

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

人畜共通傳染病翰斯勒巴東體第一及第二基因型活體外致病機轉之探討

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2313-B-039-004-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：中國醫藥大學生物科技學系

計畫主持人：徐媛曼

共同主持人：張照勤，吳介信

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 27 日

中文摘要

翰斯勒巴東體(*Bartonella henselae*)會引起多種疾病並協同其他病菌對愛滋病患造成致死性的感染。尤其常對免疫不全症候群病人引起貓抓熱和桿菌性血管瘤。血液學調查結果發現，4-70%的健康貓帶有此菌，並且帶原的貓均有無徵狀的菌毒血症，這對常跟貓接觸的人造成嚴重的威脅。據研究結果顯示，內皮細胞分泌的血管內皮增生因子及翰斯勒巴東體分泌的外膜蛋白是造成的血管增生病灶的主要原因。因此，一個兩階段性致病機制的假說由此建立，其理論為因細菌產生的外膜蛋白刺激血管內皮細胞分泌血管內皮增生因子，進而造成血管的增生。翰斯勒巴東體不只引起血管增生，並會侵入血管內皮細胞，造成血管內皮細胞的增生現象。近年來以分子生物學的方法將翰斯勒巴東體分成兩個基因型。到目前為止，還無法判定基因型的流行率及分佈範圍。但由於臨床症狀上的歧異性很大，不同的基因型極可能是造成症狀歧異的原因之一。已經發現第一型基因型傾向造成肝臟脾臟的血管增生現象，因此基因型極有可能為病症多元化的原因。為探討基因型對致病機制的影響，我們將針對此二基因型的翰斯勒巴東體對血管內皮細胞的侵入能力進行探討，並比較被此二基因型翰斯勒巴東體感染之血管內皮細胞與細胞凋亡有關的蛋白表現的異同。基因型 II 及基因型 I 均可經由降低 Bax 及 Caspase-3 的表現量抑制內皮細胞的凋亡，但基因型 II 對抑制 Caspase-3 有較佳的反應，而基因型 I 對抑制 Bax 有較好的作用；基因型 II 及基因型 I 均可經由增高 NFκB 及 Bcl-2 的表現量促進內皮細胞的增生，而基因型 I 在感染 36 小時後有較強之 NFκB 表現，但基因型 II 有較強之引發 Bcl-2 之表現。綜合以上，*B. henselae* 二基因型引發之抗凋亡途徑雖然相同，但影響程度不同，此即有可能為此二基因型造成不同病徵的原因之一。

關鍵字：翰斯勒巴東體、基因型、細胞凋亡、內皮細胞

英文摘要

Bartonella henselae is an agent capable of causing a wide variety of disease syndromes and is emerging pathogens that cause potentially fetal opportunistic infection in persons with AIDS. The most common *B. henselae*-associated diseases are cat-scratch disease (CSD) and bacillary angiomatosis (BA). *B. henselae* can be isolated from the blood of 4 to 70% of healthy cats depending on its geographic region and the cat population concerned. However, cats are considered to be asymptomatic after *B. henselae* infection, but with long-term bacteremia. This represents a significant public health threat, particularly for individuals with frequent cat contact. Two angiogenic factors have been described to stimulate vascular proliferation, which is a common *B. henselae* induced lesion. One is vascular endothelial growth factor, a host cell production factor, and the other is an outer membrane protein, a microbial factor. Thus, a novel bacterial two-step pathogenicity strategy has been proposed, in which the pathogen triggers growth factor production for subsequent proliferation of its own host cells. *B. henselae* has also showed the ability to invade endothelial cells. It also showed that *B. henselae* could induce antiapoptosis in endothelial cells. Two different genotypes of *B. henselae* have been discriminate recently. It is still unclear which type is the dominant strain in either humans or cats from different geographical areas. The various clinical manifestations in human CSD cases raise the possibility of type-specific difference in their virulence. Patients with *B. henselae* genotype I infection were more likely to have vascular proliferative lesions of the liver and/or spleen than were patients with genotype II infection. Therefore, *B. henselae* genotypes may induce different pathological features in patients. In this study, *B. henselae* genotypes I and II both depressed the expression of Bax and Caspase-3 in order to suppress endothelial cells' apoptosis. However, genotype I had better ability to suppress the expression of Caspase-3 and genotype I had better ability to suppress Bax expression. *B. henselae* genotypes I and II could also increased the expression of NF κ B and Bcl-2 to increase endothelial cell proliferation. However, genotype I induced better NF κ B expression and genotype II increase more Bcl-2 expression. These suggest that the various virulence between genotypes I and II probably was due to the difference between them affected apoptosis-related genes differently.

