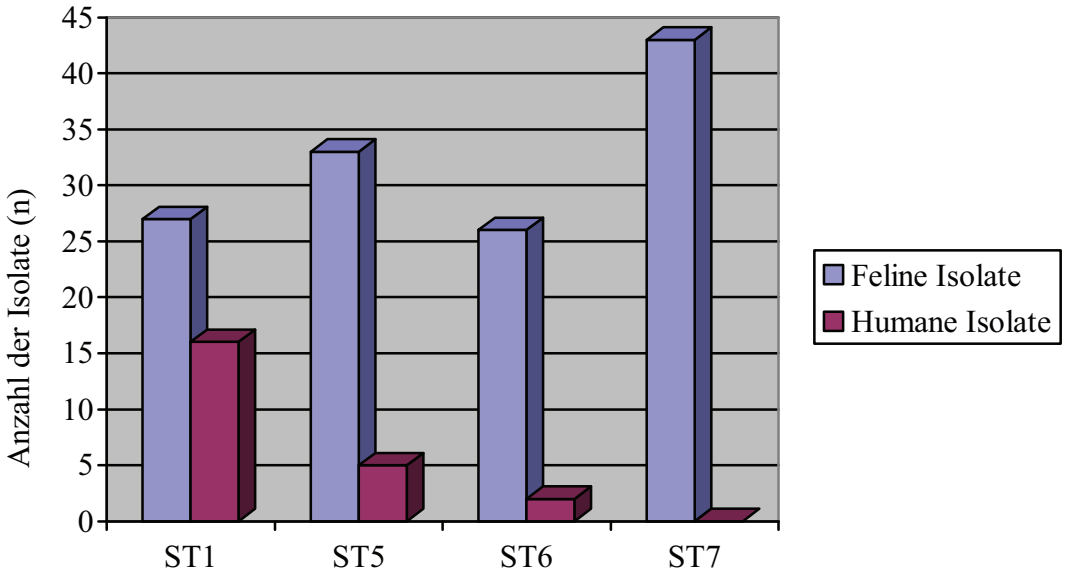


Abb. 10: Verteilung der humanen und felinen *B. henselae*-Isolate in ST1, 5, 6 und 7. Dargestellt sind die Anzahl der humanen und felinen *B. henselae*-Isolate der analysierten Stammsammlung, welche den ST1, 5, 6 und 7 zugeordnet werden konnten.

3.1.4 Klonale Verwandtschaft der humanen und felinen *B. henselae*-Isolaten

Mit Hilfe des *Based upon related sequence types* (BURST)- Algorithmus wurde die klonale Verwandtschaft der in der Tabelle 2 (s. Anhang) aufgeführten 182 humanen und felinen *B. henselae*-Isolate untersucht. Ausgenommen waren die Daten von zwei felinen Isolaten, denen kein Sequenztyp zugewiesen werden konnte (s. 3.3.1). Basis für die Analyse war die auf der Sequenzierung des 16S rDNA-Gens und der sieben *housekeeping* Gene *batR*, *ftsZ*, *gltA*, *groEL*, *nlpD*, *ribC* und *rpoB* resultierenden Allelprofile (Tab. 11). Der Datensatz bestand aus 14 verschieden Sequenztypen. Die Tabelle 15 zeigt die Resultate der BURST-Analyse.

Tab. 15: Ergebnisse der BURST-Analyse

Anzahl der Isolate	182
Anzahl der Sequenztypen	14
Anzahl klonaler Komplexe	3
Singletons/Sequenztypen gesamt	1/14
Founder-Sequenztyp/Klonaler Komplex 1	5
Subgroup-Founder-Sequenztyp/Klonaler Komplex 1	2; 3

Nach einem Vergleich der erhaltenen Sequenztypen, wobei die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der klonalen Linien nicht analysiert wurden, erfolgte die Darstellung der Daten in einem Diagramm (Abb. 11). Der BURST-Algorithmus identifizierte drei verschiedene klonale Komplexe (s. Tab. 16). Hierbei besteht Komplex 1 aus 9 ST´s mit insgesamt 107 Isolaten, welche die Mehrheit der 182 Isolate darstellen. Weiterhin wurde im Komplex 1 Sequenztyp 5 als *Founder*-ST definiert und die ST´s 2 und 3 als *Subgroup-Founder* klassifiziert. Die Anzahl der ST´s in einer Gruppe, welche sich nur an einem *single-locus* voneinander unterscheiden (hier 7 von 8 *loci* stimmen überein), wurden als *single locus variants* bezeichnet (SLV´s). ST´s, die sich in Bezug auf zwei *loci* voneinander differenzieren, wurden als *double locus variants* (DLV´s) bezeichnet. Weiterhin klassifizierte der BURST-Algorithmus ST´s mit Unterschieden in drei *housekeeping* Genen als *trippel locus variants* (TLV´s) und welche, die sich in mehr als drei *loci* unterscheiden und damit nicht als eng oder nah verwandt eingestuft werden als s*atellite* (SAT).

Tab. 16: Statistik der BURST–Analyse von Komplex 1

	SLV´s	*DLV´*s	*TLV´*s	*SAT*	*Bootstrap group Distance* (%)	*Bootstrap subgroup Distance* (%)	*average distance*
ST1	3	2	3	0	16	16	2,0
ST2	**3**	**5**	**0**	**0**	**21**	**20**	**1,62**
ST3	**4**	**2**	**2**	**0**	**47**	**50**	**1,75**
ST4	2	5	1	0	2	0	1,87
ST5	**4**	**2**	**2**	**0**	**49**	**50**	**1,75**
ST8	2	4	1	1	4	0	2,12
ST9	2	4	1	1	2	0	2,12
ST12	1	3	2	2	0	0	2,62
ST14	1	3	2	2	0	0	2,62

Im Ergebnis der BURST-Analyse konnte dagegen den klonalen Komplexen 2 und 3 kein eindeutiger *Founder*-ST zugewiesen werden (Abb.12 und 13). Der Sequenztyp 7 mit 43 felinen Isolaten, welche ausschließlich aus dem europäischen Raum stammen, wurde keinem der drei klonalen Gruppen zugeordnet und deshalb als *singleton* bezeichnet.

Der durchschnittliche Abstand (*average distance*) von jedem der analysierten ST´s zueinander in einer Gruppe ist ebenfalls berechnet und angegeben wurden (s. Tab. 16). Dieser Abstand wurde verrechnet mit der durchschnittlichen Anzahl von Unterschieden in den definierten Allelprofilen. Die angegeben *bootstraps* wurden für jeden ST in der Weise kalkuliert, dass

jeder ST als *Founder* bzw. *Subgroup-Founder* der untersuchten Gruppe angenommen wurde. Dabei wurde von einem Datensatz ausgegangen, der nur ein Beispiel von jedem ST in dem Input-Datensatz enthielt.

Sequenztyp 5, welcher als *Founder*-ST im klonalen Komplex 1 definiert wurde, repräsentiert den Ausgangsgenotyp mit einem *bootstrap* Wert von 49 %. Der Durchschnittswert des klonalen Abstandes ist bei einem *Founder*-ST am kleinsten im Vergleich zu den anderen ST´s. Von den 182 Isolaten entsprechen 32 Isolate Sequenztyp 5 (20,8 %) und sind in der Position des *Founder´*s der Mittelpunkt zu ST2, ST4, ST9 und ST12 (Abb. 11). Im Diagramm (s. Abb. 11) der BURST-Analyse ist dieser *Founder*-ST farblich im Zentrum als blauer Punkt dargestellt, welcher durch Linien mit den *single locus variants* (SLV´s): ST1, ST2, ST3, ST 4, ST8, ST9, ST12 und ST14 verbunden sind. Weiterhin sind 26 Isolate der zuvor genannten ST´s als *double locus variants* (DLV´s) definiert. Die SLV´s ST2 und ST3 wurden in Form gelber Punkte für die Repräsentanten des *Subgroup-Founder*-ST im Komplex 1 in der Abbildung wiedergeben.

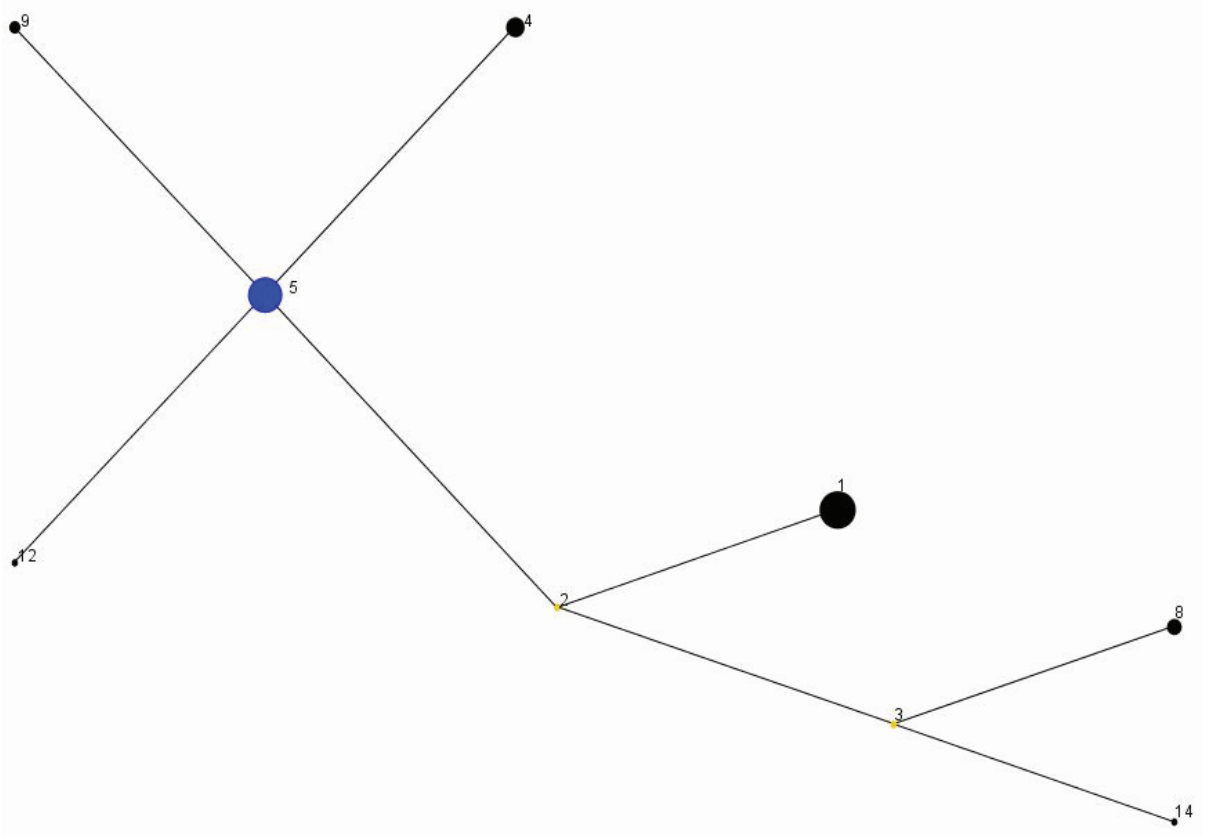


Abb. 11: BURST-Diagramm der analysierten *B. henselae*-Isolate. Klonaler Komplex 1 mit dem Ausgangsgenotyp ST5 (blau dargestellt) mit 4 verbundenen SLV´s (ST9, ST4, ST12 und ST2). Die *DLV´*s ST1, ST3, ST8 und ST14 des Founder-ST sind über den SLV ST2 verbunden. Der ST2 besitzt mit ST1 einen eigenen SLV und wurde deshalb als *Subgroup-Founder* bezeichnet (gelb dargestellt). Dies trifft ebenfalls auf ST3 mit den ST´s 8 und 14 zu.

Im Weiteren wurde mittels BURST-Analyse ein klonaler Komplex 2 identifiziert, welcher zwei ST´s und insgesamt 30 *B. henselae*-Isolate umfasste. Beide SLV´s: ST6 und ST10 sind durch eine Linie miteinander verbunden (Abb. 12). Jedoch konnte im Gegensatz zu Komplex 1 wie bereits beschrieben kein Ausgangsgenotyp klassifiziert werden. Auch wurden keine *DLV´s*, *TLV´*s und *satellites* klassifiziert. Der Abstand wurde mit einem Wert von 1,0 angegeben. Die ST´s dieser klonalen Gruppe unterscheiden sich also nur in einem einzelnen Gen-Lokus.

Abb.12: BURST-Diagramm des klonalen Komplex 2 mit zwei verbundenen SLV´s (ST6 und ST10).

In Analogie zu Komplex 2 wurde ein dritter klonaler Komplex definiert (Abb. 13). Wiederum besteht diese Gruppe aus zwei ST´s (ST11 und ST13), welche jedoch nur durch zwei Isolate repräsentiert werden. Weiterhin wurde auch bei dieser Gruppe kein *Founder*- sowie *Subgroup-Founder* identifiziert.

Abb. 13: BURST-Diagramm des klonalen Komplexes 3 mit zwei verbundenen SLV´s (ST11 und ST13)

Auf der Grundlage der DNA-Sequenzen in dieser Studie wurde weiterhin ein *neighbor-joining tree* unter der Verwendung des PHYLIP-Programms (www.pubmlst.) für die phylogenetische Analyse konstruiert (Abb. 14). Mit dieser *bottom-up* Clustermethode wurde eine Baumstruktur der genetischen Distanzen innerhalb der Sequenztypen errechnet, wobei angenommen wurde, dass die Veränderung der betrachteten Genabschnitte keine unbekannten Schritte enthält. Die Sequenztypen mit der geringsten Distanz wurden zu einem Knoten zusammengefasst. Im Vergleich zur BURST-Analyse treten die klonalen Komplexe nicht so deutlich hervor. Jedoch vermittelt es sehr gut die Diversität innerhalb der *B. henselae*-Population.

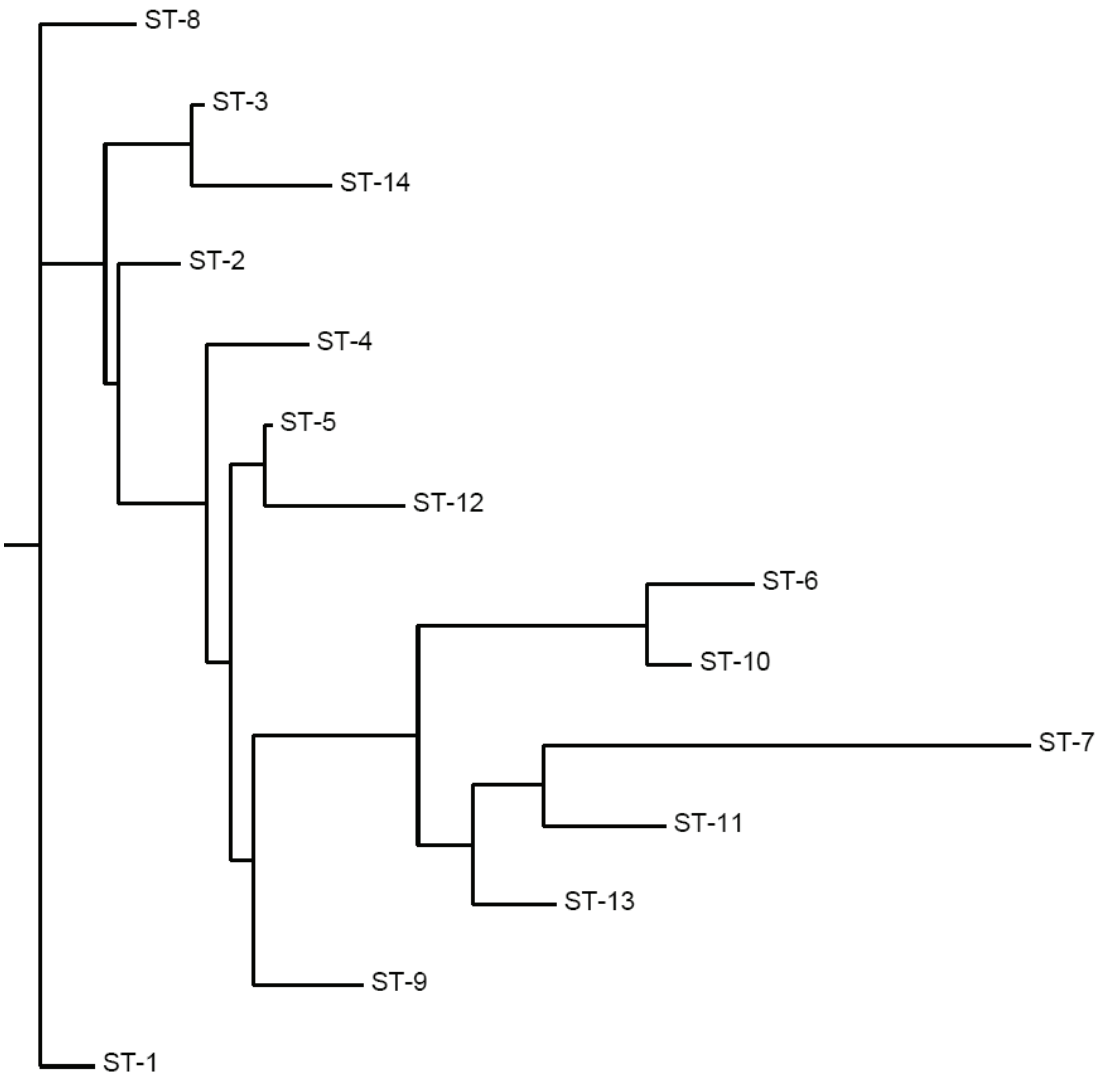


Abb. 14: Dargestellt ist der *neighbor-joining*-Stammbaum auf der Basis der Allelprofile unter Einsatz des PHYLIP-Programms.

3.2 Untersuchungen zur klonalen Verwandtschaft von *B. henselae*-Isolaten mit der Pulsfeld-Gelelektrophorese-Analyse

Die bisher erhaltenen Daten lassen auf eine nahe Verwandtschaft mit charakteristischen Zweigen innerhalb der Gruppe von humanen und felinen *B. henselae*-Isolaten (Tab. 17) schließen. Diese Ergebnisse besonders der MLST-Daten sollten durch eine Analyse der Klonalität dieser Isolate mit der PFGE-Methode bestätigt werden.

Tab. 17: Übersicht über die mittels PFGE analysierten *B. henselae*-Isolate und deren Herkunft

Isolat	**Wirt**	**Geographische Region**	**Referenz**
Berlin-1	Mensch	Deutschland	Arvand et al. (1998)
Berlin-2	Katze	Deutschland	Arvand et al. (2001)
B-K116	Katze	Deutschland	Arvand et al. (2001)
B-K181	Katze	Deutschland	Arvand et al. (2001)
FR96/BK79	Katze	Frankreich	Sander et al. (1998)
Urlly8 (Marseille)	Mensch	Frankreich	Drancourt et al. (1996)
Par-I107	Katze	Frankreich	Gurfield et al. (2001)
Par-I138	Katze	Frankreich	Gurfield et al. (2001)
LIV-G337	Katze	Groß Britannien	Birtles et al. (2002)
FIZZ	Katze	Schweiz	Zeaiter et al. (2002)
Houston-1^T	Mensch	USA	Regnery et al. (1992)
ATCC49793	Mensch	USA	Welch et al. (1992)
San Antonio-2	Mensch	USA	Dolan et al. (1993)
CAL-1	Mensch	USA	Anderson et al. (1994)
Syd-JR8	Mensch	Australien	Iredell et al. (2003)
Syd-JR9	Mensch	Australien	Iredell et al. (2003)
Syd-R987	Mensch	Australien	Iredell et al. (2003)
Syd-RMC3	Katze	Australien	Iredell et al. (2003)
Syd-RMC7	Katze	Australien	Iredell et al. (2003)
Syd-NU4714	Katze	Neuseeland	Iredell et al. (2003)

Für eine Analyse der klonalen Verwandtschaftsverhältnisse wurde die Makrorestriktion der DNA und deren Auftrennung im *pulsed-field* mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese angewendet: Die DNA einer repräsentierenden Auswahl von 20 verschiedenen *B. henselae*-Isolaten (Tab. 17) wurde mit fünf verschiedenen Restriktionsendonukleasen *ApaI*, *Eco*52I, *Not*I, *Sma*I und *Xma*JI für min. 16 Stunden inkubiert und anschließend mittels der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) der Molekülgröße nach aufgetrennt Die Anzahl der erhaltenen DNA-Fragmente betrug zwischen 4 bis 17 (Tab. 19). Hierbei wurden jedoch in die Bewertung der Daten Fragmente in einem Größenbereich von 30 bis 300 kb einbezogen, da nur in diesen Größenbereich eine eindeutige Auswertung möglich war.

Tab. 19: Anzahl der bewerteten Restriktionsfragmente in den Bereich 30 bis 300 kb

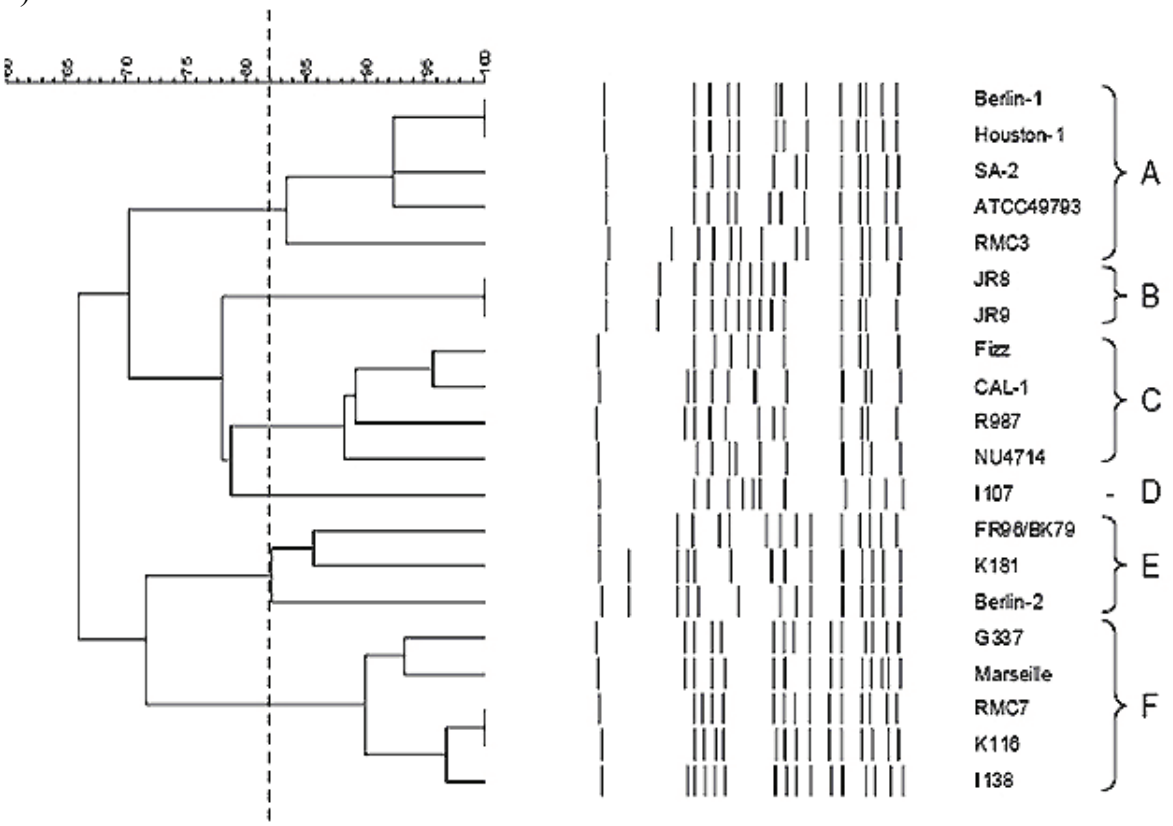
	*Apa*I	*Eco*52I	*Not*I	*Sma*I	*Xma*JI
Anz. Fragmente	9-11	12-14	4-6	11-14	15-17

Die folgenden Abb. 15 bis 19 (siehe Anhang) zeigen die Elektropherogramme nach der Restriktion mit den fünf verschiedenen Enzymen. Es wurden jeweils die 20 verschiedenen Isolate und der Megabase-DNA-Lambda-Ladder als Größenmarker aufgetragen.
Die entstandenen Fragmentmuster wurden mit dem Computerprogramm GelCompar der Firma Applied Maths (Kortijk, Belgien) ausgewertet.

3.2.1 Klonale Analyse der *B.henselae*-Isolate nach der Restriktion mit *Sma*I und *Not*I

Nach der Restriktion mit dem Enzym *Sma*I wurde ein Dendogramm erhalten, welches die Isolate in sechs verschiedene PFGE-Typen (A-F) mit einem *Dice*-Koeffizienten von 82 % einordneten (Abb. 20/1.). Die häufigsten vertretenen PFGE-Typen waren Typ A, E und F. Hierbei wird der Typ A durch den Referenzstamm Houston-1^T repräsentiert.
Im Gegensatz zu diesen Resultaten generierte das Enzym *Not*I nur vier bis sechs verschiedene Restriktionsfragmente in einem Größenbereich von 50 bis 650 kb. Auf Grundlage dieser wenigen zu bewertenden Banden wurden die analysierten Isolate 13 verschiedenen PFGE-Typen zugeordnet. Ein dominierendes PFGE-Profil war nicht erkennbar (Abb. 20/2).

1)



2)

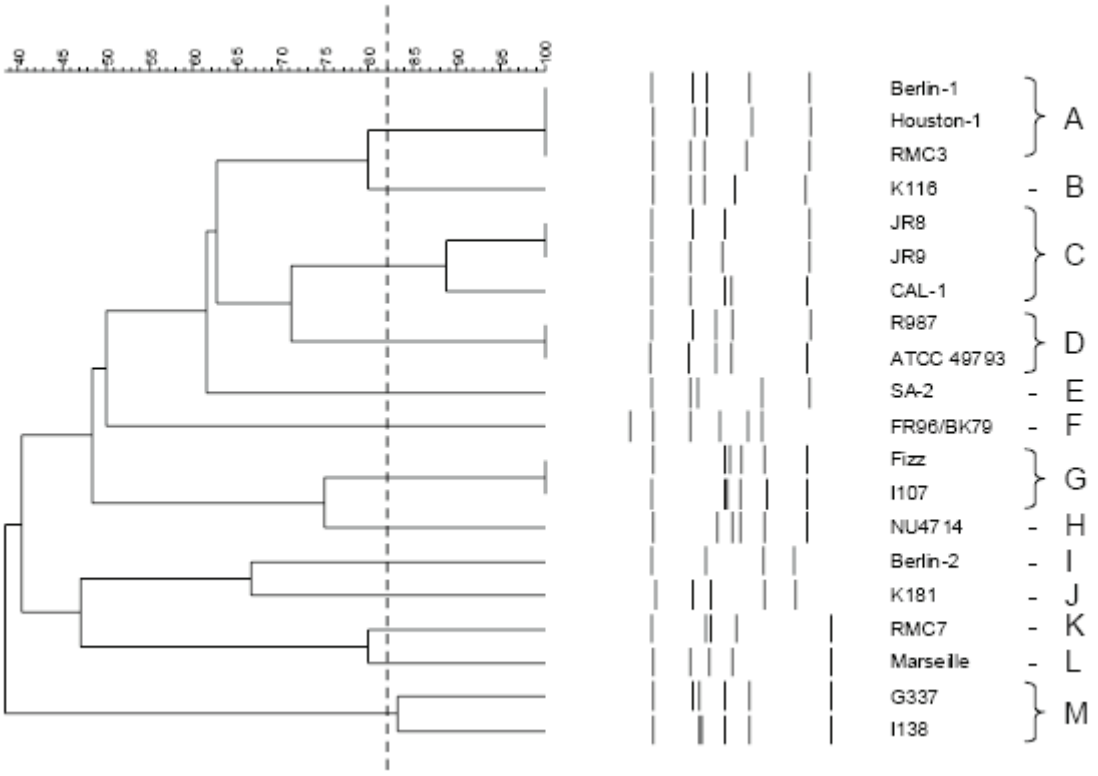


Abb. 20: Dargestellt sind Dendogramme, die durch eine UPGMA-Cluster Analyse der Restriktionsprofile nach der Restriktion mit dem Enzym *Sma*I (1) und *Not*I (2) von der DNA verschiedener *B. henselae*-Isolate und PFGE-Analyse erstellt wurden.

3.2.2 Klonale Analyse der *B.henselae*-Isolate nach der Restriktion mit *Apa*I, *Eco*52I und *XmaJI*

In der PFGE-Analyse generierten die folgenden Enzyme in dem für diese Studie festgelegten, zu bewertenden Größenbereich (30 bis 300 kb) 9 bis 17 Restriktionsbanden im Agarosegel:

*Apa*I 9-11 Banden

*Eco*52I 12-14 Banden

*Xma*JI 15-17 Banden.

Augrund dieser Daten wurden die Isolate in der oben genannten Reihenfolge zu 5, 4 und 5 verschiedenen PFGE-Typen zugeordnet (Abb. 21 und 22 siehe Anhang sowie Abb. 23). Auffällig war die Übereinstimmung dieser PFGE-Typen mit denen nach der Restriktion mit *Sma*I. Jedoch konnte keine Korrelation mit den *Not*I-PFGE-Profilen erhalten werden. Ein Überblick der definierten PFGE-Typen nach der Restriktion aller untersuchten Enzyme gibt die Tabelle 20.

Tab. 20: PFGE-Typen der analysierten 20 *B. henselae*-Isolaten nach der Restriktion mit fünf verschiedenen Enzymen

Isolat	***Sma*I**	***Not*I**	***Apa*I**	***Eco*52I**	***Xma*JI**
Berlin-1	A	A	A	A	A
Houston-1^T	A	A	A	A	A
San Antonio-2	A	E	A	A	A
ATCC49793	A	D	A	A	A
Syd-RMC3	A	A	A	A	A
Syd-JR8	B	C	A	A	A
Syd-JR9	B	C	A	A	A
Syd-R987	C	D	A	B	B
Syd-Nu4714	C	H	B	B	B
FIZZ	C	G	B	B	B
CAL-1	C	C	B	B	B
Par-I107	D	G	C	B	C
B-K181	E	J	D	C	D
Berlin-2	E	I	D	C	D
FR96/BK79	E	F	D	C	D
Liv-G337	F	I	E	D	E
Syd-RMC7	F	K	E	D	E
B-K116	F	L	E	D	E
Par-I138	F	M	E	D	E
Urlly8 (Marseille)	F	M	E	D	E

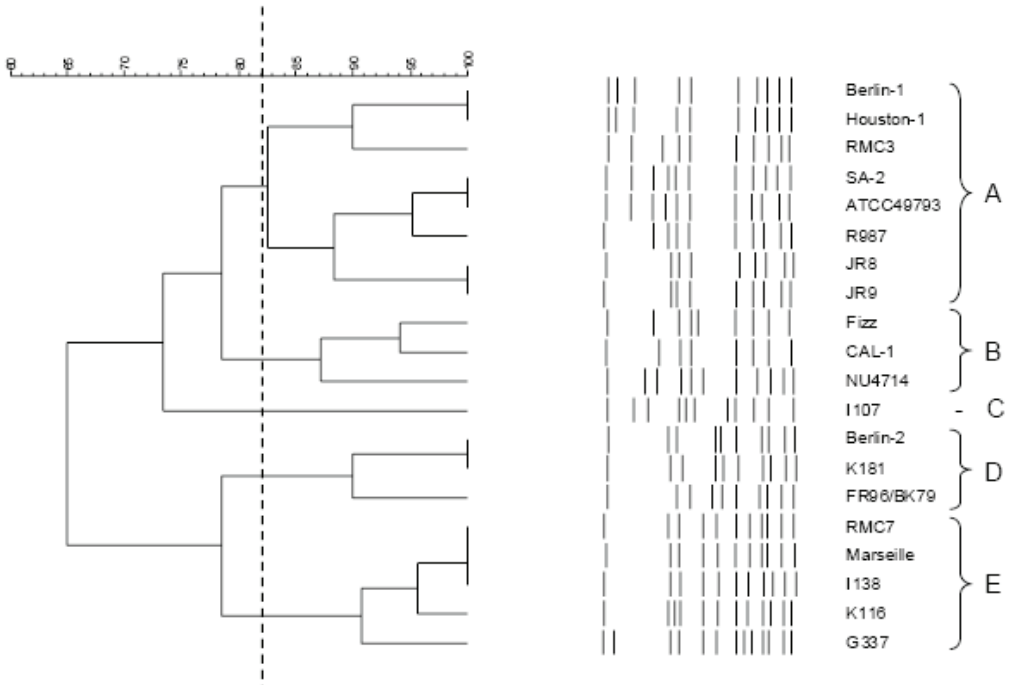


Abb. 23: Dargestellt ist ein Dendogramm, welches durch eine UPGMA-Cluster Analyse der Restriktionsprofile nach der Restriktion mit dem Enzym *Xma*JI der Gesamt-DNA von 20 *B. henselae*-Isolaten und PFGE erstellt wurde.

3.2.3 Vergleich PFGE und MLST in der klonalen Verwandtschaftsanalyse innerhalb von *Bartonella henselae*

Die 20 mittels PFGE analysierten *B. henselae*-Isolate wurden parallel mit der MLST-Methode durch die Sequenzierung von sieben verschiedener *housekeeping genes* untersucht und in fünf verschiedene Sequenztypen eingeteilt (Tab.21 und Tab. 10 s. Anhang). Dabei wurden 19 Isolate zu bereits publizierten ST´s eingeordnet. Weiterhin wurden der Referenzstamm Houston-1^T und sechs weitere Isolate dem ST1, vier Isolate zu ST5, fünf Isolate zu ST6 und 3 Isolate zu ST7 zugeordnet. Das feline Isolat Par-I107 wies eine neue, noch nicht beschriebene Allelkombination auf und wurde deshalb als ST8 bezeichnet. Alle Sequenztypen wurden nun mit den bereits erhaltenen PFGE-Typen verglichen (Tab. 21)

Tab. 21: Vergleich der *Sma*I-, *Apa*I-, *Eco*52I- und *Xma*JI-PFGE-Typen mit den definierten ST´s und Darstellung der zugewiesenen Klone.

Isolat	***Sma*I**	***Apa*I**	***Eco*52I**	***Xma*JI**	**ST**	**Klon**
Berlin-1	A	A	A	A	1	Houston-1^T
Houston-1^T	A	A	A	A	1	Houston-1^T
San Antonio-2	A	A	A	A	1	Houston-1^T
ATCC49793	A	A	A	A	1	Houston-1^T
Syd-RMC3	A	A	A	A	1	Houston-1^T
Syd-JR8	B	A	A	A	1	Houston-1^T
Syd-JR9	B	A	A	A	1	Houston-1^T
Syd-R987	C	A	B	B	5	CAL-1
Syd-Nu4714	C	B	B	B	5	CAL-1
FIZZ	C	B	B	B	5	CAL-1
CAL-1	C	B	B	B	5	CAL-1
Par-I107	D	C	B	C	8	Par-I107
B-K181	E	D	C	D	7	Berlin-2
Berlin-2	E	D	C	D	7	Berlin-2
FR96/BK79	E	D	C	D	7	Berlin-2
Liv-G337	F	E	D	E	6	Marseille
Syd-RMC7	F	E	D	E	6	Marseille
B-K116	F	E	D	E	6	Marseille
Par-I138	F	E	D	E	6	Marseille
Urlly8 (Marseille)	F	E	D	E	6	Marseille

Insgesamt ist eine hohe Übereinstimmung der PFGE-Resultate mit den MLST-Daten festzustellen. Die Ergebnisse von 16 Isolaten zeigten sogar eine 100%ige Konkordanz. In fünf von fünf Typisierungsarten wurden identische Ergebnisse erhalten.

Es konnten vier eindeutige Gruppen definiert werden. Weiterhin konnten die Isolate innerhalb einer Gruppe als klonal verwandt betrachtet werden und wurden deshalb zu vier charakteristischen Klonen zugeordnet, die zuerst als repräsentativer Vertreter dieser Gruppe klassifiziert wurden (Tab. 21). So zeigten die Isolate Houston-1^T, Sa-2, Berlin-1, ATCC49793 und RMC3 identische Typisierungsergebnisse und wurden deshalb zum Houston-1^T-Klon zugeordnet. Die Isolate Syd-JR8 und Syd-JR9 wurden, da diese vier von fünf identische Typisierungskategorien aufwiesen, als klonal sehr eng verwandt angesehen und dem Klon Houston-1 zugeordnet. Weiterhin zeigten die folgenden Isolate nur eine 80%ige

Übereinstimmung (d.h. eine Typisierungskategorie war nicht identisch), die jedoch immer noch als eng verwandt angenommen wurde: Das Isolat Syd-R987 wurde, obwohl ein abweichender *Apa*I-PFGE-Typ erhaltenen wurde, dem Klon CAL-1 zugeordnet. In der Konsequenz dieser neuen Allelkombination stellte das Isolat Par-I107 einen besonderen Fall dar und wurde deshalb als eigener Klon und Gruppe betrachtet.

3.2.4 PFGE-Analyse von *B. henselae*-Primärisolaten

Zur Bestimmung welche genetische Variante in einer natürlichen *B. henselae*-Population dominierend vorherrscht, wurden zunächst die Primärkulturen von zwei verschiedenen Isolaten (human und felin), von Berlin-1 und Berlin-2, mit Hilfe der PFGE und parallel mit der MLST-Methode analysiert.
Innerhalb der Einzelkolonien eines jeden Primärisolates konnten genetische Varianten detektiert werden. Nach der Restriktion mit dem Enzymen *Sma*I bzw. *Not*I wurden drei Unterschiede in den Makrorestiktionsmustern festgestellt (Tab. 22). Die Einzelkolonien vom Stamm Berlin-2 generierten Restriktionmuster, welche drei Banden Unterschied nach der Restriktion mit *Sma*I und zwei Unterschiede in der Analyse mit *Not*I aufwiesen (Tab. 22).

Tab. 22: Unterschiede im PFGE-Restriktionsmuster von Einzelkolonien von *B. henselae*-Primärisolaten

Isolat	Kolonie-nr.	*Sma*I-Typ	Bandenunters. zum *Sma*I-Haupttyp (A,C)	*Not*I-Typ	Bandenunters. zum *Not*I-Haupttyp (B,D)
Berlin-1	1	A1	1	B1	2
	2	A	-	B	-
	3	A2	1	B2	3
	4	A	-	B	-
Berlin-2	1	C	-	D	-
	2	C	-	D	-
	3	C1	2	D1	3
	4	C2	2	D	-

Die Einzelkolonien von Berlin-1 und Berlin-2 wurden weiterhin in einer MLST-Analyse zur Bewertung der genetischen Verwandtschaft eingesetzt. Dabei konnten die Kulturen von Berlin-1 dem ST1 und die Einzelkulturen von Berlin-2 dem ST7 eingeordnet werden (Tab. 23).

Tab. 23: Ergebnisse des MLST´s der Einzelkolonien primärer *B. henselae*-Isolate

Isolat	**Kolonie**	**16S rDNA**	***batR***	***gltA***	***ftsZ***	***groEL***	***ribC***	**ST**
Berlin-1	1	1	1	1	1	1	1	1
	2	1	1	1	1	1	1	1
	3	1	1	1	1	1	1	1
	4	1	1	1	1	1	1	1
Berlin-2	1	2	4	2	3	1	2	7
	2	2	4	2	3	1	2	7
	3	2	4	2	3	1	2	7
	4	2	4	2	3	1	2	7

In einer weiteren Sequenz-basierten Analyse mittels der AP-PCR (eigene Arbeitsgruppe, J. Berghoff) konnte ebenfalls die enge klonale Verwandtschaft bestätigt werden, da die jeweiligen Einzelkolonien von Berlin-1 und Berlin-2 identische AP-Muster zeigten.

Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass die hohe Frequenz von genetischen Varianten eines Einzelisolates ein Charakteristikum besonders von Primärkulturen darstellt und diese Fähigkeit im Laufe von mehreren *in-vitro*-Passagen verloren geht. Zur Bestätigung dieser Annahme wurden weitere PFGE-Analysen von fünf passagierten Stämmen (human und felin) vorgenommen. In diesem Versuchsaufbau wurde gleichzeitig von mehreren Kolonien eines Isolates DNA-Analysen mit der PFGE-Methode vorgenommen. Dafür wurden jeweils ca. 10 bis 15 Kolonien eines Primärisolates auf neue Nährböden überimpft und dann mit Hilfe der Pulsfeld-Gelektrophorese untersucht. Für diese Analysen wurde das Restriktionsenzym *Sma*I eingesetzt, welches hierbei als besonders geeignet erschien. Als Ergebnis konnten identische PFGE-Profile ab der 20. Passage für die Stämme Berlin-1 und Berlin-2 aber auch für It-149627, Zipper und B-K161 erhalten werden (Tab. 24 bis 27).

Abweichend im Vergleich sind die Anzahl der möglichen genetischen Variationen und deren Wechsel bis zur Passage 20. Während Berlin-1 und-2 bzw. It-149627 und B-K161 nur zwei bis drei genetische Varianten zeigen, die sich dann stabil auf einen bestimmten Haupttyp einstellen, kann bei Zipper kein dominierender Typ bestimmt werden.