Keywords: *Bartonella henselae*, Genotype, Apoptosis, Endothelial cells

文獻探討

近年來的研究發現有越來越多的疾病是由 *Bartonella* spp. 引起的，例如 Carrion's disease, 戰壕熱 (trench fever), 貓抓熱 (cat-scratch disease; CSD), 血管瘤桿菌病 (bacillary angiomatosis; BA), 心內膜炎 (endocarditis) 和菌血症 (bacteraemia) 等(29)。*B. henselae* 在 1990 年第一次被檢出，並歸類為一新的 *Bartonella* spp. (33)。它是一種造成多樣性病徵的挑剔性革蘭氏陰性菌，並伺機感染後天免疫缺乏症候群病患 (acquired immune deficiency syndrome; AIDS)，合併其他病症造成病患死亡(19, 21, 22)。就感染 *B. henselae* 的情況，免疫不全的病人 (immunocompromised patients)，尤其是病童(21)，容易感染而造成貓抓熱；在 AIDS 病人也容易造成血管瘤桿菌病(36)。

B. henselae 是造成 CSD 的病源菌。寵物貓是這個病源菌的保菌者 (reservoir)，並且透過貓蚤傳播 (cat flea) (6, 20, 22)。超過 90% 病歷報告顯示其感染與暴露有貓的環境之下有關係，通常是透過表皮有因貓咬或抓過的傷口而感染。感染 *B. henselae* 的免疫不全的病人身上會出現區域性的淋巴病變，同時也出現發燒，身體不適，食慾喪失，頭痛，和脾臟腫大的症狀(9)。此病原由四肢皮膚入侵，通常是由單隻手或者前臂開始。3-5 天後小紅斑出現在入侵部位，接著形成水泡及結痂。患部在幾天至一個星期內會痊癒消失(5)。*B. henselae* 可以從 4 to 70% 的無症狀的貓血中分離(6, 20)，顯示貓感染 *B. henselae* 會產生無症狀的菌血症(13, 23, 41)。*B. henselae* 的菌血症流行率極高，且 *Bartonella* 特異的抗體檢出率也很高，因此，對經常接觸貓的人來說，是一個嚴重的公共衛生議題(6, 25)。雖然 *B. henselae* 造成的危險及其安全守則已經確立(32)，但治療 *B. henselae* 感染的方式還不清楚。目前沒有太多的 *B. henselae* 抗藥性的研究(14, 15, 24, 30, 31, 34, 40)，然而治療失敗或重新復發的機率很高，尤其是曾經短暫使用抗生素的病人，更有些研究顯示，*B. henselae* 對大多數的抗生素是敏感的(24, 31)。因為貓有高流行率的無症狀 *B. henselae* 感染(6, 20, 24)，因此，以抗生素治療貓將預期可減少人感染此菌的機會。

在 1983 年，由感染 *B. henselae* 的 HIV (human immunodeficiency virus-infected patients) 病人身上發現其血管內皮有增生的現象，在皮膚及臟器上也產生如腫瘤樣的病灶 - 血管瘤桿菌病 (BA) (38)。此種血管新生 (angiogenesis) 的病灶通常出現在免疫不全的病人身上的皮膚或皮下組織或肝臟脾臟裡充滿血液的空隙中(37, 39)。就組織病變上來看，BA 病變有三個特色，1) 小血管的增生伴隨著多層的增大的內皮細胞 - 上皮樣血管瘤 (epithelioid hemangioma); 2) 混和著發炎細胞包括嗜中性球及淋巴球包圍在未潰瘍區的血管或較深的已潰瘍區的血管外，此現象稱為化膿性肉芽腫 (pyogenic granuloma); 3) 可用 Warthin-Starry staining 看到群聚的 *Bartonella* 桿菌。可以造成血管內皮細胞的增生是人的病原菌 *Bartonella* spp. 的共同特徵 (2, 29, 37)，這個特性可以用來研究因細菌引起的腫瘤產生。此外，*Bartonella* spp. 菌體本身及其培養液中 (cell-free extracts)，有某些因子可以刺激人類臍靜脈內皮細胞的增生 (human umbilical vein endothelial cells; HUVEC) (7, 11, 12)。將 *B. henselae* 的外膜以 trypsin 處理，可降低此菌刺激血管新生的能力，故推測 *B. henselae* 中造成血管內皮增生之因子應位於外膜 (4, 7, 28)。除此之外，*B. henselae* 也刺激宿主細胞產生血管生成因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF)，進而啟動血管新生的機制(42) 造成內皮細胞的增生(17)。另有研究顯示，*B. henselae* 的纖毛 (pili) 也和血管生成因子的