Tab. 24: PFGE-Resultate von *B. henselae* Berlin-1 und Berlin-2

Berlin -1	SK2	SK5	SK10	SK15	SK20 - SK50	Berlin-2	SK2	SK5	SK15	SK20
1	A1	**A3**	A3	A3	A3	1	A	A	A	A
2	A1	A1	A3	A3	A3	2	A	A	B	A
3	**A2**	A1	A3	A3	A3	3	A	A	A	A
4	A1	A1	A3	A3	A3	4	A	A	B	A
5	**A2**	A1	A3	A3	A3	5	A	A	A	A
quer	A1	**A3**	A3	A3	A3	quer	A	A	A	B

Tab. 25: PFGE-Resultate der Einzelisolate und Querabimpfung von *B. henselae* Zipper

	SK10	**SK15**	**SK20**	**SK30**	**SK35**	**SK40**
A	a	a	a	a	a	a
B	a	a	a	a	a	a
C	a	a	**c**	**c**	**c**	**c**
D	a	a	a	a	a	a
E	**b**	a	a	a	a	a
quer	a	a	a	a	a	a

Tab. 26:PFGE-Resultate der Einzelisolate und Querabimpfung von *B. henselae* It-149627

	SK5	**SK10**	**SK15**	**SK20**	**SK35**
A	A	A	A	A	A
C2	A	A	A	**B**	**A**
D1	**B**	**B**	**A**	**A**	**B**
F	**B**	A	A	A	A
E	A	**B**	**B**	A	A
quer	A	A	A	A	A

Tab. 27: PFGE-Resultate der Einzelisolate und Querabimpfung von B-K161

	SK5	**SK10**	**SK15**	**SK20**	**SK35**	**SK40**
C	A	**C**	**B**	**D**	**C**	**C**
D	B	B	B	B	B	B
E	B	B	**E**	B	B	B
F	B	B	B	**E**	**D**	**D**
quer	A	A	**C**	**B**	**B**	**B**

3.2.5 MLST-Analyse der PFGE-Varianten innerhalb von Primärisolaten von *B. henselae*

PFGE-Analysen von Primärisolaten (J. Berghoff, eigene Arbeitsgruppe) führten zu der Hypothese, dass Isolate mit ein bis drei Bandenunterschieden in einem Makrorestriktionsmuster eng verwandt sind und einen gemeinsamen Stamm repräsentieren. Dies ist wahrscheinlicher als eine Ko-Infektion eines Wirtes mit zwei verschiedenen *B. henselae*-Stämmen. Deshalb wurden die bereits mittels PFGE (J. Berghoff, eigene Arbeitsgruppe) analysierten zwei verschiedenen Single-Kolonien von zehn unterschiedlichen Primärisolaten durch MLST typisiert. Beide einzelnen Kolonien zeigten einen identischen Sequenztyp (Tab.28), was daraufhin deutet, dass sie zu einem gemeinsamen Stamm gehören. Weiterhin bestätigen diese Daten die PFGE-Analysen.

Tab. 28: MLST-Daten der Einzelkolonien von zehn verschiedenen Primärisolaten

Primärisolat	Einzelkolonie	Sequenztyp
Berlin-1	A,C	1
Berlin-2	A,C	7
It-8697/1	A,B	1
It-123930/2	A,B	1
Sunday	A,B	1
Cody	A,C	1
Buster Brown	A,B	5
Sam	A,B	1
Red Dog	A,D	1
Sweetie	A,B	5

3.3 16S rDNA-Amplifikation und -Sequenzierung

Im Rahmen der MLST-Analyse von *B. henselae*-Isolaten wurden für zwei feline Isolate (Is-479 und B-K186) bei der Amplifikation des partiellen 16S rDNA-Gens und anschließenden Sequenzierung keine eindeutigen Ergebnisse erhalten. Eine Bestimmung der Nukleotidsequenz gelang nur von der Position 62 bis 172 bp (*B. henselae* Houston-1^T 16S rDNA-Gen, Acc.nr. NC_005956.1) in den *forward*-Sequenzanalysen und analog in den *reverse*-Sequenzierungen von den Positionen 175 bis 464. Die verbleibende

Nukleotidsequenz zeigte zwei sich überlappende Sequenzsignale. Diese Ergebnisse gaben einen Hinweis auf die Existenz von zwei unterschiedlichen 16S rDNA-Genkopien im Genom. Zur Bestätigung dieser Annahme wurde das 16S rDNA-Gen von beiden Isolaten kloniert und sequenziert. Weiterhin erfolgten Hybridisierungsexperimente um die Hypothese von unterschiedlichen Genkopien zu unterstützen.

3.3.1 Zwei unterschiedliche Nukleotidsequenzen der 16S rDNA in *B. henselae*

Nach der Klonierung des 16S rDNA-PCR-Amplifikates wurde eine Sequenzierung in beiden Orientierungen (*forward*- und *reverse*) durchgeführt. Von dem Isolat B-K186 wurden neun Klone isoliert und die DNA sequenziert. Es konnten zwei Typen von 16S rDNA-Sequenzen gefunden werden: drei Klone entsprachen den 16S rDNA-Typ I und sechs Klone dem Typ II. Ein vergleichbares Bild wurde bei der Analyse des Isolates Is-479 erhalten. Von den acht untersuchten Klonen wiesen sechs den Typ I und zwei den Typ II auf. Sequenzvergleiche mit Hilfe des Blast-Programmes ermittelten eine 100%ige Homologie mit der in der Genbank hinterlegten partiellen 16S rDNA-Sequenz von *B. henselae* Houston-1^T (Acc.nr. NC_005956.1) oder *B. henselae* Urllly8 (Acc.nr. AF214556) auf. Beide Sequenzen differieren voneinander in nur 3 bp einschließlich einem *gap* in der Position 172 bis 175 bezogen auf die partielle 16S rDNA-Gensequenz des Referenzstammes Houston-1^T. Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass zwei Genkopien der 16S rDNA in diesen beiden felinen Isolaten existieren.

3.3.2 Bestimmung der 16S rDNA-Genkopienanzahl

Zur Bestätigung der Hypothese von zwei verschiedenen 16S rDNA-Kopien wurden Southern Blot-Experimente mit der genomischen DNA von vier verschiedenen humanen und felinen *B. henselae*-Isolaten (Houston-1, Urlly8, B-K186 und Is-479) durchgeführt. Nach der Restriktion mit *Hind*III (Restriktionsschnittstelle außerhalb des 16S rDNA-Gens, Abb. 24) konnten mittels DIG-markierter homologer 16S rDNA-PCR-Sonde zwei Hybridisierungsfragmente für jedes *B. henselae*-Isolat detektiert werden (nicht gezeigt). Die Molekulargröße der Fragmente betrug 2,7 und 3,7 kb. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass zwei Genkopien in den analysierten Isolaten existent sind. Zur Untermauerung der Resultate wurden Southern blot-Experimente mit *Hinc*II verdauter DNA vorgenommen.

Dieses Restriktionsenzym besitzt ebenfalls keine Erkennungsschnittstelle in der 16S rDNA-Sequenz. Nach der Hybridisierung mit der homologen 16S rDNA-Sonde wurden für jedes Isolat Signale eines 4,7 und 4,9 kb-Fragmentes detektiert (Abb. 25). Somit kann angenommen werden, dass zwei Kopien des 16S rDNA-Gens in *B. henselae* existieren.

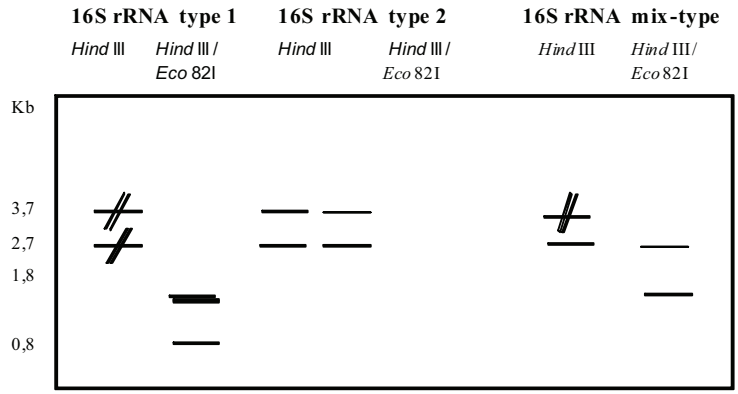


Abb. 24: Hybridisierungsfragmente von genomischer DNA der *B. henselae* 16S rDNA-Varianten nach der Restriktion mit *Hind*III und dem Doppelverdau mit *Hind*III/*Eco*82I.

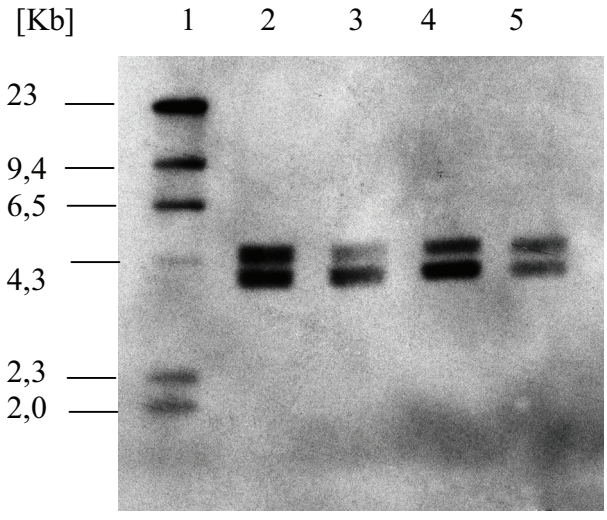


Abb. 25: Autoradiogramm nach Southern-Hybridisierung der Gesamt-DNA von *B. henselae*-Isolaten nach der Restriktion mit *Hinc*II und Hybridisierung mit der 16S rDNA-PCR-Sonde
Spur 2: *B. henselae* Urlly8, Spur 3: *B. henselae* Houston-1, Spur 4: *B. henselae* B-K186 und Spur 5: *B. henselae* Is-479. Spur 1 zeigt den Molekulargrößenmarker DIG II.

Die Kopienanzahl des 16S rDNA-Typ I wurde durch die Hybridisierung mit der 16S rDNA-Sonde nach der Doppelrestriktion der genomischen DNA mit *Hind*III und *Eco*82I (Restriktionsschnittstelle innerhalb des 16S rDNA Typ I) nachgewiesen. Für den Referenzstamm Houston-1 wurde ein 1,8 kb - und 0,8 kb-Fragment sowie für das Isolat Urlly8 ein 3,7 kb und ein 2,7 kb-Fragment detektiert (Abb. 26). Da das Enzym *Eco*82I eine Restriktionsschnittstelle innerhalb des 16S rDNA Typ I besitzt, konnte eindeutig bestätigt werden, dass Houston-1^T zwei identische Kopien des Typ I und Urlly8 ausschließlich zwei Allele des Typs aufweist. Die beiden felinen Isolate jedoch konnten weder dem Typ I noch Typ II zugeordnet werden. Bei diesen Isolaten wurden Signale eines 2,7 kb und eines 1,8 kb-Fragmentes detektiert (Abb. 26). Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass in den Isolaten B-K186 und Is-479 verschiedene 16S rDNA-Genkopien in den Genomen existieren.

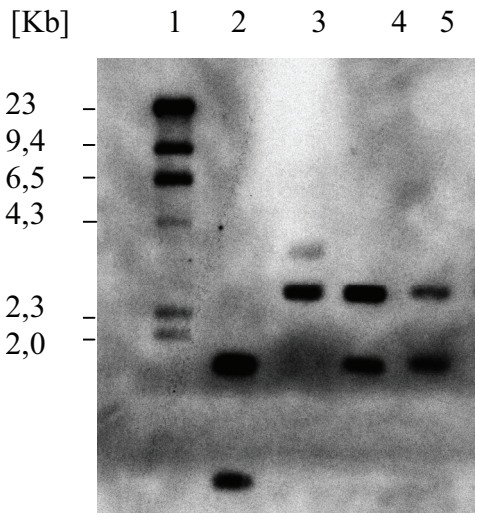


Abb. 26: Autoradiogramm nach Southern-Hybridisierung der Gesamt-DNA von *B. henselae*-Isolaten nach der Doppelrestriktion mit *Hind*III/*Eco*82I und Hybridisierung mit der 16S rDNA-PCR-Sonde
Spur 2: *B. henselae* Urlly8, Spur 3: *B. henselae* Houston-1, Spur 4: *B. henselae* B-K186 und Spur 5: *B. henselae* Is-479. Spur 1zeigt den Molekulargrößenmarker DIG II.

3.4 Differenzierung der *B. henselae*-Isolate durch 16S rDNA-typenspezifische PCR

Basierend auf den 16S rDNA-Genpolymorphismus (Tab. 29) wurden in einer bereits veröffentlichten Studie (Bergmann *et al*., 1995) zwei typenspezifische PCR´s entwickelt.

Tab. 29: Allel-Polymorphismus der 16S rDNA von *B. henselae*

Position	172	173	174	175	176
Type I (Houston-1^T)	T	-	T	A	G
Type II (Urlly8)	T	A	T	T	T

Nach Durchführung der PCR´s wurde in der Kombination Primer BH1/Forwardprimer eine 185 bp-Bande detektiert mit der Gesamt-DNA der felinen Isolate B-K186 und Is-479 sowie den Isolaten des 16S rDNA-Typ I (Abb. 27). Aber auch in der PCR mit der Primerkombination BH2/Forwardprimer, die spezifisch eine 185 bp-Bande des Typs II generiert, wurde ein entsprechendes PCR-Produkt amplifiziert (Abb. 27). Der Referenzstamm Houston-1^T generierte ausschließlich in der PCR des Typ I ein PCR-Produkt wie der für Typ II stellvertretend eingesetzte Stamm Urlly8 nur in der 16S rRNA typenspezischen Reaktion des Typs II ein Produkt amplifizierte. Die analysierten Isolate B-K186 und Is-479 dagegen amplifizierten ein positives PCR-Ergebnis in beiden Reaktionen und repräsentieren somit simultan Genotyp I und Genotyp II. Eine eindeutige Eingruppierung ist auf Grund der vorliegenden Ergebnisse nicht möglich.

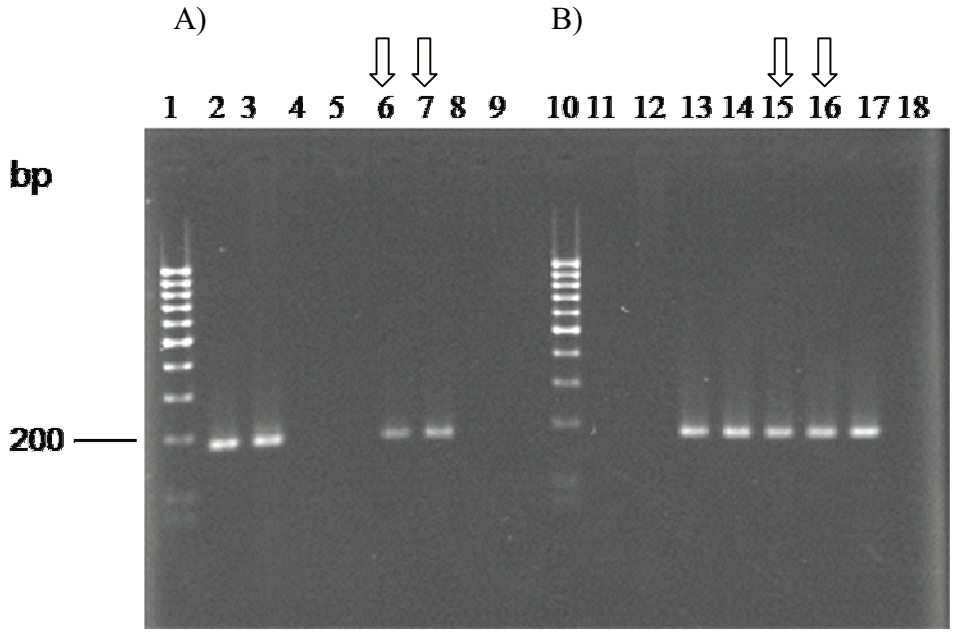


Abb. 27: Auftrennung der PCR-Amplifikate nach der 16S rDNA typenspezifischen PCR mit der DNA von *B. henselae*-Isolaten.
Die analysierten Isolate sind oberhalb der Abb. durch Ziffern gekennzeichnet. (A) Spur 1 bis 9 zeigt 185 bp-PCR-Produkte nach der typenspezifischen PCR des 16S rDNA Typ I, der stellvertretend durch Houston-1 dargestellt wird. (B) Spur 10 bis 18 zeigt die 185 bp-PCR-Produkte nach der typenspezifischen PCR des 16S rDNA Typ II, der durch Urlly8 repräsentiert wird.
Spur 1 und 10: 100pb-GeneRuler (MBI-Fermentas) als Molekulargrößenmarker. Spur 2/11: *B. henselae* Houston-1, Spur 3/12: *B. henselae* Berlin-1, Spur 4/13: *B. henselae* Urlly8, Spur 5/14: *B. henselae* Berlin-2, Spur 6/15: *B. henselae* B-K186, Spur 7/16: *B. henselae* Is-479 und Spur 8/17: *B. henselae* Cal-1. Spur: 9/18: Negativkontrolle.

4. Diskussion

Wegen seines Status als Erreger zahlreicher Erkrankungen beim Menschen u.a. der CSD, Endokarditis, Hepatitis Peliosis oder Bakteriämie war der pathogene Mikroorganismus *B. henselae* häufig das Ziel von epidemiologischen Untersuchungen. Verschiedene Studien hatten bereits dabei eine hohe Diversität innerhalb der natürlichen Population von *B. henselae* durch die Anwendung verschiedener Typisierungsmethoden zeigen können. Parallel gelang durch die Analyse des 16S rDNA-Gens eine Gliederung der Bakterien in zwei verschiedene Subtypen, Typ I und II mit jeweils spezifischen Gensequenzen. Die Einteilung aufgrund der spezifischen Gensequenz in der 16S rDNA wurde über eine lange Zeit als ausreichend betrachtet. Diese Gliederung zeigte jedoch beim Vergleich mit der phylogenetischen Klassifizierung auf der Basis der Nukleotidsequenzen anderer Gene wie *groEL*, *ftsZ*, und *rpoB* keine Übereinstimmung (Zeaiter *et al*., 2002; Ehrenborg *et al*., 2000).
Mit der Entwicklung des *Multi-Locus Sequence Typing* trat diese genotypische Einordnung in den Hintergrund und die Populationsstruktur konnte nun exakter analysiert werden (Iredell *et al*., 2003). Durch ein reproduzierbares, exaktes und schnelles Typisierungssystem konnte die Evolutionsbiologie des pathogenen Bakteriums sehr gut reflektiert werden. So wurde bei der Beurteilung von 37 australischen Isolaten von der Arbeitsgruppe um Iredell aufgezeigt, dass humane Isolate eine homogenere Struktur aufwiesen als feline Isolate. Weiterhin wurde deutlich gemacht, dass die allele Variation des 16S rDNA-Genlocus nicht als Indikator für die Wiedergabe der klonalen Populationsstruktur von *B. henselae* geeignet war. Vielmehr wurde die These verfolgt, dass durch den horizontalen Gentransfer die Diversität innerhalb der Spezies erzeugt wird.

4.1 MLST-Analyse von *B. henselae*-Isolaten

Ausgehend von ersten MLST-Arbeiten (Iredell *et al*., 2003; Lindroos *et al*., 2006) wurde in dieser Arbeit erstmals eine Stammsammlung von 182 humanen und felinen *B. henselae*-Isolaten aus unterschiedlichen geographischen Regionen, welche drei Kontinente (Europa, USA, Australien) einschloss, untersucht. Dabei sind humane Isolate im Vergleich zu felinen Isolaten jedoch nur in geringer Anzahl vertreten bzw. konnten aus bestimmten

geographischen Regionen nicht erhalten werden. Auch ist keine vergleichbare Anzahl von Isolaten aus streunenden und Hauskatzen in der Stammsammlung vertreten. Somit spiegelt dieses analysierte Panel nicht eine vollkommen natürliche Population von *B. henselae* wieder, ist jedoch eine ausreichend gute Zusammenstellung von *B. henselae*-Stämmen wie sie bei Menschen und Katzen auftreten können.

Für die Untersuchungen wurden Zielgene ausgewählt, die in Sequenz-basierten Studien von *B. henselae* etabliert und als *housekeeping* Gene besonders geeignet schienen. *Housekeeping* Gene sind, da in diesen Bereichen selten Rekombinationsereignisse geschehen (Boyd und Hartl, 1997), sehr gute Zielgene bei Sequenzierungsstudien wie dem *Multi-Locus Sequence Typing*. Für die Auswahlkriterien wurde weiterhin mit einbezogen, dass sich diese Gene nicht in unmittelbarer Nachbarschaft zu anderen Genen mit einem erhöhten Selektionsdruck befinden, um eine größere Wahrscheinlichkeit von Rekombinationsereignissen auszuschließen (Maiden *at al*., 1997). Auch wurde Augenmerk darauf gelegt, dass sich keine *hotspots* für Rekombinationsereignisse in den untersuchten partiellen Genabschnitten befanden.