產生有關(16, 17)。因此，推測 *B. henselae* 有一個兩階段性的致病調控方式，即細菌引發血管生成因子的產生進而造成宿主細胞的增生。

B. henselae 不止可以附著在人的血管內皮細胞上更可感染進入細胞中(8)，菌落的形成並入侵血管內皮細胞一直被認為是造成血管增生的重要步驟。表面纖毛也一直被認為和細菌附著在宿主細胞上有重要的關係，因為沒有纖毛的菌株不能侵入細胞中(3)。在動植物及人的病原菌中均存在第四型輸出蛋白的系統 (type IV secretion mechanism)，此系統與纖毛組成的通過內膜及外膜的蛋白通道極為類似。Type IV secretion mechanism 可以運送大的分子如 DNA 及蛋白質等，而研究多的 type IV secretion system 是 *Agrobacterium tumefaciens* 的 *virB* operon (16)。在 *B. henselae* 中有 10 個 *virB* operon 基因，其中有 8 個和 *A. tumefaciens* 中的 *virB* operon 基因類似。在 *B. henselae* 入侵細胞時表現其 *virB* 基因，表示此輸出系統的啟動，即對環境的感受機轉 (environment-sensing mechanism)，可能與 *A. tumefaciens* 中的 *virB* operon 類似(35)。因此合理的推測，*B. henselae* 和 *A. tumefaciens* 有類似的致病機轉。

Bartonella 在感染宿主細胞的過程中不只是成群的在內皮細胞旁，它在體外的研究上也確定了其對宿主細胞產生抑制凋亡的作用，它因抗凋亡的作用造成內皮細胞的增生(18)。幾個非內皮細胞的細胞株，包括 fibroblast lines (MRC-5, WI-38, and HEL,) carcinoma cell lines (HEp-2, A549, 和 Madin-Darby canine kidney), 及 RD cell line，感染 *Bartonella* 後，並不會抑制任何一株非內皮細胞株的死亡，但對 HUVE-C (一個 endothelial cell line) 及人類表皮微血管內皮細胞 (human dermal microvascular endothelial cells) 卻可造成抗凋亡的作用 (antiapoptotic activity) (18)。這可部分解釋 *Bartonella* 在體內促進血管增生的原因。

在 *B. quintana* 入侵 HUVEC-C 的研究中已經確認幾個與凋亡有關的基因。Apf1 和 caspase 8 會在 HUVEC-C 被感染後 2 小時表現，Bcl2 在感染後 10 小時出現(27)。 *B. quintana* 也是一個細胞內寄生的病原菌並造成宿主產生 BA 病灶 (26)。因此推測，*B. henselae* 在感染內皮細胞後也可能依類似的途徑調控內皮細胞的生長。而 *B. henselae* 的外膜蛋白 (outer membrane proteins, OMPs) 在侵入 HUVEC-C 的過程中，亦被證實可以引發內皮細胞中 NF- κ B 及粘著因子 (adhesion molecule) 的表現，進而增進白血球 (leukocytes) 在內皮細胞上的滾動 (rolling) 及附著 (adhesion)，*B. henselae* 感染血管內皮細胞後產生的這一連串反應應為其致病機轉中重要的一環(10)。*B. henselae* 的基因體定序已經完成(1)，其染色體具 1,931,047bp，包含 1,491 個基因，基因體定序的完成將有助於進一步了解其致病機轉。

研究方法

B. henselae 的分離及培養

為由病患分離之 *B. henselae* 菌株培養在巧克力培養基上，於 37°C 培養箱中厭氧培養約 4 到 5 天，可見菌落生成。本實驗所用菌株為由中興大學獸醫學院獸醫公共衛生研究所張照勤老師分讓之 JK47 (基因型 I) 及 JK40 (基因型 II)。

B. henselae 感染血管內皮細胞株

本研究中使用鼠淋巴結內皮細胞株 SV40 (ATCC CRL-2181)。細胞經培養至適當量後，將其分裝至六孔盤(每盤約 10^5 細胞於 2ml 培養液。於 37°C 進行隔夜培養後，置換含 10^5 *B. henselae* 的新培養液進行細胞感染，於感染後 48 小時內每 3 小時收取細胞進行分析。為分析 *B. henselae* 侵入細胞後所表現之蛋白，培養後之細胞需先進行 2 小時 gentamycin 處理，以殺死細胞外之細菌。