In dieser Arbeit wurden deshalb partielle Sequenzabschnitte der folgenden Gene untersucht: das 16S rDNA-Gen, das Gen der Citratsynthase *gltA*, das Gen des Zellteilungsproteins *ftsZ*, das Gen des Hitzschockproteins *groEL*, das Gen des Riboflavins *ribC* und das Gen der RNA-Poylmerase beta-Untereinheit *rpoB*. Das *bat*R-Gen kodiert für ein Regulatorprotein, welches homolog zu dem *BvrR*-Gen von *Brucella abortus* ist, einem eng verwandten Mikroorganismus von *B. henselae*. Es wurde deshalb ebenfalls als Zielgen ausgewählt. *nlpD* kodiert für ein Zelloberflächenprotein mit noch unbekannter Funktion und war ebenfalls Bestandteil dieser MLST-Studie. Für die Evaluation weiterer Genlocus-Kandidaten in der MLST-Analyse wurde das Enolase-Gen (*eno*) bei 50 verschiedenen Isolaten untersucht. Die Genfragmente besitzen eine Größe von 350-500 bp. Die resultierenden Nukleotidsequenzdaten wurden durch eine doppelsträngige Sequenzierung sowie durch den Einsatz von 20 zufällig ausgewählten Teststämmen, welche in einer Blindstudie eingesetzt wurden, abgesichert.

Durch die erhaltenen Allelprofile der acht *housekeeping* Gene in der vorliegenden Untersuchung konnten 14 verschiedene Sequenztypen für die 182 *B. henselae*-Isolate bestimmt werden. Die Sequenztypen ST1, ST5, ST6 und ST7 repräsentieren die Haupt-Sequenztypen und stellen 83,5 % der Isolate (human und felin) dar. Die MLST-Analyse gab einen Einblick in das Verhältnis von Sequenztyp und Wirtsspezies, der geographischen

Zusammenhänge sowie der phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der *B. henselae*-Population.

4.1.1 Geographische Verteilung der *B. henselae*-Sequenztypen

Das Vorkommen der 14 *B. henselae*-Sequenztypen ist geographisch betrachtet nicht gleichmäßig. Im Gegensatz zu den Daten von Lindroos *et al*. 2006 konnten Zusammenhänge zwischen der geographischen Verteilung und bestimmten ST´s identifiziert werden. Bestimmte Sequenztypen treten nur begrenzten Regionen auf, was auf eine andere evolutionäre Entwicklung des einzelnen ST´s aufgrund von abweichenden Umweltbedingungen schließen lassen könnte. ST1, ST5 und ST6 konnten als Vertreter auf allen drei Kontinenten gefunden werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass diese ST´s weltweit vertreten sind. Die phylogenetischen Analysen identifizierten für die Gruppe 1 mit den meisten *B. henselae*-Isolaten den ST5 als *primary founder*. Wahrscheinlich entwickelte sich ausgehend von ST5 auf allen drei Kontinenten weitere verschiedene ST´s durch sowohl Rekombinations- als auch Mutationsereignisse. Analog könnte diese Entwicklung für den vom *subgroup founder* ST2 abstammenden ST1 angenommen werden.
ST6 zusammen mit ST10 stellt eine eigene klonale Gruppe innerhalb von *B. henselae* dar. Wahrscheinlich gab es im Laufe der Evolution nicht so viele Veränderungen, sodass diese klonale Linie bis heute nur aus zwei ST´s besteht. Bestimmte ST´s entwickelten sich dann in den drei klonalen Gruppen nur in bestimmten geographischen Regionen.
Besonders auffallend ist, dass ST7 ausschließlich im europäischen Bereich zu finden ist. Genau betrachtet ist ST7 im Nord- und Westeuropa prävalenter als im Übrigen europäischem Gebiet. Verschiedene genetische Ereignisse könnten diese *B. henselae*-Stämme befähigt haben sich besonders gut in diesem Gebiet anzupassen.

4.1.2 Korrelation zwischen Wirtsspezies und *B. henselae*-Sequenztyp

Die statistische Analyse der vorliegenden Daten zeigte, dass bestimmte ST´s von *B. henselae* mit einer bestimmten Wirtsspezies assoziiert sind und es somit eine Korrelation zwischen einigen pathogenen *B. henselae*-Isolaten und schweren Erkrankungen wie CSD oder

Endokarditis beim Menschen gibt. Die Genotypisierung zeigte, dass humanpathogene *B. henselae*-Isolate signifikant dem ST1, der durch den humanen Referenzstamm Houston-1^T repräsentiert wird, zugehörig sind (Arvand & Viezens, 2007). Über 66 % der mit Menschen assoziierten Isolate konnten als ST1 identifiziert werden. ST1 fasst somit besonders virulente *B. henselae*-Stämme zusammen.

Bereits frühere Studien konnten einen Zusammenhang von CSD-Erkrankungen und dem ST1 aufdecken (Arvand *et al*., 1998; Chang *et al*., 2002; Dillon *et al*., 2002; Iredell *et al*., 2003). Durch die erhaltenen Resultate wird die Hypothese unterstützt, dass verschiedene *B. henselae*-Stämme z.B. Houston-1^T eine höhere Virulenz dem Menschen gegenüber aufweisen könnten als z.B. der Stamm Ber-K56 (Arvand & Viezens, 2007). Diese Daten stehen jedoch im Gegensatz zu den Resultaten der Lindroos-Arbeitsgruppe, die keinen signifikanten Kontext zwischen dem Sequenztyp und der Wirtsspezies von *B. henselae* im Rahmen von phylogenetischen Untersuchungen herstellen konnten (Lindroos *et al*., 2006). Dabei ist zu berücksichtigen, dass in der Studie von Lindroos nur eine kleine Auswahl von 38 verschiedenen *B. henselae* Isolaten untersucht wurde, die nicht in vergleichbarem Maße humane und feline Isolate aus verschiedenen geographischen Bereichen darstellte. Somit können die dort getroffenen Aussagen nicht den Resultaten dieser Arbeit gleichgesetzt werden.

Zwar zeigt die vorliegende Studie kein optimales Verhältnis von gleichviel isolierten humanen und felinen Isolaten auf, doch wurde versucht ein umfassenderes, größeres *panel* an Isolaten in der *B. henselae*-Stammsammlung zu vereinen. Die *B. henselae*-Isolate, die aus infizierten, streunenden sowie Hauskatzen isoliert wurden, waren zu den aus Menschen kultivierten Isolaten in der Überzahl. Jedoch gelang eine größere Auswahl an *B. henselae*-Isolaten aus drei verschiedenen Kontinenten in dieser Studie zu vereinen. Deshalb muss die Überpräsentation von felinen Isolaten in ST7 im Nord-West europäischen Bereich kritisch betrachtet werden. Dies könnte auch daraus resultieren, dass aus diesem geographischem Bereich humane Isolaten prinzipiell seltener Vorkommen. Für eine exakte Analyse in der Zukunft ist es deshalb unerlässlich eine vergleichbar große Sammlung von felinen und human abstammenden *B. henselae*-Isolaten zu analysieren.

Im Hinblick auf die Virulenz für den Menschen könnten die erhaltenen Ergebnisse darauf hinweisen, dass verschiedene Sequenztypen, die ein variierendes Allelprofil aufweisen, Erkrankungen beim Menschen auslösen. Als Hypothese könnte man annehmen, dass virulente Isolate zusätzliche Pathogenitätsfaktoren aufweisen. So könnten humane Isolate des ST1 Genombereiche besitzen, die eine effektive Transmission vom Hauptreservoir der Katze auf

den Menschen ermöglichen. Wahrscheinlich kodieren diese virulenteren Stämme auch Pathogenitätsfaktoren, die ein Überleben im Wirtsorganismus sichern und somit eine Nische im Vergleich zu den felinen Isolaten eröffnen.

Erste Analysen zeigten auf, dass keine einzelnen Gene in Houston-1^T nachgewiesen werden konnten, welche ausschließlich nur in humanen Isolaten vorkommen und damit Rückschlüsse auf die Auslöser einer erhöhten Virulenz von einzelnen Isolaten im Vergleich zu anderen *B. henselae*-Isolaten zulassen (Lindroos *et al*., 2006). Jedoch konnte die Arbeitsgruppe um Lindroos im Genom des Stammes Marseille ein Fehlen von 15-20 kb des zentralen Bereiches der genomischen Insel HGIb im Gegensatz zu dem des Stammes Houston-1^T nachweisen. Diese Region kodiert für *Bartonella*-spezifische Gene und ein Fehlen dieser Genomregion wurde ebenfalls in *B. quintana* und *B. kohlerae* nachgewiesen sowie in einer Gruppe, welche mit ST5 sowohl feline und humane *B. henselae*-Isolate umfasst (Lindroos *et al*., 2006). Zusätzlich war in diesen *Bartonella*-Stämmen die Variabilität in den Clustern der Gene für Autotransporter und Passenger Domänen des Typ IV-Sekretionssystem auffällig. Dies könnte im Kontext zu vaskulärproliferativen Läsionen der Leber und Milz bei drei von vier HIV-Patienten, die mit solchen *B. henselae*-Isolaten infiziert waren, stehen. Diese Läsionen fanden sich bei acht weiteren Patienten, die mit anderen Genotypen von *B. henselae* infiziert waren, nicht (Chang *et al*., 2002).

4.1.3 Phylogenetische Untersuchungen der *B. henselae*-Sequenztypen

Innerhalb der Spezies *B. henselae* ist eine spezifische Aufteilung in bestimmte klonale Gruppen erkennbar, die durch eBURST-Analysen der definierten 14 Sequenztypen ermittelt wurden. Hauptsächlich treten vier dominante Genotypen auf, wobei zwei Typen zu der größten klonalen Gruppe 1 zuzuordnen sind: der ST1 und der *founder*-Typ ST5. Weiterhin ist der ST6 besonders innerhalb der *B. henselae*-Isolate charakteristisch. Dieser Sequenztyp gehört zu der klonalen Gruppe 2 und stellt eine den zweitgrößten Cluster dar. Zu den vier dominanten Haupttypen gehört ebenfalls der ST7, der unabhängig von den klonalen Gruppen nur als einziger Genotyp betrachtet wird und keinem der Gruppen zugeordnet wird. Wahrscheinlich muss man den ST7 eher zu den Gruppen 2 und 3 als zu der Hauptgruppe verwandt sehen. Die Bildung dieser Komplexe kann ein sehr guter Hinweis darauf sein, dass mehrere Rekombinationsereignisse stattfanden, die zu den in dieser Arbeit vorgelegten Clusterbildung führten (Turner *et al*., 2007). Evaluationen der eBURST-Analyse und deren

abgeleiteten phylogenetischen Abstammungsdaten zeigten, dass Rekombinationen innerhalb des Genoms im Verhältnis zu zufälligen Mutationsereignissen innerhalb von Bakterienpopulationen sehr gut dargestellt werden können. Es unterstreicht die Aussagekraft der Resultate, die durch eBURST erhalten wurden (Turner *et al*., 2007). Rekombinationen generieren so ständig neue Subpopulationen, die unterschiedliche Sequenzmuster zeigen und damit zu unterschiedlichen Expressionsmustern von bestimmten Proteinen wie Rezeptoren führen. Diese Veränderung könnte im Hinblick auf eine Kolonisierung eines Wirtes durch einen pathogenen Organismus zu einem besseren Überleben beitragen, da der Immunantwort des entsprechenden Wirtes erfolgreich entgegen gewirkt werden kann. Weiterhin könnte ein Fehlen von Virulenzdeterminanten durch eine nachteilig wirkende Rekombination der Gene zu einem begrenzten Vorkommen oder geringeren Transmission auf einen bestimmten Wirt wie z. B. dem Menschen führen und damit zu einer niedrigeren Virulenz einzelner Sequenztypen.

4.1.4 MLST als Methode der Genotypisierung von *B. henselae*-Isolaten

Zahlreiche epidemiologische Studien wurden zur Typisierung von pathogenen Mikroorganismen und zur Charakterisierung der Virulenz einzelner Stämme innerhalb der Bakterienpopulation durchgeführt (Bergmans *et al*., 1996; Drancourt *et al*., 1996; La Scola *et al*., 2002, Chang *et al*., 2002). Bis zum jetzigen Zeitpunkt hat sich dabei die *band-based* Technik PFGE als besonders effektiv erwiesen, da sie das größte diskriminatorische Potential besitzt (Matar *et al*., 1993; Rodriguez-Barradas *et al*., 1995; Koehler *et al*., 1997; Sander *et al*., 1998; Handley & Regnery, 2000; Maruyama *et al*., 2001; Arvand *et al*., 2001, Dillon *et al*., 2002). Basierend auf der Analyse von spezifischen Gensequenzen wurde die MLST-Methode entwickelt. Ziel war eine im Vergleich zur PFGE beschleunigte Analyse, eine bessere Vergleichbarkeit der Daten zwischen den Forschungsgruppen sowie eine höhere Reproduzierbarkeit der Resultate (Maiden *et al*., 2003). So wurden erfolgreich MLST-Schemata für *Neisseria meningitidis*, *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae* erstellt und veröffentlicht. Für *B. henselae* konnte Iredell *et al*. 2003 zeigen, dass MLST eine sehr gute Typisierungsmethode ist. Gleichzeitig gelang durch den Versuchansatz die Bestätigung der These, dass die Sequenz-basierte Methode MLST im Vergleich zur PFGE-Analyse zu analogen Aussagen führt. Auch diese Arbeit vermittelte durch sequenzbasierte Analysen ein sehr gutes Bild der unterschiedlichen Populationsstruktur von *B. henselae.* So konnte insbesondere die Assoziation von Wirtsspezies und virulenten Isolaten sowie die

spezifische Zusammensetzung der *B. henselae* Stämme in bestimmten geographischen Regionen gezeigt werden (Arvand & Viezens, 2007). Es führte zu einem besseren Verständnis der klonalen Linien innerhalb der Bakterienpopulation und gab Hinweise auf mögliche Faktoren, die in der Zukunft zur weiteren Aufklärung der Virulenz für den Menschen beitragen können. Kritisch gesehen muss jedoch, dass für den potentiellen Nutzer die Sequenzierung von acht bzw. neun verschiedenen *housekeeping* Genen nicht immer eine schnelle und kostengünstige Routine-Methode für die molekulare Typisierung darstellt. Daher werden weiterhin neue und noch schnellere Methoden gesucht. So präsentierte die Arbeitsgruppe Li *et al*. 2006 eine weitere effiziente Sequenz-basierte Typisierungsmethode, die *multispacer typing technique* (MST). Auch hierbei konnten die Forscher das Problem des hohen Untersuchungsaufwandes nicht gänzlich lösen. Eine weitere Alternative zielte auf die Analyse der *variable number tandem repeats* (VNTR) ab. Die Mikro- und Minisatellit-ähnlichen Strukturen sind die Basis für die multilocus-VNTR-Analyse (MLVA). Diese Methode fußt auf einen hohen Grad an Stabilität des spezifischen Markers und einem hohen Diskriminierungspotential wie bereits für verschiedene Prokaryoten (B*acillus anthracis*, *Yersinia pestis*) gefunden wurde (Keim *et al*., 2000; Le Fleche *et al*., 2001). Für *B. henselae* glichen die Ergebnisse der VNTR-Untersuchungen den Daten der Mehrzahl von Typisierungen (Monteil *et al*., 2007). Jedoch ist es für eine endgültige Evaluation der Methoden unumgänglich, einen geeigneten Satz verschiedener Isolate aus allen Welt-Regionen und eine vergleichbare Anzahl humaner und feliner *B. henselae*-Isolate in die Untersuchungen einzubeziehen.

4.2 PFGE-Analyse von *B. henselae*

Es liegen einige epidemiologische Studien vor, die als Typisierungstechnik die PFGE bei *B. henselae*-Isolaten erfolgreich eingesetzt haben. Deshalb hat diese Methode bis heute den Status als *golden standard* unter den *band based*-Typisierungsmethoden. Die Resultate gaben früh den Hinweis auf genetische Varianten innerhalb der Bakterienpopulation bestimmter *B. henselae*-Isolate. So wurden aus einer infizierten Katze in Deutschland zwei sich im Makrorestriktionsmuster unterscheidenden *B. henselae*-Isolate kultiviert (Sander *et al*., 1998). Jedoch wurde die Frage nicht beantwortet, ob es sich dabei um zwei verschiedene die Katze gleichzeitig infizierende Stämme handeln könnte. Bei der Untersuchung erkrankter Katzen konnte Kabeya *et al*. ebenfalls Unterschiede im Makrorestriktionsmuster der einzelnen

B. henselae-Isolate detektieren (Kabeya *et al*., 2002). Maruyama und Kollegen postulierten schließlich nach Analyse der Daten, dass die *B. henselae*-Isolate aus dem klinischen Material eines einzelnen Patienten zwei verschiedene *B. henselae*-Stämme darstellen (Maruyama *et al*., 2004). Trotzdem besteht gleichberechtigt die Möglichkeit, dass genetische Varianten in einer natürlichen *B. henselae*-Population nebeneinander koexistieren können. Diese Hypothese würde in der gleichen Weise die beobachteten, morphologischen Unterschiede und die selten auftretende Variabilität in den PFGE-*fingerprints* erklären. Für eine klare Aussage ist jedoch zuerst eine Evaluation der Diskriminierungsleistung der verwendeten Restriktionsenzyme notwendig. Vorher wurden häufig *Sma*I und *Not*I eingesetzt, ohne dass deren Eignung geprüft wurde. Allerdings ließ das Bandenrestriktionsmuster von *Not*I mit vier bis sechs Banden kein hohes Diskriminierungsvermögen erwarten (Maruyama *et al*., 2001; Maruyama *et al*., 2004; Kabeya *et al*., 2002; Arvand *et al*., 2006).

4.2.1 Evaluation verschiedener Restriktionsenzyme für die Verwandtschaftsanalyse von *B. henselae* mittels PFGE

In der vorliegenden Studie wurden fünf verschiedene Restriktionsendonukleasen untersucht, die für die PFGE-Untersuchungen geeignet schienen. Die Enzyme *Sma*I, *Apa*I, *Eco*52I und *Xma*JI führten zu Resultaten, welche die analysierten *B. henselae*-Isolate in vier bis sechs verschiedene PFGE-Profile einordnete. Im Vergleich mit der zuvor durchgeführten, sequenzbasierten Typisierungsmethode MLST korrelierten diese Profile sehr gut mit den definierten ST´s (Arvand & Viezens, 2007). Das Restriktionsenzym *Not*I dagegen generierte 13 verschiedene PFGE-Typen, die keine Korrelation mit den MLST-Sequenztypen aufwiesen. Eine mögliche Erklärung für die Generierung so vieler Variation könnte in der jeweiligen Erkennungsschnittstelle der Enzyme liegen. Während *Not*I eine Erkennungsschnittstelle von acht Nukleotiden besitzt, weisen die anderen untersuchten Enzyme nur eine 6-Nukleotid große Schnittstelle auf. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens genetischer Ereignisse, welche in der Folge zu Variationen in der Schnittstelle und in Folge dessen zu einem Verlust der Erkennungsstelle des Restriktionsenzymes führen können, ist bei dem Enzym *Not*I höher. Dem steht entgegen, dass die Erkennungssequenz für *Not*I sehr viel seltener im Genom vorkommt. Die unbewertet große Zahl an *Not*I-assoziierten PFGE-Typen in den *B. henselae*-Arbeitsgruppen könnte auch an einer besonderen Empfindlichkeit des Enzyms gegen störende Bedingungen, die wiederum zu unterschiedlichen vollständigen Restrikionsereignissen

führen, liegen. In der Konsequenz ist zufolgern, dass dieses Enzym für die PFGE-Analyse der *B. henselae*-Isolate weniger gut geeignet ist.
Im diesem Zusammenhang ist festzustellen, dass nur eine Anzahl von mindestens zehn gut bewertbaren Restriktionsfragmenten eine glaubwürdige Bewertung von Verwandtschaftsverhältnissen gewährleistet (Tenover *et al*., 1995). Daher scheint es angebracht eine erneute Evaluation der einzig auf *Not*I-basierenden Studien durchzuführen und die getroffenen Aussagen unter den neuen Gesichtspunkten auszuwerten (Maruyama *et al*., 2001; Maruyama *et al*., 2004; Kabeya *et al*., 2002). Als sehr gut geeignet für PFGE-Typisierungsstudien von *B. henselae*-Isolaten können dagegen die folgenden Restriktionsenzyme angesehen werden: *Sma*I, *Apa*I, *Eco*52I und *Xma*JI (Arvand & Viezens, 2007).