西方墨點轉漬法

細胞之總蛋白以 TRIZOL reagent 純化，而以 Bradford method (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 定量蛋白質。電泳膠則為利用半乾式轉漬器 (Hofer TE 22, Amersham Biosciences, UK) 將膠上之蛋白質轉漬 (transfer) 至 PVDF 膜 (Hybond-P, Amersham Biosciences, UK) 上，條件為 100 伏特 1 小時。轉漬後之濾紙浸於含 blocking buffer 中，室溫搖晃 1 小時後，將以 PBSTM 稀釋 3000 倍之 rabbit-anti β -actin, Bcl2, Bax, Caspase-3, Caspase-9 及 NF κ B 抗體加入轉漬後之 PVDF 膜，並於室溫下搖晃作用 1 小時，作用後以 PBST 搖晃清洗三次，再將以 PBSTM 稀釋 1000 倍之 alkaline phosphatase donkey- anti- rabbit IgG 加入 PVDF 膜，並於室溫下作用 1 小時，作用後以 PBST 搖晃清洗三次；處理後之 PVDF 膜以 PBS 搖晃清洗兩次後，將 membrane 加入 ECL 以反應出螢光，片夾內置入 X-ray film 與 membrane 進行壓片，再取出 X-ray film，進行顯影及定影。Protein band 含量採 Kodak digital science 1D (ver.2.03) (Kodak,Rochester,NY, USA) 軟體分析。

結果與討論

B. henselae JK47 (基因型 I) 及 JK40 (基因型 II) 感染鼠淋巴結內皮細胞之差異

B. henselae JK40 在感染鼠淋巴結內皮細胞 3 小時後，每 100 個細胞平均有 6.7 個細菌感染 (如圖一)，到第 6 個小時已具較第 3 個小時的 4.48 倍感染率，到第 9 個小時就有 25 倍的感染率，第 12 個小時有極顯著的差異，即與第 3 個小時感染率比較，增高 872.2 倍。反觀 *B. henselae* JK47 之感染率，在第三個小時時，每 100 個細胞平均有 3.6 個細菌感染，而在 6 小時到 12 小時間，均保持具較第 3 個小時的 5.5 倍感染率。由此可之，JK40 株具較強之感染鼠淋巴結內皮細胞的能力，尤其在 9 小時後更顯其差異之顯著。此結果並不符合臨床分離之結果，臨床病徵上顯示，JK47 株為較具毒力之菌株，故推測其具較強之感染力，本研究之結果可能是因為所使用之細胞株為鼠之淋巴結內皮細胞，而鼠類並無感染 *B. henselae* 的臨床報告，因此強毒株反倒較弱毒株有較弱之感染力。

B. henselae JK47 (基因型 I) 及 JK40 (基因型 II) 感染鼠淋巴結內皮細胞引發凋亡相關蛋白表現之差異

本研究探討五種與細胞凋亡有關之蛋白質表現，NF κ B，Bcl-2，Bax，Caspase-8，及 Caspase-3，希望藉此評估 *B. henselae* 所引發之鼠淋巴結內皮細胞凋亡途徑，並比較基因型 I 及 II 型所引發之凋亡途徑之異同。在 NF κ B 的蛋白質表現量上 (如圖二)，在感染 48 小時前，此二型 *B. henselae* 引發鼠淋巴結內皮細胞表現之 NF κ B 的量與對照組 (即無 *B. henselae* 感染之鼠淋巴結內皮細胞) 比較並無顯著差異；但在第 48 小時，JK47 可引起較對照組高 2 倍之 NF κ B 表現，到第 60 小時更有較對照組高 3 倍之 NF κ B 表現。因此，JK47 在感染鼠淋巴結內皮細胞 48 小時後，較 JK40 有較強之能力引起內皮細胞產生抗凋亡的準備，此結果可以支持臨床上，JK47 具較強之引起血管內皮細胞增生之現象。

在 Bcl-2 的蛋白質表現量上 (如圖三)，JK40 在感染鼠淋巴結內皮細胞後 6 小時，即持續引起內皮細胞表現 Bcl-2，與對照組比較，其增高之量由第 3 個小時之 2.75 倍到第 60 小時的 6.15 倍。而 JK47 由感染第 12 小時起，才開始引發較多之 Bcl-2 表現，其表現量在感染之第 24 小時出現，為對照組之表現量之 8 倍，隨後其表現量遞減，至第 60 小時時，已至對照組之表現量之 5 倍。JK40 及 JK47 均引起內皮細胞之抗凋亡反應，JK47 在第 24 小時達到引起最多 Bcl-2 蛋白質表現，而 JK40 引發之 Bcl-2 表現則隨時感染時間持續增加。