4.2.2 Genetische Varianten von *B. henselae*-Primärisolaten

Die PFGE-Analyse von fünf *B. henselae*-Primärisolaten (Berlin-1, Berlin-2, It-149627, Zipper, B-K161) deckte genetische Varianten auf und unterstützte die Hypothese, dass dies ein Phänomen besonders bei Primärisolaten darstellt. Bereits in der Vergangenheit gelang bei mehreren Primärisolaten diese Beobachtung (Arvand *et al*., 2006). Die genetische Variabilität ist jedoch jeweils unterschiedlich stark ausgeprägt. So konnten sowohl nur zwei Varianten eines Isolates (Berlin-2, B-K161) als auch fünf verschiedene genetische *fingerprints* (Zipper) beobachtet werden. Vielfaches Passagieren des Mikroorganismus führte dazu, dass bestimmte Varianten nicht mehr nachzuweisen waren, und dass sich meist ein Haupttyp in den Analysen durchsetzte. Das Phänomen, dass *B. henselae* als ein Mosaik verschiedener genetischen Varianten im jeweiligen Wirt überlebt, konnte in einem Versuchsansatz mit 34 *B. henselae*-Isolate unterschiedlicher Herkunftsregionen ebenfalls nachgewiesen werden (Berghoff *et al*., 2007).
Abweichungen in den Makrorestriktionsmustern der Einzelisolate resultieren aus Veränderungen der Erkennungssequenz eines Enzyms. Der genaue Mechanismus, der zur entsprechenden Variabilität bei den *B. henselae*-Primärisolaten führt, ist noch nicht eindeutig geklärt.
Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass verschiedene genetische Varianten innerhalb der Population von Primärisolaten existieren. Dies könnte ein Mechanismus darstellen, um die spezifische Immunantwort des Wirtes zu überleben.

4.3. Analyse des 16S rDNA Gens von *Bartonella henselae*

Die Einteilung der *B. henselae*-Isolate erfolgte lange Zeit in 16S rRNA-Typ I, welcher durch den Stamm Houston-1^T , und in 16S rRNA-Typ II, welcher durch den Stamm Marseille repräsentiert wird (Arvand *et al*., 2001; Drancourt *et al*., 1996). Anhand der typenspezifischen PCR wurden die zwei 16S rRNA-Varianten definiert (Bergmans *et al*., 1996).

Jedoch konnte in anderen Spezies bereits die Existenz von multiplen rRNA-Genkopien gezeigt werden (Conville & Witesky, 2007; Ninet *et al*., 1996; Reischl *et al*., 1998; Wang *et al*., 1997). In dieser Arbeit wurde nun erstmals auch das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen Genkopien des 16S rRNA-Gens in *Bartonella henselae* nachgewiesen (Viezens & Arvand, 2008). Von 182 untersuchten *B henselae*-Isolaten zeigten nur die Isolate Ber-K186 und Is-479, welche von unterschiedlichen Wirten isoliert wurden, multiple 16S rRNA-Genkopien.

Das Vorhandensein dieser unterschiedlichen Genkopien kann durch horizontalen Gentransfer erfolgt sein. Die Wahrscheinlichkeit einer Mutation an drei unterschiedlichen Nukleotidpositionen, in welcher sich die zwei Allele des 16S rRNA-Genes unterscheiden, ist dagegen eher gering einzuschätzen.

Der Nachweis dieser multiplen Genkopien in *B. henselae* wirft weiterhin die Fragestellung auf, ob die veröffentlichen Fälle von Doppelinfektionen durch die Gattung *B. henselae*, nicht eher *B. henselae*-Isolaten mit zwei verschiedenen 16S RNA-Genkopien zuzuschreiben ist. Diese Klarstellung kann nur durch genotypisierende Methoden z.B. der Gensequenzierung erreicht werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass die verwendeten Methoden MLST und PFGE sehr gut für die Genotypisierung von *B. henselae*-Stämmen geeignet ist. Besonders die Kombination beider molekularbiologischen Methoden ist für epidemiologische Studien von *B. henselae* zu empfehlen.

5. Zusammenfassung

Die Populationsstruktur von *B. henselae* wurde durch verschiedene Typisierungsmethoden untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden das *Multi-locus sequence typing* und die Pulsfeld-Gelelektrophorese zur Analyse der genetischen Variabilität und Populationsstrukur von 182 *B. henselae*-Isolaten eingesetzt. Beide Methoden zeigten dabei ein hohes Diskriminierungspotential und eigneten sich gut für die molekulare Typisierung der verschiedenen *B. henselae*-Stämme.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Restriktionsenzyme *Sma*I, *Apa*I, *Eco*52I und *Xma*JI bei der PFGE-Analyse besonders geeignet sind. Dagegen scheint das Enzym *Not*I aufgrund des generierten Bandenrestriktionsmusters, welches zu 13 verschiedenen PFGE-Typen bei 182 Isolaten führte, weniger für den Einsatz in der *B. henselae*-Typisierung in Frage zukommen.

Durch die Sequenzierung des 16S rDNA-Genes und acht verschiedenen *housekeeping genes* gelang die Identifizierung von 14 verschiedenen Sequenztypen innerhalb der *B. henselae*-Population. Die Sequenztypen ST1, ST5, ST6 und ST7 repräsentieren mit 83,5 % der Isolate die Hauptsequenztypen. Geographisch betrachtet gibt es eine signifikante Verteilung der Sequenztypen ST1, ST6 und ST7. Weiterhin wurde gezeigt, dass ST1 signifikant viele humanpathogene *B. henselae*-Isolate umfasst. Über 66 % der mit Menschen assoziierten Isolate wurden diesem Sequenztyp zugeordnet. Der Sequenztyp ST1 fasst somit besonders virulente Stämme zusammen. Der Vergleich der erhaltenen PFGE-Resultate mit den MLST-Ergebnissen führte zu einer hohen Konkordanz zwischen den PFGE-Typen und den Sequenztypen.

Im Rahmen der Analyse von *B. henselae*-Primärisolaten wurden genetische Variationen für einige Stämme gefunden, die jedoch durch häufiges Passagieren in einen genetischen Haupttyp übergehen. Die Mechanismen für das Auftreten dieser Änderungen bei Primärisolaten, die sich im Bandenrestriktionsmuster widerspiegeln, sind noch nicht bekannt.

Unsere Daten zeigten erstmals, dass wenige *B. henselae*-Isolate zwei verschiedene 16S rRNA-Genkopien besitzen. Für die Interpretation von zukünftigen 16S rRNA-Sequenzierungsergebnisse im Rahmen von *Bartonella*-Spezies-Untersuchungen sollte deshalb die Existenz von unterschiedlichen 16S rRNA-Genkopien berücksichtigt werden.

Abschließend ist festzustellen, dass die Kombination von PFGE und MLST bei weiteren epidemiologischen Studien von *B. henselae* besonders empfehlenswert ist.

6. Summary

The population structure of *Bartonella henselae* was analysed by different typing methods. For the present work the multi-locus sequence typing and the pulsed-field gel electrophoresis were used for analysing the genetic diversity and population structure of 182 *B. henselae* isolates. Both methods had been shown a high discriminatory power and were appropriate for the molecular typing of different *B. henselae* strains.

To sum it up it can be said, that the restriction enzymes *Sma*I, *Apa*I, *Eco*52I und *Xma*JI are particularly appropriate for PFGE analyses. Against that the enzyme NotI seems unhelpful for using in *B. henselae* typing, because of the generating restriction patterns, which conduct to 13 different PFGE types within 182 isolates.

Through sequencing of the 16S rDNA gene and eight different housekeeping genes 14 sequence types within the *B. henselae* population were identified. The sequence types ST1, ST5, ST6 and ST7 represent with 83,5 % the main sequence types. Geographical considerations indicate a significant distribution for the sequence types ST1, ST6 und ST7. Further it was shown, that ST1 significantly comprise plenty of human pathogen *B. henselae* isolates. About 66 % of human associate isolates had been assigned to this sequence type. Thus ST1 summarize particularly virulent strains.

The comparison of received PFGE results with MLST results lead to high concordance between PFGE types and sequence types.

Genetic variants, which represent one genetic main type after a lot of passages, were demonstrated by analysing *B. henselae* primary isolates. The mechanisms of these changes, which had been reflected in PFGE restriction patterns, are still unknown. Our data indicate for the first time, that a few *B. henselae* isolate possess two different 16S rRNA gene copies. In the future the existence of different 16S rRNA gene copies should be considered in analysing 16S rRNA sequencing results.

Concluding it is to notice, that the combination of PFGE and MLST is recommendable for further epidemiological studies of *B. henselae*.

Literaturverzeichnis

Ahsan, N., Holman, M.J., Riley, T.R., Abendroth, C.S., Langhoff, E.G. and Yang, C. 1998. Peliosis hepatis due to *Bartonella henselae* in transplantation: a hemato-hepato-renal syndrome. *Transplantation* **65**:1000-1003.

Alsmark, C.M., Frank, A.C., Karlberg, E.O., Legault, B.-A., Ardell, D.H., Canback, Eriksson, A.-S., Naslund, A.K., Handley, S.A., Huvet, M., La Scola, B., Holmberg, M., Andersson, S.G.E. 2004. The louse-borne human pathogen *Bartonella quintana* is a genomic derivative of the zoonotic agent *Bartonella henselae. Proc. NatI. Acad. Sci. U.S.A.* **101**:9716-9721.

Anderson, B., Goldsmith, C., Johnson, A., Padmalayam, I. and Baumstark, B. 1994. Bacteriophage-like particle of *Rochalimaea henselae. Mol. Microbiol*. **13**:67-73.

Anderson, B., Sims, K., Regnery, R.L., Robinson, L., Schmidt, M.J., Goral, S., Hager, C. and Edwards, K. 1994. Detection of *Rochalimaea henselae* DNA in specimens from cat scratch disease patients by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **32**:942-948.

Anderson, B.E. and Neuman, M.A. 1997. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:203-209.

Arends M.J. and Wyllie A.H. 1991. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev.. Exp. Pathol* **32**:223-254.

Arvand, M., Wendt, C., Regnath, T., Ullrich, R., Hahn, H. 1998. Characterization of *Bartonella henselae* isolated from bacillary angiomatosis lesions in a human immunodeficiency virus-infected patient in Germany. *Cli. Infect. Dis.* **26**:1296-12-99.

Arvand, M., Klose, A.J., Schwartz-Porsche, D., Hahn, H. & Wendt, C. 2001. Genetic variability and prevalence of *Bartonella henselae* in cats in Berlin, Germany, and Analysis of its genetic relatedness to a strain from Berlin that is pathogenic for humans. *J. Clin. Microbiol*. **39**: 743-746.

Arvand, M., Schubert, H., Viezens, J. 2006. Emergence of distinct genetic variants in the population of primary *Bartonella henselae* isolates. *Microbes and Infection* **8**:1315-1320.

Arvand M., Feil E., Giladi M., Boulouis H., Viezens J. 2007. Multi-Locus Sequence Typing of *Bartonella henselae* isolates from Three continents Reveals Hypervirulent and Feline-Associated Clones. *PloS one* **12**:e1346

Arvand M., Viezens J. 2007. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis and multi-locus sequence typing fort he analysis of clonal relatedness among *Bartonella henselae* isolates. *IJMM* **297**:255-262

Arvand M., Viezens J., Berghoff J. 2008. Prolonged *Bartonella henselae* bacteremia caused by reinfection in cats. Emerg. Infect. Dis. **1**:152-154.

Barka N.E., Hadfield T., Patnalk M., Schwartzman W.A., Peter J.B 1993. EIA for detection of *Rochalimaea henselae*-reactive IgG, IgM, and IgA antibodies in patients with suspected cat-scratch disease. *J. Infect. Dis*. **167**:1503-1504.

Batterman, H.J., Peek, J.A., Loutit, J.S., Falkow, S. and Tompkins, L.S. 1995. *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* adherence to and entry into cultured human epithelial cells. *Infect. Immun.* **63**:4553-4556.

Beg A.A., Baltimore D. 1996. An essential role for NF-kappa B in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* **274**:782-784.

Berghoff, J., Viezens, J., Guptill, L., Fabbi, M. and Arvand, M. 2007. *Bartonella henselae* exits as a mosaic of different genetic variants in the infected host. *Microbiology* **153**:2045-2051.

Bergmans A.M , Groothedde J.W., Schellekens J.F., van Embden J.D., Ossewaarde J.M., Schouls L.M. 1995. Etiology of cat scratch disease: comparison of polymerase chain reaction of *Bartonella* (formerly *Rochalimaea*) and *Afipia* DNA with serology and skin tests. *J. Infect. Dis*. **171**:916-23.

Bergmans, A.M., Schellekens, J., van Embden, J. & Schouls, L.M. 1996. Predominance of two *Bartonella henselae* variants among cat-scratch disease patients in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* **34**:254-260.

Bergmans, A.M., de Jong, C.M., van Amerongen, G., Schot, C.S. & Schouls, L.M. 1997. Prevalence of *Bartonella henselae* in domestic cats in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* **35**:2256-2261.

Bermond D., Boulouis H.J., Heller R., Van Laere G., Monteil H., Chomel B.B., Sander A., Dehio C., Piemont Y. 2002. *Bartonella bovis* Bermond et al. sp. nov. and *Bartonella capreoli* sp. nov., isolated from European ruminants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:383-390.

Birtles R.J., Harrison T.G., Saunders N.A., Molynoux D.H. 1995. Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysi* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*. **45**:1-8.

Brenner, D. J., O'Connor, S.P., Winkler, H. H. and Steigerwalt, A.G. 1993. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., *Bartonella vinsonii* comb.nov., *Bartonella henselae* comb. nov., and *Bartonella elizabethae* comb.nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from the order *Rickettsiales. Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**:777-786.

Brenner, S. A., Rooney, J.A., Manzewitsch, P., Regnery, L.R. 1997. Isolation of *Bartonella* (*Rochalimaea*) *henselae*: effects of methods of blood collection and handling. *J Clin. Microbiol*. **35**:544-547.

Carithers H.A. 1985. Cat-Scratch disease. An overview based on a study of 1200 patients. *Am. J. Dis. Child.* **39**:1124-1133.

Carithers H.A. 1985. Diagnosis of cat-scratch disease. *Pediatrics* **76**:325-326.

Chang, C.C., Chomel, B.B., Kasten, R.W., Tappero, J.W., Sanchez, M.A. & Koehler, J.E. 2002. Molecular epidemiology of *Bartonella henselae* infection in human immunodeficiency

virus-infected patients and their contacts, using pulsed-field gel electrophoresis and genotyping. *J. Infect. Dis.* **186**:1733-1739.

Chomel, B.B., Abbott, R.C., Kasten, R.W., Floyd-Hawkins, K.A., Kaas, P.H., Glaser, C.A., Pederson, N.C. and Koehler, J.E. 1995. *Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in Califonia: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2445-2450.

Chomel, B.B., Kasten, R.W., Floyd-Hawkins, K.A., Chi, B., Yamamoto, K., Roberts-Wilson, J., Gurfield, A.N., Abbott, R.C., Pederson, N.C. and Koehler, J.E. 1996. Experimental transmission of *Bartonella henselae* by the cat flea. *J. Clin. Microbiol.* **34**:1952-1956.

Cockerell, C.J., Whitlow, M.A., Webster, G.F. and Friedman-Kien, A.E. 1987. Epitheloid angiomatosis: a distinct vascular disorder in patients with the acquired immunodeficiency syndrome or AIDS-related complex. *Lancet* **2**:654-656.

Cockerell C.J., Bergstresser P.R., Myrie-Williams C., Tierno P.M. 1990. Bacillary epithelioid angiomatosis occurring in an immunocompetent individual. *Arch. Dermatol.* **26**:787-790.

Conley, T., Slater, L., Hamilton, K. 1994. *Rochalimaea* species stimulate human endothelial cell proliferation and migration in vitro. *J Lab Clin. Med* **124**:521-528.

Cooper J.E., Feil E.J. 2004. Multilocus sequence typing—what is resolved? *Trends Microbiol.* **12:** 373-7.

Dalton M.J., Robinson L.E., Cooper J., Regnery R.L., Olsen J.G., Childs J.E. 1995. Use of *Bartonella* antigens for serologic diagnosis of cat-scratch disease at a national referral center. *Arch. Intern. Med.* **155**:1670-1676.

Debre R., 1950. Cat scratch disease. *Mars. Med.* **87**(8):375-380.

Dehio, C., Meyer, M., Berger, J., Schwarz, H., Lanz, C., 1997. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the

subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome. J Cell Sci. **110**:2141-2154.

Dehio, C. 2001. *Bartonella* interactions with endothelial sells and erythrocytes. *Trends Microbiol* **9**:279-285.

Demers D.M., Bass J.W., Vincent J.M., Person D.A., Noyes D.K., Staege C.M., Samlaska C.P., Lockwood N.H., Regnery R.L., Anderson B.E. 1995. Cat-scratch disease in Hawaii: etiology and seroepidemiology. *J. Pediatr.* **127**:23-26.

Demple B., Braz J. 1999. Genetic responses against nitric oxide toxicity. *Med. Biol. Res.* **32**:1417-1427.

Dillon, B., Valenzuela, J., Don, R., Blanckenberg, D., Wigney, D.I., Malik, R., Morris, A.J., Robson, J.M. & Iredell, J. 2002. Limited diversity among human isolates of *Bartonella henselae*. *J. Clin. Microbiol.* **40**:4691-4699.

Drancourt, M., Birtles, R., Chaumentin, G., Vandenesch, F., Etienne, J. & Raoult, D. 1996. New serotype of *Bartonella henselae* in endocarditis and cat-scratch disease. *Lancet* **347**:441-443.

Ehrenborg, C., Wesslen, L., Jakobson, A., Friman, G. & Holmberg, M. 2000. Sequence variation in the *ftsZ* gene of *Bartonella henselae* isolates and clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* **38**:743-746.

Emmons, R.W., Riggs, J.L. and Schlachter, J. 1976. Continuing search for the etiology of cat scratch disease. *J. Clin. Microbiol.* **4**:112-114.

Feil, E. J. & Enright, M. C. 2004. Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol* **7**:308–313.

Fischer S.F., Schwarz C., Vier J., Hacker G., 2001. Characterization of antiapoptotic activities of *Chlamydia pneumoniae* in human cells. *Infect. Immun.* **69**:7121-7129.

Foucault, C., Barrau, K., Brouqui, P. and Raoult, D. 2002. *Bartonella quintana* Bacteremia among Homeless people. *Clin. Infect. Dis.* **35**:684-689.

Fournier, P.E., Lelievre, H., Eykyn, S.J., Mainardi, J.L., Marrie, T.J., Bruneel, F., Roure, C., Nash, J., Clave, D., James, E., Benoit-Lemercier, C., Deforges, L., Tissot-Dupont, H. and Raoult, D. 2001. Epidemiologic and clinical characteristics of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* endocarditis: a study of 48 patients. *Medicine* (Baltimore) **80**:245-251.

Freeland, R.L., Scholl, D.T., Rohde, K.R., Shelton, L.J. and O´Reilly, K.L. 1999. Identification of Bartonella-specific immunodominant antigens recognized by the feline humoral immune systeme. *Clin. Diagn.Lab. Immunol.* **6**:558-566.

George, T.I., Manley, G., Koehler, J.E., Hung, V.S., McDermott, M. and Bollen, A. 1998. Detection of *Bartonella henselae* by polymerase chain reaction in brain tissue of an immunocompromised patient with multiple enhancing lesions. Case report and review of the literature. *J. Neurosurg.* **89**:1145-1154.

Golden, S. E. 1993. Hepatosplenic cat-scratch disease associated with elevated anti-Rochalimaea antibody titers. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **12**:868-871.

Goldenberger D., Schmidtheini T., Altwegg M. 1997. Detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* by a simple and rapid procedure using broad-range PCR amplification and direct single-strand sequencing of part of the 16S rRNA gene. *Clin. Microbiol. Infect.* **3**:240-245.

Gurfield A.N., Boulouis H.J., Chomel B.B., Heller R., Kasten R.W., Yamamoto K., Piemont Y. 1997. Coinfection with *Bartonella clarridgeiae* and *Bartonella henselae* and with different Bartonella henselae strains in domestic cats. *J. Clin. Mibcrobiol.* **35**:2120-2123.

Handley, S.A. & Regnery, R.L. 2000. Differentiation of pathogenic *Bartonella* species by infrequent restriction site PCR. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3010-3015.

Hanger F. and Rose R. 1946 Cat scratch disease. nachzulesen bei Margileth, *Am*. (1993). *Adv. Pediat. Infect. Dis*. **8**: 1-21.