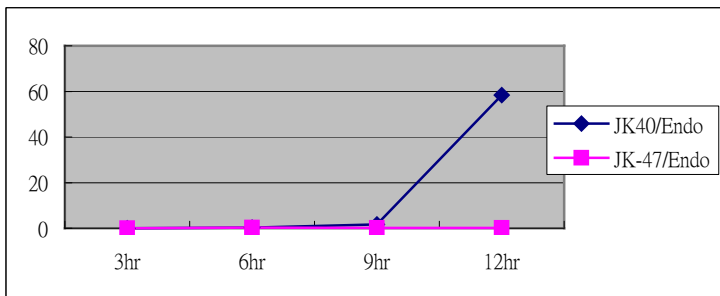
在 Bax 的蛋白質表現量上 (如圖四)，在 *B. henselae* 感染鼠淋巴結內皮細胞 48 小時內，JK40 及 JK47 所引起之 Bax 表現量均低於對照組；但在 JK40 感染內皮細胞 60 小時後，其 Bax 表現量為對照組之 1.3 倍。對照組之 Bax 表現量在第 36 小時達到高峰，而感染 JK47 之內皮細胞其 Bax 表現量在 60 小時感染中，均保持相同之表現量。由此可知，在感染 48 小時內，JK40 及 47 均可壓制內皮細胞之凋亡趨勢，但在 48 小時後，JK40 反倒引發較強之凋亡蛋白表現。

在 Caspase-8 的蛋白質表現量上 (如圖五)，對照組及兩組感染組所表現之 Caspase-8 再 60 小時內，均無明顯變化，因此，JK40 及 JK47 並不是循這個凋亡途徑引發內皮細胞之增生反應。

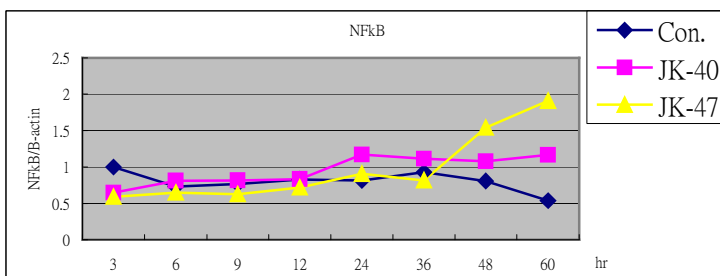
在 Caspase-3 的蛋白質表現量上 (如圖六)，對照組隨著時間的增加持續增高 Caspase-3 的表現，到第 60 小時，已有較第三小時高 133.3 倍之 Caspase-3 表現量。而感染 JK40 之內皮細胞其 Caspase-3 表現量在 60 小時感染中，均保持相同且較對照組低之表現量；感染 JK47 之內皮細胞其 Caspase-3 表現量在 60 小時感染中，除第 24 小時有與對照組相同之 Caspase-3

表現量外，其餘時間均保持相同且較對照組低之表現量。由此可知，JK40 及 JK47 均可抑制內皮細胞之凋亡趨勢。

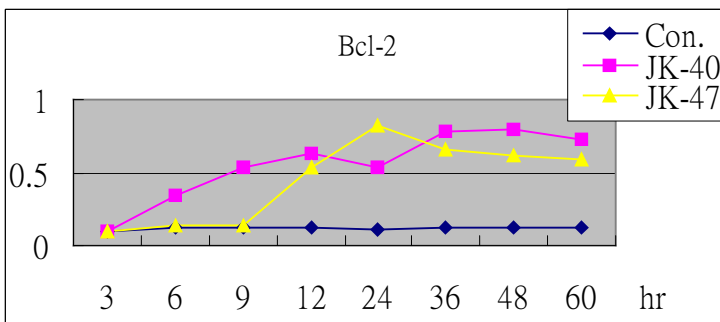
JK40 及 JK47 均可經由降低 Bax 及 Caspase-3 的表現量抑制內皮細胞的凋亡，但 JK40 對抑制 Caspase-3 有較佳的反應，而 JK47 對抑制 Bax 有較好的作用；JK40 及 JK47 均可經由增高 NFκB 及 Bcl-2 的表現量促進內皮細胞的增生，而 JK47 在感染 36 小時後有較強之 NFκB 表現，但 JK40 有較強之引發 Bcl-2 之表現。綜合以上，*B. henselae* 二基因型引發之抗凋亡途徑雖然相同，但影響程度不同，此即有可能為此二基因型造成不同病徵的原因之一。