Heller R., Artois M., Xemar V., DeBriel D., Gehin H., Jaulhac B., Monteil H., Piemont Y. 1997. Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in stray cats. *J. Clin. Microbiol*. **35**:1327-1331.

Ichiyma S., Ohta M., Shimokawa K., Kato N., Takeuchi J., 1991. Chromosomal DNA finger printing by pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiological marker for study of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1327-1331.

Ihler, G.M. 1996. *Bartonella bacilliformis*: dangerous pathogen slowly emerging from deep background. FEMS Microbiol. Lett. **144**:1-11.

Iredell, J., Blanckenberg, D., Arvand, M., Grauling, S., Feil, E.J. & Birtles, R.J. 2003. Characterization of the natural population of *Bartonella henselae* by multi-locus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* **41**:5071-5079.

Jackson L.A., Perkins B.A., Wenger J.D. 1993. Cat scratch disease in the United States: an analysis of three international databases. *Am J Public Health* **83**(12):1707-1711.

Kabeya, H., Maruyama, M., Irei, M., Takahashi, R., Yamashita and M., Mikami, T. 2002. Genomic variations among *Bartonella henselae* isolates derived from naturally infected cats. *Vet. Microbiol.* **89**:211-221.

Kaschula R.O.C. 1996. Infectious diseases. C. Berry (ed.), *Paediatric pathology* 729-820.

Keim, P., Price, L.B., Klevytska, A.M., Smith, K.L., Schupp, J.M., Okinaka, R., Jackson, P.J. & Hugh-Jones, M.E. 2000. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **182**:2928-2936.

Kempf, V.A., Schaller, M., Behrendt, S., Volkmann, B., Aepfelbacher, M., Cakman, I. and Autenrieth, I.B. 2000. Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells in rapid bacterial rRNA synthesis and replication. *Cell Microbiol.* **2**:431-441.

Kempf, V.A., Volkmann, B., Schaller, M., Sander, C.A., Alitalo, K., Riess, T. and Autenrieth, I.B. 2001. Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations. *Cell Microbiol.* **3**:623-632.

Kempf, V.A., Hitziger, N., Riess, T. and Autenrieth, I.B. 2002. Do plant and human pathogens have a common pathogenicity strategy? *Trends Microbiol.* **10**:269-275.

Koehler, J. E., Quinn, F.D., Berger, T.G., LeBoit, P.E., Tappero, J.W. 1992. Isolation of *Rochalimaea* species from cutaneous and osseous lesions of bacillary angiomatosis. *N. Engl. J Med* **327**:1625-1631.

Koehler, J.E., Sanchez, M.A., Garrido, C.S., Whitfeld, M.J., Chen, F.M., Berger, T.G., Rodriguez-Barradas, M.C., LeBoit, P.E. & Tappero, J.W. 1997. Molecular epidemiology of *Bartonella* infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis. *N. Engl. J. Med.* **337**:1876-1883.

Koehler, J. E., Glaser, C.A., and Tappero, J.W. 1994. *Rochalimaea henselae* infection. A new zoonosis with the domestic cat as reservoir. *JAMA* **271**:531-535.

Kordick, D. L., Wilson, K.H., Sexton, D.J., Hadfield, T.L., Berkhoff, H.A., and E. B. Breitschwerdt, E.B. 1995. Prolonged *Bartonella* bacteremia in cats associated with cat-scratch disease patients. *J. Clin. Microbiol*. **33**:3245-3251.

Kordick D.L., Swaminathan B., Greene C.E., Wilson K.H., Whitney A.M., O´Connor S., Holis D.G., Matar G.M., Steigerwalt A.G., Malcom G.B., Hayes P.S., Hadfield T.L., Breitschwerdt E.B., Brenner D.J. 1996. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* subsp. nov., isolated from dogs, *Bartonella vinsonii* subsp. *vinsonii*; and emended description of *Bartonella vinsonii. Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**:704-709.

Lai, E.M. and Kado, C.I. 2000. The T-pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. *Trends Microbiol.* **8**:361-369.

Larson A.M., Dougherty M..J, Nowowiejski D.J., Welch D., Matar G.M., Swaminathan B., Coyle M.B. 1994. Detection of *Bartonella* (*Rochalimaea*) *quintana* by routine acridine orange staining of broth blood cultures. *J. Clin. Microbiol*. **32**:1492-1496.

La Scola, B., Liang, Z., Zeaiter, Z., Houpikian, P., Grimont, P.A. & Raoult, D. 2002. Genotypic characteristics of two serotyps of *Bartonella henselae*. *J. Clin. Microbiol.* **40**:2002-2008.

Lawson P.A., Collins M.D. 1996. Description of *Bartonella clarridgeiae* sp. nov. isolated from the cat of a patient with *Bartonella henselae* septicaemia. *Med. Microbiol. Lett.*, **5**:64-73.

LeBoit, P.E., Berger, T.G., Egbert, B.M., Beckstead, J.H., Yen, T.S. and Stoler, M.H. 1989. Bacillary angiomatosis. The histopathology and differential diagnosis of a pseudoneoplastic infection in patients with human immunodeficiency virus disease. *Am. J. Surg. Pathol.* **13**:909-920.

Le Flèche, P., Hauck, Y., Ontiente, L., Prieur, A., Denoeud, F., Ramisse, V., Sylvestre, P., Benson, G., Ramisse, F & Vergnaud, G. 2001. A tandem repeat database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus antracis*. *BMC Microbiol.* **1**:2-15.

Li W., Chomel B.B., Maruyama S., Guptil L., Sander A., Raoult D., Fournier P.E. 2006. Multispacer typing to study the genotypic distribution of *Bartonella henselae* populations. *J. Clin. Microbiol.* **44**:2499-2506.

Lindroos, H., Vinnere, O., Mira, A., Repsilber, D., Näslund, K. and Andersson, S.G.E. 2006. Genome Rearrangements, Deletions, and Amplifications in the Natural Population of *Bartonella henselae*. *J. Bacteriol*. **188**:7426-7439.

Maeno, N., Oda, H., Yoshiie, K., Wahid, M.R., Fujimura, T., Matayoshi, S. 1999. Live *Bartonella henselae* enhances endothelial cell proliferation without direct contact. *Microb. Pathog*. **27**:419-427.

Maeno N., Yosgile K., Matayoshi S., Fujimura T., Mao S., Wahid M.R., Oda H. 2002. A heat-stable component of *Bartonella henselae* upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression on vascular endothelial cells. *Scand. J. Immunol.* **55**:366-372.

Maiden M.C., Bygraves J.A., Feil E., Morelli G., Russell J.E., Urwin R., Zhang Q., Zhou J., Zurth K., Caugant D.A., Feavers I.M., Achtman M., Spratt B.G. 1998. Multilocus sequence typing: aportable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**:3140-5.

Manders S.M. 1996. Bacillary angiomatosis. *Clin. Dermatol.* **14**:295-299.

Margileth, A. M. 1993. Cat scratch disease. *Adv. Pediatr. Infect Dis*. **8**:1-21.

Maruyama S., Nakamura Y., Kabeya H., Tanaka S., Sakai T., Katsube Y. 2000. Prevalence of *Bartonella henselae, Bartonella clarridgeiae* and the 16S rRNA gene types of *Bartonella henselae* among pet cats in Japan. *J. Vet. Med. Sci*. **62**:273-279.

Maruyama, S., Kasten, R.W., Boulouis, H.J., Gurfield, N.A., Katsube, Y. & Chomel, B.B. 2001. Genomic diversity of *Bartonella henselae* isolates from domestic cats from Japan, the USA and France by pulse-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* **79**:337-349.

Matar, G.M., Swaminathan, B., Hunter, S.B., Slater, L.N. & Welch, D.F. 1993. Polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism analysis of a fragment of the ribosomal operon from *Rochalimaea* species for subtyping. *J. Clin. Microbol.* **31**:1730-1734.

Matar, G.M., Koehler, J.E., Malcolm, G., Lambert-Flair, M.A., Tappero, J., Hunter, S.B. and Swaminathan, B. 1999. Identification of *Bartonella* species directly in clinical specimens by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of a 16S rRNA gene fragment. *J. Clin. Microbiol.* **37**:4045-4047.

Monteil R.A., Michiels J.F., Hofman P., Saint-Paul M.C., Hitzig C., Perrin C., Santini J. 1994. Historical and ultrastructural study of oral bacillary angiomatosis in HIV disease and review of the literature. *Eur. J. Cancer B. Oral Oncol*. **30**B:65-71.

Monteil M., Durand B., Bouchouicha R., Petit E., Chomel B., Arvand M., Boulouis H.J., Haddad N. 2007. Development of discriminatory multiple-locus variable number tandem repeat analysis for *Bartonella henselae. Microbiology* **153**:1141-8.

Mouritsen C.L., Litwin C.M., Maiese R.L., Segal S.M., Segal S.H. 1997. Rapid polymerase chain reaction-based detection of the causative agent of cat scratch disease (*Bartonella henselae*) in formalin-fixed, paraffin-embedded samples. *Hum. Pathol.* **28**:820-826.

Munana, K.R., Vitek, S.M., Hegarty, B.C., Kordick, D.L. and Breitschwerdt, E.B. 2001. Infection of fetal feline brain cells in culture with *Bartonella henselae. Infect. Immun.* **69**:564-569.

Murase T., Okitsu T., Suzuki R., Morozumi H., Matsushima A., Nakamura A., Yamai S. 1995. Evaluation of DNA fingerprinting by PFGE as an epidemiological tool for *Salmonella* infections. *Microbiol. Immunol.* **3**:673-676.

Musso, T., Badolato, R., Ravarino, D., Stornello, S., Panzanelli, P., Merlino, C., Savoia, D., Cavallo, R., Ponzi, A.N. and Zucca, M. 2001. Interaction of *Bartonella henselae* with murine macrophage cell line J774: infection and proinflammatory response. *Infect. Immun.* **69**:5974-5980.

Nadal D., Zbinden R. 1995. Serology to *Bartonella* (*Rochalimaea*) *henselae* may replace traditional diagnostic criteria for cat-scratch disease. *Eur. J. Pediatr.* **154**:906-908.

O'Connor, S. P., Dorsch, M., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J., Stackebrandt, E. 1991. 16S rRNA sequences of *Bartonella bacilliformis* and cat scratch disease bacillus reveal phylogenetic relationships withthe alpha-2 subgroup of the class Proteobacteria. *J. Clin. Microbiol.* **29**:2144-2150.

Olive D.M., Bean P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol*. **37**:1661-9.

Pappalardo B.L., Correa M.T., York C.C., Peat C.Y., Breitschwerdt E.B. 1997. Epidemiologic evaluation of the risk factors associated with exposure and seroreactivity to *Bartonella vinsonii* in dogs. *Am. J. Vet. Res.* **58**:467-471.

Plettenberg, A., Lorenzen, T., Burtsche, B.T., Rasokat, H., Kaliebe, T., Albrecht, H., Mertenskotter, T., Bogner, J.R., Stoehr, A. and Schofer, H. 2000. Bacillary angiomatosis in HIV-infected patients—an epidemiology and clinical study. *Dermatology* **201**:326-331.

Raoult D., Tissot Dupont H., Enea-Mutillod M. 1994. Positive predictive value of *Rochalimaea henselae* antibodies in the diagnosis of cat-scratch disease. *Clin. Infect. Dis.* **19**:355.

Regnery, R. L., Anderson, B.E., Clarridge, J.E., Rodriguez, B.M., Jones, D.C., Carr, J.H. 1992. Characterization of a novel *Rochalimaea* species, *R. henselae* sp. nov., isolated from blood of a febrile, human immunodeficiency virus-positive patient. *J Clin. Microbiol*. **30**:265-274.

Regnery, R. L., Olson, J.G., Perkins, B.A., Bibb, W. 1992. Serological response to "*Rochalimaea henselae*" antigen in suspected cat-scratch disease. *Lancet* **339**:1443-1445.

Relman, D. A., Loutit, J.S., Schmidt, T.M., Falkow, S., Tompkins, L.S. 1990. The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. *N. Engl. J Med* **323**:1573-1580.

Regnery R., Tappero J. 1995. Unraveling mysteries associated with cat-scratch disease, bacillary angiomatosis, and related syndromes. *Emerg. Infect. Dis*. **1**:16-21.

Resto-Ruiz, S.I., Schmiederer, M., Sweger, D., Newton, C., Klein, T.W., Friedman, H. and Anderson, B.E. 2002. Induction of a potential paracrine angiiogenic loop between human THP-1 macrophages and human microvascular endothelial cells during *Bartonella henselae* infection. *Infect. Immun.* **70**:4564-4570.

Rodriguez-Barradas, M.C., Hamill, R.J., Houston, E.D., Georghiou, P.R., Clarridge, J.E., Regnery, R.L. & Koehler, J.E. 1995. Genomic fingerprinting of *Bartonella* species by repetitive element PCR for distinguishing species and isolates. *J. Clin. Microbiol.* **33**:1089-1093.

Rolain, J. M., La, S.B., Liang, Z., Davoust, B., Raoult, D. 2001. Immunofluorescent detection of intraerythrocytic *Bartonella henselae* in naturally infected cats. *J. Clin. Microbiol*. **39**:2978-2980.

Roux V., Raoult D. 1995. Inter- and Intraspecies idenfication of *Bartonella* (*Rochalimaea*) species. *J. Clin. Microbiol*. **33**:1537-1579.

Roux, V., Eykyn, S.J., Wyllie, S. and Raoult, D. 2000. *Bartonella vinsonii* subsp.*berkhoffii* as an agent of afebrile blood culture-negative endocarditis in a human. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1698-1700.

Rudel T., Bokoch G.M., 1997. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* **276**:1571-1574.

Salma S.M., Garcia M.N., Taylor D.E. 1992. Differentiation of the species of *Campylobacter fetus* and chromosomal sizing. *Int. J. Syst. Bacteriol*. **42**:446-450.

Sander, A., Buhler C., Pelz K., von Cramm E., W. Bredt W. 1997. Detection and identification of two *Bartonella henselae* variants in domestic cats in Germany. *J. Clin. Microbiol.* **35**:584-587.

Sander, A., Ruess, M., Bereswill, M.S., Schuppler, M. & Steinbrueckner, B. 1998. Comparison of different DNA fingerprinting techniques for molecular typing of *Bartonella henselae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **36**:2973-2981.

Sander A., Posseit M., Böhm N., Ruess M., Altwegg M. 1999. Detection of *Bartonella henselae* DNA by two different PCR assays and determination of the genotypes of strains involved in histolocigally defined cat scratch disease. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 993-997.

Sanogo Y.O., Zeaiter Z., Caruso G., Merola F., Shpynov S., Bouqui P., Raoult D. 2003. *Bartonella henselae* in *Ixodes recinus* ticks (*Acari: Ixodida*) removed from humans, Belluno province, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* **9**:329-332.

Schmidt H.U., Kaliebe T., Popplinger J., Bühler C., Sander A. 1996. Isolation of *Bartonella quintana* from an HIV-positive patient with bacillary angiomatosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**:736-741.

Schülein R., Seubert A., Gille C., Lanz C., Hansmann Y., Piemont Y., Dehio C. 2001. Invasion and persistent intracellular colonization of erythrocytes. A unique parasitic strategy of the emerging pathogen *Bartonella*. *J. Exp. Med.* **193**:1077-1086.

Schwartz D.C., Cantor C.R. 1984. Separation of Yeast Chromosome-Sized DNAs by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis. *Cell*. **37**:67-75.

Schwartzman, W.A. 1992. Infections due to *Rochalimaea*: the expanding clinical spectrum. *Clin. Infect. Dis.* **15**:893-900.

Schwartzman, W.A., Nesbit, C.A. and Baron, E.J. 1993. Development and evaluation of a blood-free medium for determining growth curves and optimizing growth of *Rochalimaea henselae. J. Clin. Microbiol.* **31**:1882-1885.

Slater, L. N., Welch, D.F., Hensel, D., Coody, D.W. 1990. A newly recognized fastidious gram-negative pathogen as a cause of fever and bacteremia. *N. Engl. J. Med.* **323**:1587-1593.

Spach, D.H., Kanter, A.S., Dougherty, M.J., Larson, A.M., Coyle, M.B., Brenner, D.J., Swaminathan, B., Matar, M., Welch, D.F., Root, R.K. and *et al.* 1995. *Bartonella* (*Rochalimaea*) *quintana* bacteremia in inner-city patients with chronic alcoholism. *N. Engl. J. Med.* **332**:424-428.

Stoler, M.H., Bonfiglio, T.A., Steigbigel, R.T. and Pereira, M. 1983. An atypical subcutaneous infection associated with aquired immune deficiency syndrome. *Am. J. Clin. Pathol.* **80**:714-718.

Szelc-Kelly C.M., Goral S., Perez-Perez G.I., Perkins B.A., Edwards K.M. 1995. Serologic responses to *Bartonella* und *Afipia* antigens in patient with cat-scratch disease. *Pediatrics* **96**:1137-1142.

Tappero, J. W., Koehler J.E., Berger T.G., Cockerell C.J., Lee T.H., Busch M.P., Stites D.P., Mohle-Boetani J., Reingold A.L., LeBoit P.E. 1993. Bacillary angiomatosis and bacillary splenitis in immunocompetent adults. *Ann. Intern. Med.* **118**:363-365.

Tappero, J. W., Mohle-Boetani J., Koehler J.E., Swaminathan B., Berger T.G., LeBoit P.E., Smith L.L., Wenger J.D., Pinner R.W., Kemper C.A. 1993. The epidemiology of bacillary angiomatosis andbacillary peliosis. *JAMA* **269**:770-775.

Taylor D.E., Eaton M., Yan W., Chang N. 1992. Chromosome maps of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli. J. Bacteriol*. **174**:2232-2237.

Tenover., F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulse-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2233-2239.

Tompkins L.S. 1994. *Rochalimaea* infections. Are they zoonoses? *JAMA* **271**:553-554.

Tompkins, L.S. 1997. Of cats, humans, and *Bartonella. N. Engl. J. Med.* **337**:1916-1917.

Unemori, E., Sasaki, Y., Amano, K. and Amano, Y. 1992. A phage in *Bartonella bacilliformis. Microbiol. Immunol.* **36**:731-736.

Viezens J. and Arvand M. 2008. Simultaneous presence of two different copies of the 16S rRNA gene in *Bartonella henselae*. *Microbiology* **154**:2881-2886.

Warren, K., Goldstein, E., Hung, V.S., Koehler, J.E. and Richardson, W. 1998. Use of retinal biopsy to diagnose *Bartonella* (formerly *Rochalimaea*) *henselae* retinitis in an HIV-infected patient. *Arch. Ophtalmol.* **116**:937-940.

Webster, G.F., Cockerell, C.J. and Friedman-Kien, A.E. 1992. The clinical spectrum of bacillary angiomatosis. *Br. J. Dermatol.* **126**:535-541.

Wong, M.T., Dolan, M.J., Lattuada, Jr., C.P., Regnery, R.L., Garcia, M.L., Mokulis, E.C., LaBarre, R.A., Ascher, D.P., Delmar, J.A., Kelly, J.W. and *et al*. 1995. Neuroretinitis, aseptiy

meningitis, and lymphadenitis associated with *Bartonella* (*Rochalimaea*) *henselae* infection in immunocompetent patients and patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *Clin. Infect. Dis.* **21**:352-360.

Wong, M.T., Thornton, D.C., Kennedy, R.C. and Dolan, M.J. 1995. A chemically defined liquid medium that supports primary isolation of *Rochalimaea* (*Bartonella*) *henselae* from blood and tissue specimens. *J. Clin. Microbiol.* **33**:742-744.

Yamamoto K., Chomel B.B., Lowenstine L.J., Kikuchi Y., Phillips L.G., Barr B.C., Swift P.K., Jones K.R., Riley S.P., Kasten R.W., Foley J.E., Pedersen N.C. 1998. *Bartonella henselae* antibody prevalence in free-ranging and captive wild felids from Califonia
J. Wild Dis. **34**:56-63.

Yamamoto K., Chomel B.B., Kasten R.W., Hew C.M., Weber D.K., Lee W.I., Koehler J.E., Pedersen N.C. 2003. Infection and re-infection of domestic cats with various *Bartonella* species or types: *B. henselae* type I is protective against heterologous challenge with *B. henselae* type II. *Vet. Microbiol*. **92**:73-86.

Zeaiter, Z., Fournier, P.E. & Raoult, D. 2002. Genome variations of *Bartonella henselae* strains detectet in lymph nodes of patients with cat scratch disease. *J. Clin. Microbiol.* **40**:1023-1030.

Zwangwill K.M., Hamilton D.H., Perkins B.A., Regnery R.L., Plikaytis B.D., Hadler J.L., Cartter M.L., Wenger J.D. 1993. Cat scratch disease in Conneticut. Epidemiology, risk factors and evaluation of a new diagnosic test. *N. Engl. J. Med.* **329**: 8-13.

.

Anhang

Tab. 2: Übersicht der analysierten *B. henselae*-Isolate dieser Studie

Stammnr.	Isolat	Herkunft	Geograph. Region	Referenz
1	Berlin-1	human	Deutschland	Arvand, M., 1997
2	Berlin-2	felin	Deutschland	Arvand, M., 1997
3	Ber-K56	felin	Deutschland	Arvand, M., 1996
4	Ber-K108	Felin	Deutschland	Arvand, M., 1999
5	Ber-K111	Felin	Deutschland	Arvand, M., 1999
6	Ber-K116	Felin	Deutschland	Arvand, M., 1999
7	Ber-K118	Felin	Deutschland	Arvand, M., 1999
8	Ber-K123	Felin	Deutschland	Arvand, M., 1999
9	Ber-K132	Felin	Deutschland	Arvand, M., 1999
10	Ber-K135	Felin	Deutschland	Arvand, M., 1999
11	Ber-K143	Felin	Deutschland	Arvand, M., 1999
12	Ber-K153	Felin	Deutschland	Arvand, M., 1999
13	Ber-K156	Felin	Deutschland	Arvand, M., 1999
14	Ber-K158	Felin	Deutschland	Arvand, M., 1999
15	Ber-K161	Felin	Deutschland	Arvand, M., 1999
16	Ber-K169	Felin	Deutschland	Arvand, M., 1999
17	Ber-K172	Felin	Deutschland	Arvand, M., 1999
18	Ber-K181	Felin	Deutschland	Arvand, M., 1999
19	Ber-K182	Felin	Deutschland	Arvand, M., 1999
20	Ber-K186	Felin	Deutschland	Arvand, M., 1999
21	B-K193	Felin	Deutschland	Arvand, M., 1999
23	Jen-99A-1542	Felin	Deutschland	Schimmel
24	Jen-99A-1543	Felin	Deutschland	Schimmel

25	Jen-99A-1544	Felin	Deutschland	Schimmel
26	Jen-99A-1545	Felin	Deutschland	Schimmel
27	Jen-99A-1546	Felin	Deutschland	Schimmel
28	Jen-99A-1547	Felin	Deutschland	Schimmel
29	Jen-99A-1548	Felin	Deutschland	Schimmel
30	Jen-99A-1549	Felin	Deutschland	Schimmel
31	Jen-99A-1550	Felin	Deutschland	Schimmel
32	Jen-99A-1714	Felin	Deutschland	Schimmel
33	Jen-99A-1715	Felin	Deutschland	Schimmel
34	Jen-00A-0599	Felin	Deutschland	Schimmel
35	Jen-00A-0600	Felin	Deutschland	Schimmel
36	Jen-00A-0601	Felin	Deutschland	Schimmel
37	FR96/BK3	Felin	Deutschland	Sander, A., 1998
38	FR96/BK8	Felin	Deutschland	Sander, A., 1998
39	FR96/BK26II	Felin	Deutschland	Sander, A., 1998
40	FR96/BK36	Felin	Deutschland	Sander, A., 1998
41	FR96/BK36II	Felin	Deutschland	Sander, A., 1998
42	FR96/BK38	Felin	Deutschland	Sander, A., 1998
43	FR96/BK74	Felin	Deutschland	Sander, A., 1998
44	FR96/BK75	Felin	Deutschland	Sander, A., 1998
45	FR96/BK75II	Felin	Deutschland	Sander, A., 1998
46	FR96/BK77	Felin	Deutschland	Sander, A., 1998
47	FR96/BK78	Felin	Deutschland	Sander, A., 1998
48	FR96/BK79	Felin	Deutschland	Sander, A., 1998
49	FR96/K6	Felin	Deutschland	Sander, A., 1998
50	FR96/K7	Felin	Deutschland	Sander, A., 1998
51	Schwed-CAT-79	Felin	Schweden	Hjielm, E.
52	Schwed-CAT-68	Felin	Schweden	Hjielm; E.

53	Liv-M461	Felin	Dänemark	Birtles, R.
54	Liv-M490	Felin	Dänemark	Birtles, R.
55	Liv-M541	Felin	Dänemark	Birtles, R.
56	Liv-G160	Felin	Groß Britannien	Birtles, R.
57	Liv-G169	Felin	Groß Britannien	Birtles, R.
58	Liv-G170	Felin	Groß Britannien	Birtles, R.
59	Liv-G337	Felin	Groß Britannien	Birtles, R.
61	Liv-G338	Felin	Groß Britannien	Birtles, R.
61	Liv-G345	Felin	Groß Britannien	Birtles, R.
62	Liv-G375	Felin	Groß Britannien	Birtles, R.
63	Liv-G449	Felin	Groß Britannien	Birtles, R.
64	Liv-G450	Felin	Groß Britannien	Birtles, R.
65	Liv-G453	Felin	Groß Britannien	Birtles, R.
66	Liv-G472	felin	Groß Britannien	Birtles, R.
67	Liv-G480	felin	Groß Britannien	Birtles, R.
68	Liv-G590	felin	Groß Britannien	Birtles, R.
69	Liv-G612	felin	Groß Britannien	Birtles, R.
70	Liv-G652	felin	Groß Britannien	Birtles, R.
71	Liv-G635	felin	Groß Britannien	Birtles, R.
72	Liv-G641	felin	Groß Britannien	Birtles, R.
73	Liv-G649	felin	Groß Britannien	Birtles, R.
74	Liv-G777	felin	Groß Britannien	Birtles, R.
75	Liv-G781	felin	Groß Britannien	Birtles, R.
76	Fizz	felin	Schweiz	Drancourt, M., 1996
77	Marseille (Urlly8)	human	Frankreich	Drancourt, M., 1996
79	Par-A253	felin	Frankreich	Boulouis, H-J.
80	Par-A963	felin	Frankreich	Boulouis, H-J.

81	Par-A964	felin	Frankreich	Boulouis, H-J.
82	Par-I107	felin	Frankreich	Boulouis, H-J.
83	Par-I112	felin	Frankreich	Boulouis, H-J.
84	Par-I116	felin	Frankreich	Boulouis, H-J.
85	Par-I125	felin	Frankreich	Boulouis, H-J.
86	Par-I128	felin	Frankreich	Boulouis, H-J.
87	Par-I129	felin	Frankreich	Boulouis, H-J.
88	Par-I134	felin	Frankreich	Boulouis, H-J.
89	Par-I138	felin	Frankreich	Boulouis, H-J.
90	Par-I144	felin	Frankreich	Boulouis, H-J.
91	Par-I145	felin	Frankreich	Boulouis, H-J.
92	Str. chat 38	felin	Frankreich	Piemont, Y.
93	Str. chat 166	felin	Frankreich	Piemont, Y.
94	Str. chat 179	felin	Frankreich	Piemont, Y.
96	Hol-A 18	felin	Niederlande	Bergmans, A.
97	Hol-A 29	felin	Niederlande	Bergmans, A.
98	Hol-A 30	felin	Niederlande	Bergmans, A.
101	Hol-A 43	felin	Niederlande	Bergmans, A.
102	Hol-A 100	felin	Niederlande	Bergmans, A.
103	Is-TA2	human	Israel	Giladi, M.
104	Is-TA4	human	Israel	Giladi, M.
105	Is-TA5	human	Israel	Giladi, M.
106	Is-475	felin	Israel	Giladi, M.
107	Is-478	felin	Israel	Giladi, M.
108	Is-479	felin	Israel	Giladi, M.
110	Is-547	felin	Israel	Giladi, M.
111	Is-598	felin	Israel	Giladi, M.

112	Is-644	felin	Israel	Giladi, M.
113	Is-646	felin	Israel	Giladi, M.
114	Is-866	felin	Israel	Giladi, M.
115	Is-959	felin	Israel	Giladi, M.
116	ATCC 49793	human	USA	ATCC
117	ATCC 49882	human	USA	ATCC
118	CAL-1	human	USA	Fournier
119	San Antonio-2	human	USA	Anderson, B.
121	CAL-4	human	USA	Anderson, B.
122	Oklahoma G1060	human	USA	Anderson, B.
123	K030	human	USA	Guptill, L.
124	Syd-BH2-JI	human	Australien	Iredell, J.
125	Syd-HC61-JI	felin	Australien	Iredell, J.
126	Syd-RMC10	felin	Australien	Iredell, J.
127	Syd-R987	human	Australien	Iredell, J.
128	Syd-NU4713	felin	Neuseeland	Iredell, J.
129	Syd-RMC11	felin	Australien	Iredell, J
130	Syd-HC35	felin	Australien	Iredell, J
131	Syd-NU4714	felin	Neuseeland	Iredell, J
132	Syd-JR8	human	Australien	Iredell, J
133	Syd-JR9	human	Australien	Iredell, J
134	Syd-NU4695	felin	Australien	Iredell, J
135	Syd-HC54	felin	Australien	Iredell, J
136	Syd-HC62	felin	Australien	Iredell, J
137	Syd-RMC3	felin	Australien	Iredell, J
138	Syd-RMC8	felin	Australien	Iredell, J
139	Syd-NU4423	felin	Neuseeland	Iredell, J
140	Syd-HC48	felin	Australien	Iredell, J

141	Syd-JR1	human	Australien	Iredell, J
142	Syd-JR3	human	Australien	Iredell, J
143	Syd-JR5	human	Australien	Iredell, J
144	Syd-JR7	human	Australien	Iredell, J
145	Syd-BH4	human	Australien	Iredell, J
146	Syd-RMC12	felin	Australien	Iredell, J
147	Syd-RMC7	felin	Australien	Iredell, J
148	Syd-BH5	human	Australien	Iredell, J
149	Syd-JR6	human	Australien	Iredell, J
150	Syd-R1073	human	Australien	Iredell, J
151	Syd-RMC2	human	Australien	Iredell, J
152	Syd-RMC1	felin	Australien	Iredell, J
153	Syd-JR2	human	Australien	Iredell, J
154	Pra-C4	felin	Tschechien	Melter, O.
155	Pra-C27	felin	Tschechien	Melter, O.
156	It-8691/1	felin	Italien	Fabbi, M.
157	It-13599/1	felin	Italien	Fabbi, M.
158	It-123930/2	felin	Italien	Fabbi, M.
159	It-118549/4	felin	Italien	Fabbi, M.
160	Budda	felin	USA	Guptill, L.
161	Levi	felin	USA	Guptill, L.
162	Norman	felin	USA	Guptill, L.
163	Saki	felin	USA	Guptill, L.
164	Sunday	felin	USA	Guptill, L.
165	Tori	felin	USA	Guptill, L.
166	Sabrina	felin	USA	Guptill, L.
167	Cody	felin	USA	Guptill, L.

168	Kodie	felin	USA	Guptill, L.
169	Tasha	felin	USA	Guptill, L.
170	Aaron	felin	USA	Guptill, L.
171	Gigi	felin	USA	Guptill, L.
172	Mew Mew	felin	USA	Guptill, L.
173	Rocket	felin	USA	Guptill, L.
174	Bisquick	felin	USA	Guptill, L.
175	Toby	felin	USA	Guptill, L.
176	Zipper	felin	USA	Guptill, L.
177	Buster Brown	felin	USA	Guptill, L.
178	Sam	felin	USA	Guptill, L.
179	Molly	felin	USA	Guptill, L.
180	Red Dog	felin	USA	Guptill, L.
181	Timothy	felin	USA	Guptill, L.
182	Sweetie	felin	USA	Guptill, L.
183	Tabatha	felin	USA	Guptill, L.
184	FR98/K8	felin	Deutschland	Kunz, S.
185	It-3720	felin	Italien	Fabbi, M.
186	It-1114/1	felin	Italien	Fabbi, M.
187	It-4549/2	felin	Italien	Fabbi, M.
188	It-10757/2	felin	Italien	Fabbi, M.
189	It-1369	felin	Italien	Fabbi, M.
190	It-9755	felin	Italien	Fabbi, M.
191	It-149627	felin	Italien	Fabbi, M.

Tab. 10: MLST-Schema der *B. henselae*-Isolate

Isolat	16S rRNA	*batR*	*gltA*	*ftsZ*	*gro*EL	*nlpD*	*rib*C	*rpoB*	ST
Berlin-1	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Berlin-2	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Ber-K56	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Ber-K108	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
Ber-K111	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Ber-K116	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
Ber-K118	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Ber-K123	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
Ber-K132	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Ber-K135	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Ber-K143	2	1	1	1	1	1	1	1	**9**
Ber-K153	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
Ber-K156	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Ber-K158	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
Ber-K161	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Ber-K169	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Ber-K172	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
Ber-K181	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Ber-K182	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Ber-K186	1 und 2	3	2	2	2	1	1	2	**k.A.**
Ber-K193	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Jen-99A-1542	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Jen-99A-1543	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Jen-99A-1544	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Jen-99A-1545	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
Jen-99A-1546	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Jen-99A-1547	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Jen-99A-1548	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Jen-99A-1549	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
Jen-99A-1550	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
Jen-99A-1714	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Jen-99A-1715	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Jen-00A-0599	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Jen-99A-0600	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Jen-00A-0601	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
FR96/BK3	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
FR96/BK8	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
FR96/BK26II	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
FR96/BK36	1	2	1	2	2	1	1	1	**14**
FR96/BK36II	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
FR96/BK38	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
FR96/BK74	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
FR96/BK75	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**

FR96/BK75II	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
FR96/BK77	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
FR96/BK78	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
FR96/BK79	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
FR96/K6	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
FR97/K7	1	2	1	1	1	1	1	1	**8**
Schwed-CAT-	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Schwed-CAT-	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Liv-M461	2	2	1	1	2	1	1	1	**4**
Liv-M490	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Liv-M541	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Liv-G160	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Liv-G 169	2	2	1	1	2	1	1	1	**4**
Liv-G170	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
Liv-G337	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
Liv-G338	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
Liv-G345	2	2	1	1	2	1	1	1	**4**
Liv-G375	2	2	1	1	2	1	1	1	**4**
Liv-G449	2	3	2	1	2	1	1	2	**10**
Liv-G450	2	3	2	1	2	1	1	2	**10**
Liv-G453	2	2	1	1	2	1	1	1	**4**
Liv-G472	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
Liv-G480	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
Liv-G590	1	2	1	1	1	1	1	1	**8**
Liv-G612	2	2	1	1	2	1	1	1	**4**
Liv-G652	2	2	1	1	2	1	1	1	**4**
Liv-G635	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
Liv-G641	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Liv-G649	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Liv-G777	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Liv-G781	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
FIZZ	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
NOVAC	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
Par-A253	1	2	1	1	1	1	1	1	**8**
Par-A963	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Par-A964	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Par-I107	1	2	1	1	1	1	1	1	**8**
Par-I112	2	3	2	2	1	1	1	1	**11**
Par-I116	1	2	1	1	1	1	1	1	**8**
Par-I125	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
Par-I128	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Par-I129	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
Par-I134	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
Par-I138	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
Par-I144	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
Par-I145	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
Str. Chat 38	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**

Str. Chat 166	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
Str. Chat 179	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
Hol-A 18	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Hol-A 29	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
Hol-A 30	1	2	1	1	1	1	1	1	**8**
Hol-A 43	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
Hol-A 100	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
Is-TA2	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Is-TA4	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
Is-TA5	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
Is-475	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Is-478	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Is-479-1	1 und 2	1	1	1	2	1	1	1	**k.A.**
Is-547	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Is-598	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
Is-644	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Is-646	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Is-866	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Is-959	2	1	1	1	2	1	1	3	**12**
ATCC 49793	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
ATCC 49882	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
CAL-1	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
SA-2	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
CAL-4	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Oklahoma	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
K030	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
Syd-BH2-JI	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Syd-HC61-JI	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
Syd-RMC10	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Syd-R987	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
Syd-NU4713	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
Syd-RMC11	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
Syd-HC35	2	2	1	1	2	1	1	1	**4**
Syd-NU4714	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
Syd-JR8	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Syd-JR9	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Syd-NU4695	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Syd-HC54	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Syd-HC62	1	2	1	1	2	1	1	1	**3**
Syd-RMC3	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Syd-RMC8	2	2	1	1	2	1	1	1	**4**
Syd-NU4423	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
Syd-HC48	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
Syd-JR1	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Syd-JR3	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Syd-JR5	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Syd-JR7	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**

Syd-BH4	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
Syd-RMC12	2	2	1	1	2	1	1	1	**4**
Syd-RMC7	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
Syd-BH5	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Syd-JR6	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Syd-R1073	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
Syd-RMC2	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
Syd-RMC1	2	2	1	1	2	1	1	1	**4**
Syd-JR2	1	1	1	1	2	1	1	1	**2**
Pra-C4	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
Pra-C27	2	3	1	2	1	1	1	1	**13**
It-8697/1	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
It-13599/1	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
It-123930/2	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
It-118549/4	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Budda	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
Levi	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Norman	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
Saki	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
Sunday	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Tori	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Sabrina	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Cody	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Kodie	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
Tasha	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
Aaron	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Gigi	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Mew Mew	2	1	1	1	1	1	1	1	**9**
Rocket	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Bisquick	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Toby	2	1	1	1	1	1	1	1	**9**
Zipper	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Buster Brown	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
Sam	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Molly	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
Red Dog	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
Timothy	2	1	1	1	1	1	1	1	**9**
Sweetie	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
Tabatha	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
FR98-K8	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
It-3720	1	2	1	1	1	1	1	1	**8**
It-1114/1	1	1	1	1	1	1	1	1	**1**
It-4549/2	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
It-10757/2	2	4	2	3	1	2	2	1	**7**
It-9755	2	3	2	2	2	1	1	2	**6**
It-149627	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**
It-1369	2	1	1	1	2	1	1	1	**5**

Auftrennung der DNA mit PFGE nach Restriktion mit fünf verschiedenen Enzymen

Tab. 18: Isolate, die mittels PFGE analysiert wurden.

Position im	Isolat
1	Berlin-1
2	Houston 1
3	LIV-G337
4	Syd-JR8
5	Syd-RMC7
6	Sa-2
7	Syd-R987
8	Cal-1
9	FR96/BK79
10	Syd-JR9
11	ATCC49793
12	B-K116
13	Syd-RMC3
14	FIZZ
15	Syd-NU4714
16	Marseille
17	Berlin-2
18	B-K181
19	Par-I138
20	Par-I107

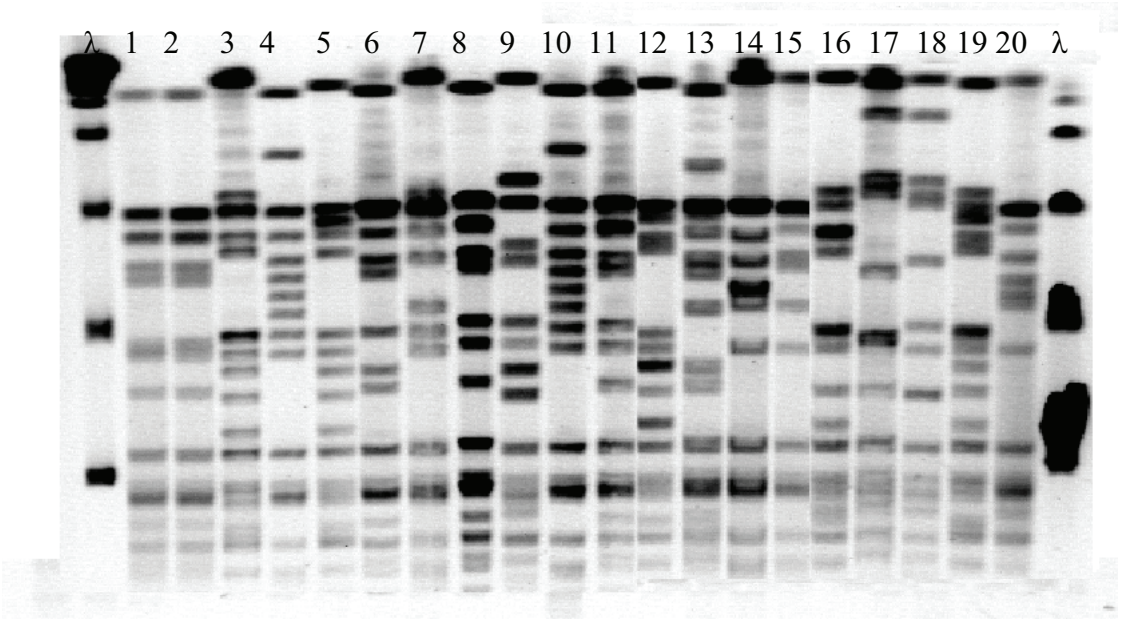


Abb. 15: PFGE-Analyse nach der Restriktion mit *Sma*I. In dieser Abbildung ist ein 1%iges Agarosegel dargestellt. Λ ist der DNA-Größenmarker Lambda Ladder. Spur 1: Das Isolat Houston-1; Spur 2-20 zeigen Isolates, die in der Tabelle 18 (s.o.)aufgelistet sind.