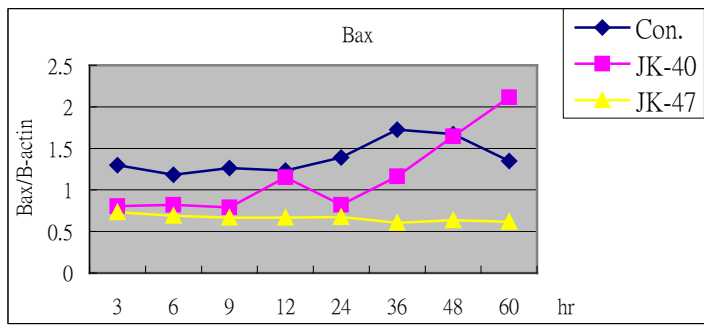
圖一 *B. henselae* JK47 (基因型 I) 及 JK40 (基因型 II) 感染鼠淋巴結內皮細胞之差異



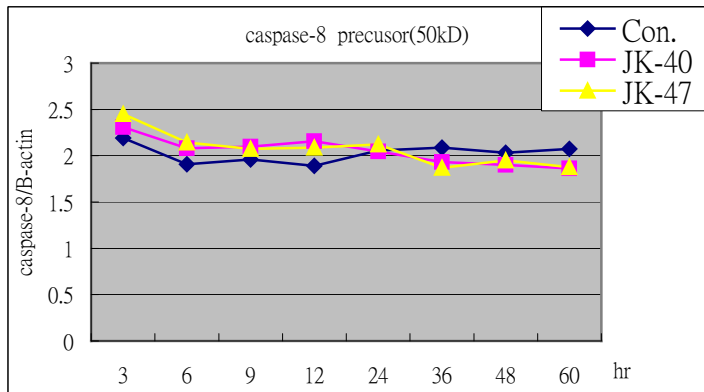
圖二 *B. henselae* JK47 (基因型 I) 及 JK40 (基因型 II) 引發鼠淋巴結內皮細胞 NFκB 蛋白表現之差異



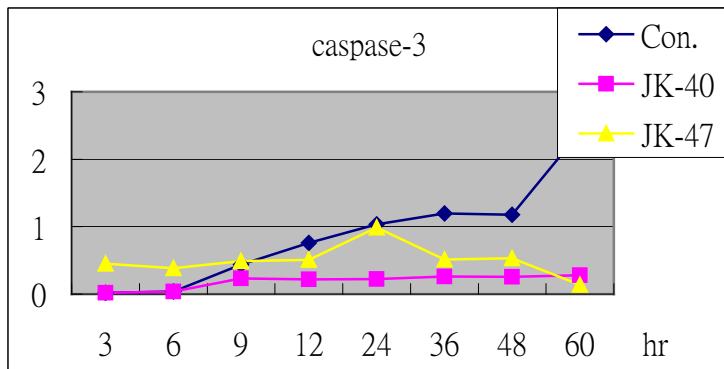
圖三 *B. henselae* JK47 (基因型 I) 及 JK40 (基因型 II) 引發鼠淋巴結內皮細胞 Bcl-2 蛋白表現之差異