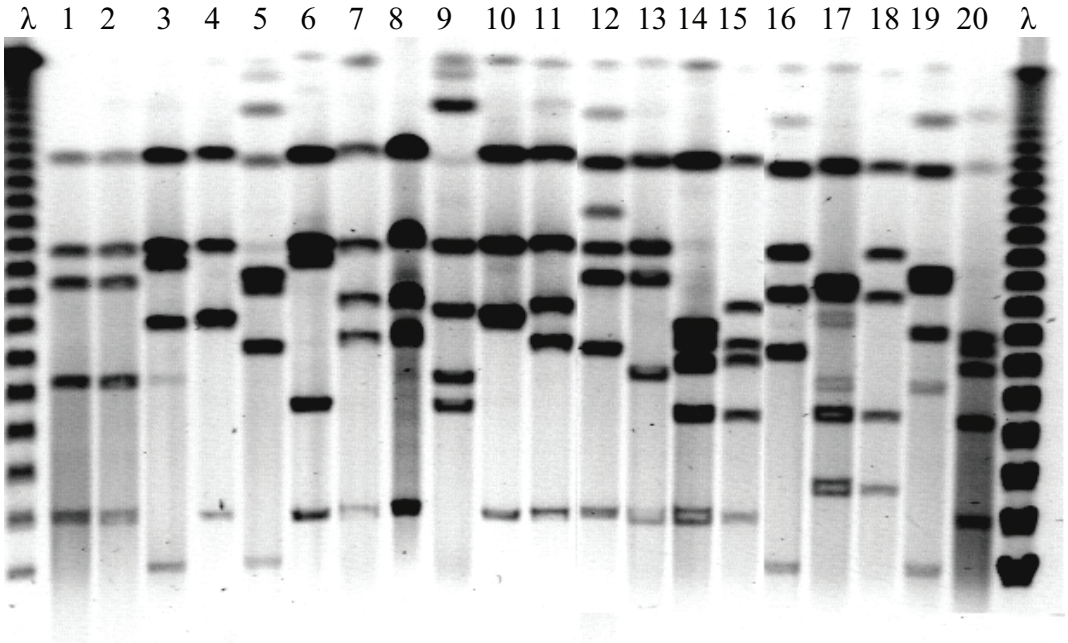


Abb. 16: PFGE-Analyse nach der Restriktion mit *Not*I. In dieser Abbildung ist ein 1%iges Agarosegel dargestellt. Λ = DNA-Größenmarker Lambda Ladder. Spur 1: Das Isolat Houston-1 Spur 2-20 zeigen Isolate, die in der Tabelle 18 (s.o.)aufgelistet sind.

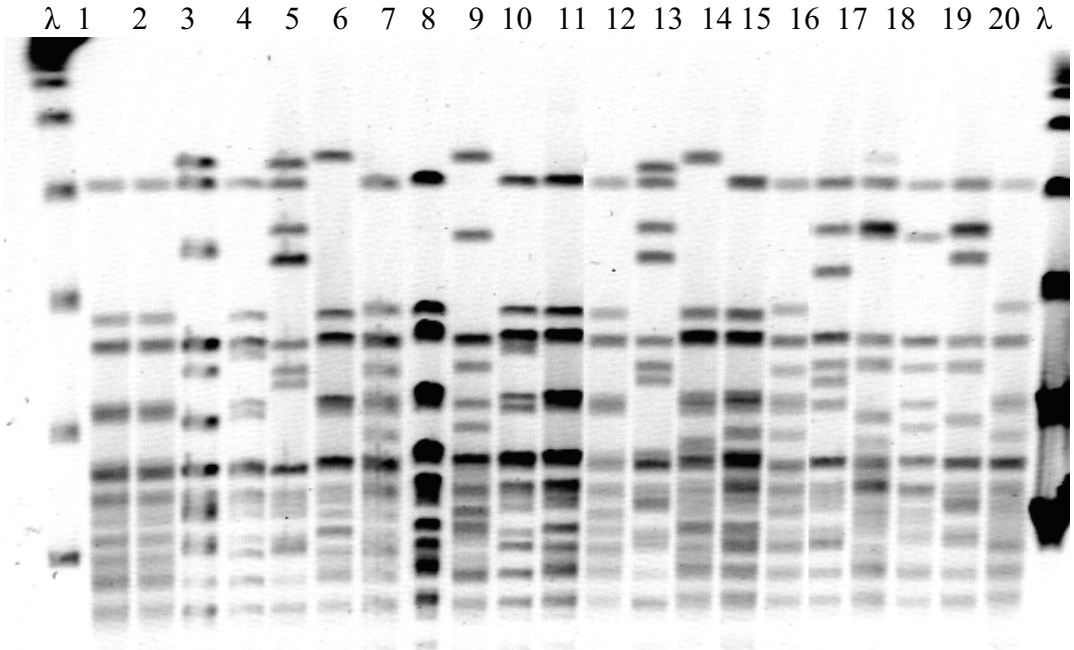


Abb. 17: PFGE-Analyse nach der Restriktion mit *Eco*52I. In dieser Abbildung ist ein 1%iges Agarosegel dargestellt. Λ = DNA-Größenmarker Lambda Ladder. Spur 1: Das Isolat Houston-1 Spur 2-20 zeigen Isolate, die in der Tabelle 18 (s.o.)aufgelistet sind.

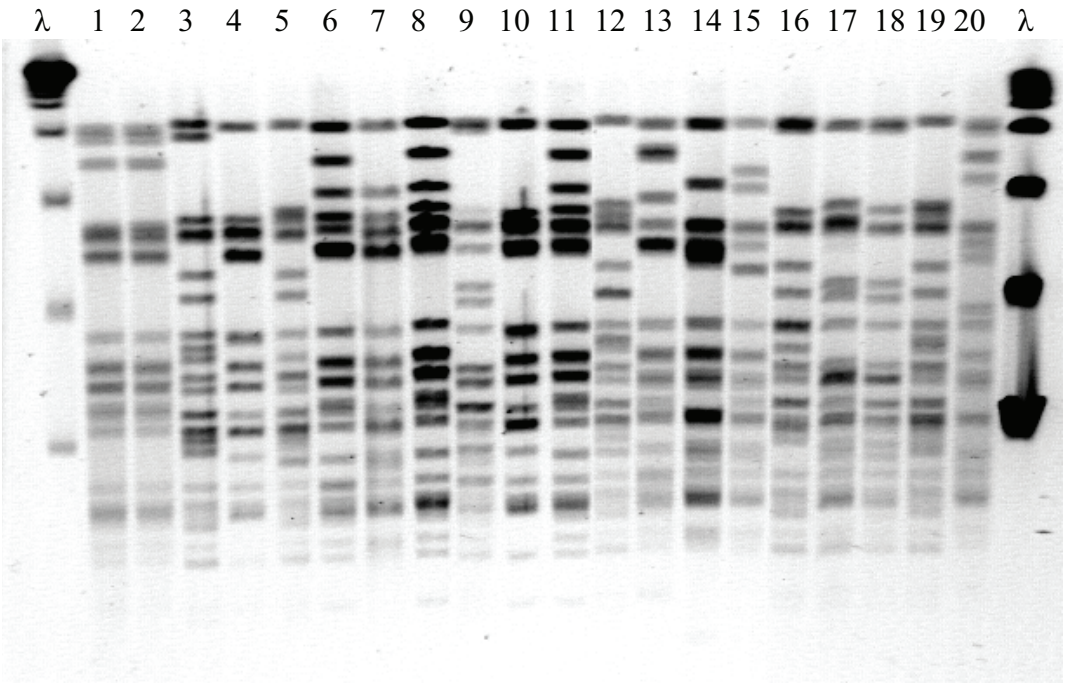


Abb. 18: PFGE-Analyse nach der Restriktion mit *Apa*I. In dieser Abbildung ist ein 1%iges Agarosegel dargestellt. Λ = DNA-Größenmarker Lambda Ladder. Spur 1: Das Isolat Houston-1 Spur 2-20 zeigen Isolate, die in der Tabelle 18 (s.o.)aufgelistet sind.

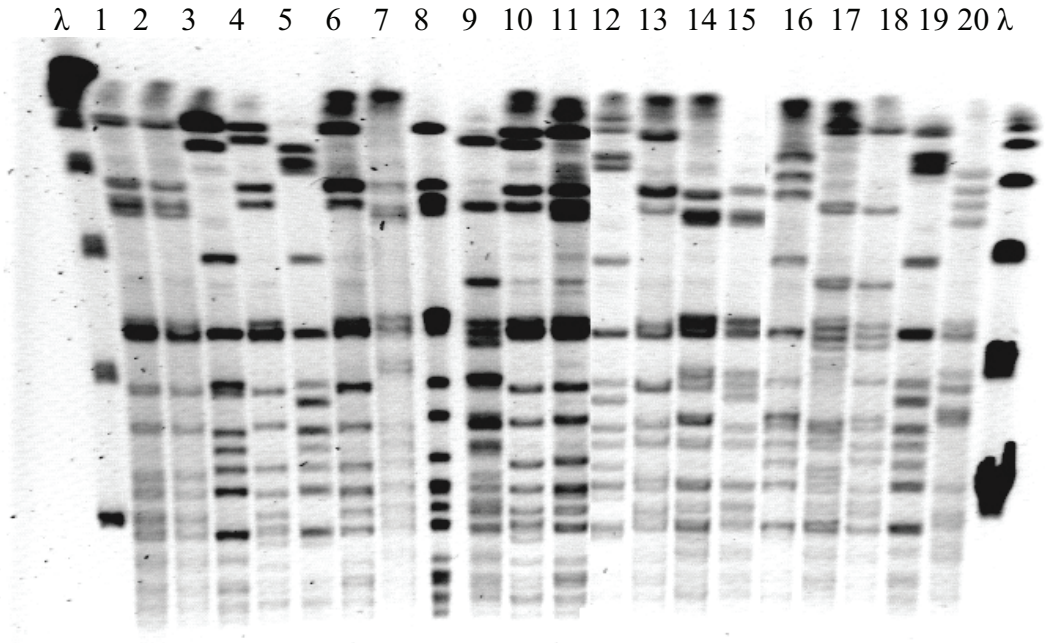


Abb. 19: PFGE-Analyse nach der Restriktion mit *XMAJ*I. In dieser Abbildung ist ein 1%iges Agarosegel dargestellt. Λ = DNA-Größenmarker Lambda Ladder. Spur 1: Das Isolat Houston-1 Spur 2-20 zeigen Isolate, die in der Tabelle 18 (s.o.) aufgelistet sind.

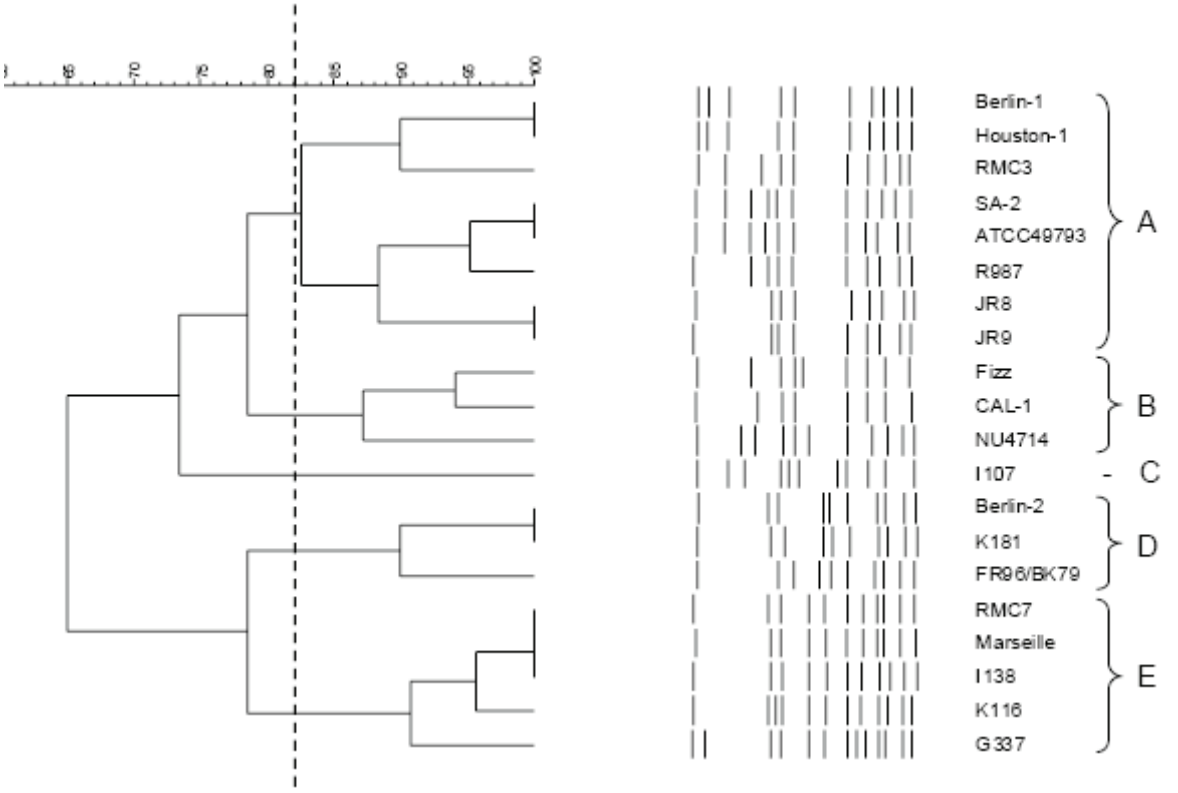


Abb. 21: Dargestellt ist ein Dendrogramm, welches durch eine UPGMA-Cluster Analyse der Restriktionsprofile nach der Restriktion mit dem Enzym *Apa*I von *B. henselae*-Isolaten und PFGE erstellt wurde.

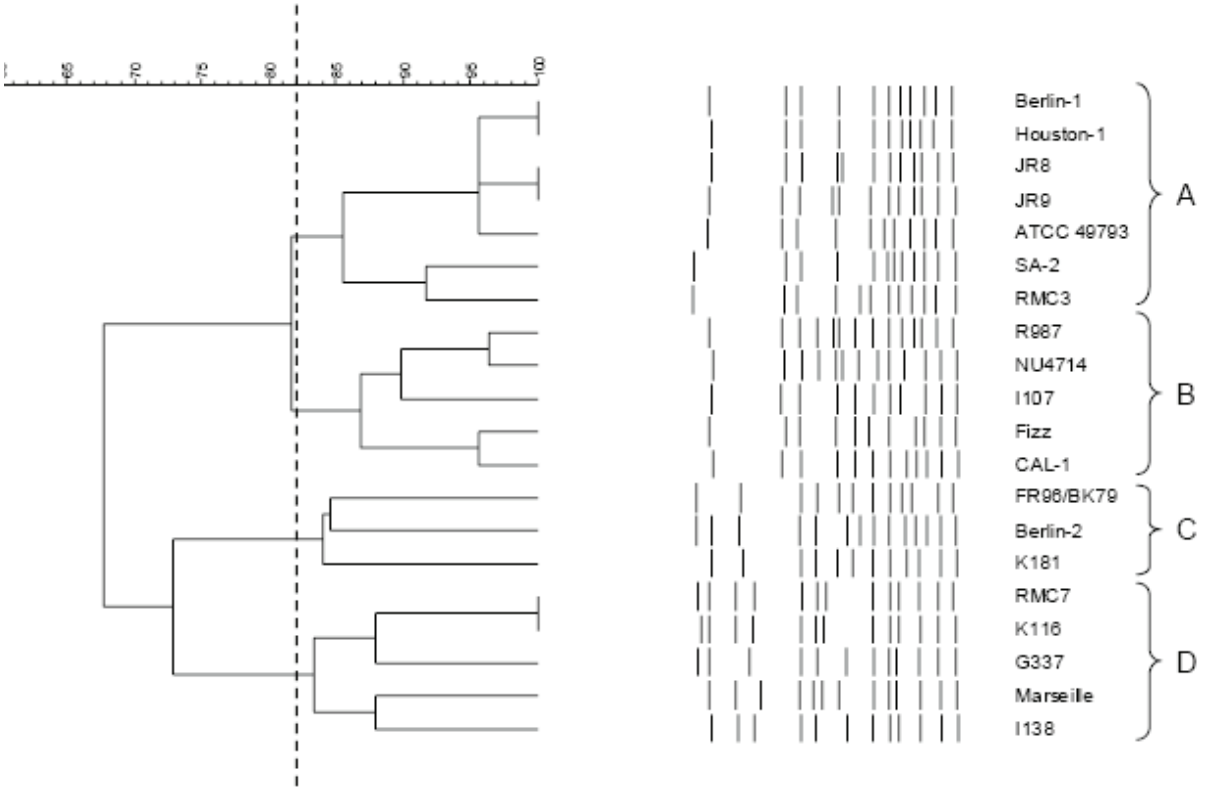


Abb. 22: Dargestellt ist ein Dendrogramm, welches durch eine UPGMA-Cluster Analyse der Restriktionsprofile nach der Restriktion mit dem Enzym *Eco*52I von *B. henselae*-Isolaten und PFGE erstellt wurde.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Bernau (b. Berlin) , den 24.10.2009 Juliane Völkel

Danksagung

Im Besonderen möchte ich Herrn Prof. Dr. A. Podbielski für seine Hilfe, Unterstützung und die wissenschaftliche Betreuung am Ende meiner Arbeit danken, die es mir ermöglichte diese auch noch vollenden zu können.
Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. H. Bahl für die hilfreichen Ratschläge und Diskussionen in den Mittwochsseminaren sowie für die Bereitschaft dieses Thema in der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät zu vertreten.

Besonderen Dank schulde ich Yvonne Humboldt, die exzellente technische Assistentin des Labors in der Arbeitsgruppe Bartonella, für die vielen hilfreichen, praktischen Tipps, die sehr gute Arbeitsatmosphäre, die Motivation und die vielen Gespräche.

Ich möchte der GAS- Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Podbielski danken für die Mitbenutzung vieler Apparaturen, die wissenschaftlichen Ratschläge und die Unterstützung, ohne die mein Projekt nicht vorwärts gekommen wäre. Ganz besonders möchte ich Kerstin Standar und Thomas Köller danken, die immer ein offenes Ohr für meine Probleme und Anliegen hatten und geduldige Zuhörer waren.

Ausdrücklichen Dank bin ich meiner Familie, die mich in unterschiedlichster Weise auch aktuell bei der Arbeit unterstützt hat, schuldig. Es gibt vielfältige Gründe, die ich nicht alle aufführen möchte, nur einige sollen exemplarisch aufgeführt sein. Vielen Dank an meinen Bruder Imre, der in jeder Phase meiner Arbeit an mich geglaubt hat, an Gaby und Gerald, die mir den stets den Freiraum gegeben haben und an meine Eltern, die mir den Weg in die Mikrobiologie ermöglicht haben.

Zum Schluss möchte ich mein besonderen Dank an meinen Mann Christopher richten, der mir treuer Zuhörer war und mich stets mit einem Lächeln motivierte. Er gab mir den nötigen Rückhalt für die wissenschaftliche Arbeit und möge mir verzeihen, dass ich in dieser Zeit oftmals in der Arbeit versunken war.

Kongressbeiträge

09/2006	Poster, 2006 Joint Meeting: “The 20th Meeting of the American Society for Rickettsiology and the 5th International Conference on Bartonella as Emerging Pathogens” in Pacific Grove
09/2005	Posterpräsentation, „2. Gemeinsame Tagung von DGHM und VAAM“ in Göttingen

Publikationen

1. Arvand M., Schubert H., Viezens J. 2006. Emergence of Distinct genetic variants in the population of primary *Bartonella henselae* isolates. *Microbes and Infection* **8**:1315-1320
2. Arvand M., Viezens J. 2007. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis and multi-locus sequence typing fort he analysis of clonal relatedness among *Bartonella henselae* isolates. *IJMM* **297**:255-262
3. Berghoff J., Viezens J., Guptill L., Fabbi M., Arvand M. 2007 *Bartonella henselae* exists as a mosaic of different genetic variants in the infected host. *Microbiology* **153**:2045-2051
4. Arvand M., Feil E., Giladi M., Boulouis H., Viezens J. 2007. Multi-Locus Sequence Typing of *Bartonella henselae* isolates from Three continents Reveals Hypervirulent and Feline-Associated Clones. *PloS one* **12**:e1346
5. Arvand M., Viezens J., Berghoff J. 2008. Prolonged *Bartonella henselae* bacteremia caused by reinfection in cats. *Emerg. Infect. Dis.* **1**:152-154
6. Viezens J. and Arvand M. 2008. Simultaneous presence of two different copies of the 16S rRNA gene in *Bartonella henselae*. *Microbiology* **154**:2881-2886