圖四 *B. henselae* JK47 (基因型 I) 及 JK40 (基因型 II) 引發鼠淋巴結內皮細胞 Bax 蛋白表現之差異



圖五 *B. henselae* JK47 (基因型 I) 及 JK40 (基因型 II) 引發鼠淋巴結內皮細胞 caspase-8 蛋白表現之差異



圖六 *B. henselae* JK47 (基因型 I) 及 JK40 (基因型 II) 引發鼠淋巴結內皮細胞 caspase-3 蛋白表現之差異

参考文献

1. **Alsmark, C. M., A. C. Frank, E. O. Karlberg, B. A. Legault, D. H. Ardell, B. Canback, A. S. Eriksson, A. K. Naslund, S. A. Handley, M. Huvet, B. La Scola, M. Holmberg, and S. G. Andersson.** 2004. The louse-borne human pathogen *Bartonella quintana* is a genomic derivative of the zoonotic agent *Bartonella henselae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:9716-21.
2. **Anderson, B. E., and M. A. Neuman.** 1997. *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. *Clin Microbiol Rev* **10**:203-19.
3. **Batterman, H. J., J. A. Peek, J. S. Loutit, S. Falkow, and L. S. Tompkins.** 1995. *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* adherence to and entry into cultured human epithelial cells. *Infect Immun* **63**:4553-6.
4. **Burgess, A. W., and B. E. Anderson.** 1998. Outer membrane proteins of *Bartonella henselae* and their interaction with human endothelial cells. *Microb Pathog* **25**:157-64.
5. **Carithers, H. A.** 1985. Cat-scratch disease. An overview based on a study of 1,200 patients. *Am J Dis Child* **139**:1124-33.
6. **Chomel, B. B., R. C. Abbott, R. W. Kasten, K. A. Floyd-Hawkins, P. H. Kass, C. A. Glaser, N. C. Pedersen, and J. E. Koehler.** 1995. *Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. *J Clin Microbiol* **33**:2445-50.
7. **Conley, T., L. Slater, and K. Hamilton.** 1994. *Rochalimaea* species stimulate human endothelial cell proliferation and migration in vitro. *J Lab Clin Med* **124**:521-8.
8. **Dehio, C., M. Meyer, J. Berger, H. Schwarz, and C. Lanz.** 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 (Pt 18)**:2141-54.
9. **Dolan, M. J., M. T. Wong, R. L. Regnery, J. H. Jorgensen, M. Garcia, J. Peters, and D. Drehner.** 1993. Syndrome of *Rochalimaea henselae* adenitis suggesting cat scratch disease. *Ann Intern Med* **118**:331-6.
10. **Fuhrmann, O., M. Arvand, A. Gohler, M. Schmid, M. Krull, S. Hippenstiel, J. Seybold, C. Dehio, and N. Suttorp.** 2001. *Bartonella henselae* induces NF-kappaB-dependent upregulation of adhesion molecules in cultured human endothelial cells: possible role of outer membrane proteins as pathogenic factors. *Infect Immun* **69**:5088-97.
11. **Garcia, F. U., J. Wojta, K. N. Broadley, J. M. Davidson, and R. L. Hoover.** 1990. *Bartonella bacilliformis* stimulates endothelial cells in vitro and is angiogenic in vivo. *Am J Pathol* **136**:1125-35.
12. **Garcia, F. U., J. Wojta, and R. L. Hoover.** 1992. Interactions between live *Bartonella bacilliformis* and endothelial cells. *J Infect Dis* **165**:1138-41.
13. **Greene, C. E., M. McDermott, P. H. Jameson, C. L. Atkins, and A. M. Marks.** 1996. *Bartonella henselae* infection in cats: evaluation during primary infection, treatment, and rechallenge infection. *J Clin Microbiol* **34**:1682-5.
14. **Ives, T. J., P. Manzewitsch, R. L. Regnery, J. D. Butts, and M. Kebede.** 1997. In vitro susceptibilities of *Bartonella henselae*, *B. quintana*, *B. elizabethae*, *Rickettsia rickettsii*, *R. conorii*, *R. akari*, and *R. prowazekii* to macrolide antibiotics as determined by immunofluorescent-antibody analysis of infected Vero cell monolayers. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:578-82.
15. **Ives, T. J., E. L. Marston, R. L. Regnery, and J. D. Butts.** 2001. In vitro susceptibilities of *Bartonella* and *Rickettsia* spp. to fluoroquinolone antibiotics as determined by immunofluorescent antibody analysis of infected Vero cell monolayers. *Int J Antimicrob Agents* **18**:217-22.
16. **Kempf, V. A., N. Hitziger, T. Riess, and I. B. Autenrieth.** 2002. Do plant and human pathogens have a common pathogenicity strategy? *Trends Microbiol* **10**:269-75.
17. **Kempf, V. A., B. Volkmann, M. Schaller, C. A. Sander, K. Alitalo, T. Riess, and I. B. Autenrieth.** 2001. Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations. *Cell Microbiol* **3**:623-32.
18. **Kirby, J. E., and D. M. Nekorchuk.** 2002. *Bartonella*-associated endothelial proliferation depends on inhibition of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:4656-61.
19. **Koehler, J. E.** 1995. *Bartonella*-associated infections in HIV-infected patients. *AIDS Clin Care* **7**:97-102.
20. **Koehler, J. E., C. A. Glaser, and J. W. Tappero.** 1994. *Rochalimaea henselae* infection. A new zoonosis with

the domestic cat as reservoir. *Jama* **271**:531-5.

21. **Koehler, J. E., P. E. LeBoit, B. M. Egbert, and T. G. Berger.** 1988. Cutaneous vascular lesions and disseminated cat-scratch disease in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *Ann Intern Med* **109**:449-55.
22. **Koehler, J. E., M. A. Sanchez, C. S. Garrido, M. J. Whitfeld, F. M. Chen, T. G. Berger, M. C. Rodriguez-Barradas, P. E. LeBoit, and J. W. Tappero.** 1997. Molecular epidemiology of bartonella infections in patients with bacillary angiomatosis-peliosis. *N Engl J Med* **337**:1876-83.
23. **Kordick, D. L., and E. B. Breitschwerdt.** 1997. Relapsing bacteremia after blood transmission of *Bartonella henselae* to cats. *Am J Vet Res* **58**:492-7.
24. **Kordick, D. L., M. G. Papich, and E. B. Breitschwerdt.** 1997. Efficacy of enrofloxacin or doxycycline for treatment of *Bartonella henselae* or *Bartonella clarridgeiae* infection in cats. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:2448-55.
25. **Kordick, D. L., K. H. Wilson, D. J. Sexton, T. L. Hadfield, H. A. Berkhoff, and E. B. Breitschwerdt.** 1995. Prolonged *Bartonella* bacteremia in cats associated with cat-scratch disease patients. *J Clin Microbiol* **33**:3245-51.
26. **Liberto, M. C., and G. Matera.** 2000. Pathogenic mechanisms of *Bartonella quintana*. *New Microbiol* **23**:449-56.
27. **Liberto, M. C., G. Matera, A. G. Lamberti, G. S. Barreca, A. Quirino, and A. Foca.** 2003. In vitro *Bartonella quintana* infection modulates the programmed cell death and inflammatory reaction of endothelial cells. *Diagn Microbiol Infect Dis* **45**:107-15.
28. **Maeno, N., H. Oda, K. Yoshiie, M. R. Wahid, T. Fujimura, and S. Matayoshi.** 1999. Live *Bartonella henselae* enhances endothelial cell proliferation without direct contact. *Microb Pathog* **27**:419-27.
29. **Maurin, M., R. Birtles, and D. Raoult.** 1997. Current knowledge of *Bartonella* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **16**:487-506.
30. **Maurin, M., S. Gasquet, C. Ducco, and D. Raoult.** 1995. MICs of 28 antibiotic compounds for 14 *Bartonella* (formerly *Rochalimaea*) isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:2387-91.
31. **Musso, D., M. Drancourt, and D. Raoult.** 1995. Lack of bactericidal effect of antibiotics except aminoglycosides on *Bartonella* (*Rochalimaea*) *henselae*. *J Antimicrob Chemother* **36**:101-8.
32. **Regnery, R. L., J. E. Childs, and J. E. Koehler.** 1995. Infections associated with *Bartonella* species in persons infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* **21 Suppl 1**:S94-8.
33. **Relman, D. A., J. S. Loutit, T. M. Schmidt, S. Falkow, and L. S. Tompkins.** 1990. The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. *N Engl J Med* **323**:1573-80.
34. **Rolain, J. M., M. Maurin, and D. Raoult.** 2000. Bactericidal effect of antibiotics on *Bartonella* and *Brucella* spp.: clinical implications. *J Antimicrob Chemother* **46**:811-4.
35. **Schmiederer, M., R. Arcenas, R. Widen, N. Valkov, and B. Anderson.** 2001. Intracellular induction of the *Bartonella henselae* *virB* operon by human endothelial cells. *Infect Immun* **69**:6495-502.
36. **Smith, K. J., H. G. Skelton, S. Tuur, P. L. Larson, and P. Angritt.** 1996. Bacillary angiomatosis in an immunocompetent child. *Am J Dermatopathol* **18**:597-600.
37. **Spach, D. H., and J. E. Koehler.** 1998. *Bartonella*-associated infections. *Infect Dis Clin North Am* **12**:137-55.
38. **Stoler, M. H., T. A. Bonfiglio, R. T. Steigbigel, and M. Pereira.** 1983. An atypical subcutaneous infection associated with acquired immune deficiency syndrome. *Am J Clin Pathol* **80**:714-8.
39. **Taylor, A. G., R. Birtles, and T. G. Harrison.** 1993. Cat-scratch, Kaposi's sarcoma, and bacillary angiomatosis. *Lancet* **342**:686.
40. **Tedeschi, G. G., D. Amici, F. Farabollini, and M. Paparelli.** 1966. [Action of antibiotics and chemotherapeutic agents on *Haemobartonella muris* infections]. *Boll Soc Ital Biol Sper* **42**:1137-9.
41. **Yamamoto, K., B. B. Chomel, R. W. Kasten, C. C. Chang, T. Tseggai, P. R. Decker, M. Mackowiak, K. A. Floyd-Hawkins, and N. C. Pedersen.** 1998. Homologous protection but lack of heterologous-protection by various species and types of *Bartonella* in specific pathogen-free cats. *Vet Immunol Immunopathol* **65**:191-204.
42. **Yancopoulos, G. D., S. Davis, N. W. Gale, J. S. Rudge, S. J. Wiegand, and J. Holash.** 2000. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* **407**:242-8.