

Untersuchungen zur *in vitro* Empfindlichkeit gegen  
Antibiotika und zur molekularen Charakteristik von  
*Borrelia spielmanii* im Vergleich zu anderen  
humanpathogenen Vertretern des *Borrelia*  
*burgdorferi*-Komplexes

**Kristina Morgenstern**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

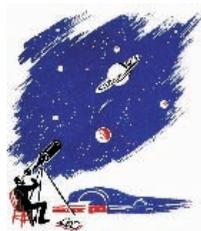
Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Institut für Medizinische  
Mikrobiologie und Krankenhaushygiene  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Betreuer: Hochschuldozent Dr. med. K.-P. Hunfeld

und

aus dem Institut für Hygiene  
und Infektionskrankheiten der Tiere  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Untersuchungen zur *in vitro* Empfindlichkeit gegen  
Antibiotika und zur molekularen Charakteristik von  
*Borrelia spielmanii* im Vergleich zu anderen  
humanpathogenen Vertretern des *Borrelia*  
*burgdorferi*-Komplexes

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Kristina Morgenstern**

Tierärztin aus Krefeld

Gießen 2008

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter:

Hochschuldozent Dr. K.-P. Hunfeld

Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Tag der Disputation: 16.12.2008

## Danksagung

An dieser Stelle ein großer Dank an alle, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz herzlich danke ich Herrn Dr. med. K.-P. Hunfeld für die Bereitstellung des Themas, besonders aber für die stete Diskussionsbereitschaft, die vielen fachlichen Anregungen und die umfassende Betreuung und Förderung meiner Arbeit.

Bei Prof. Dr. med. V. Brade bedanke ich mich für die Aufnahme als Doktorandin und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Herrn Prof. Dr. Dr. habil G. Baljer möchte ich für die Vertretung der Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen sowie für seine Unterstützung und stete Gesprächsbereitschaft danken.

Vielen Dank auch an Herrn Dr. phil. nat. P. Kraiczy, Frau C. Hanssen-Hübner und Frau C. Siegel, die mich nicht nur fachkundig in die Methoden eingeführt haben, sondern mir auch bei allen Problemen mit Rat, Tat und Expertise zur Seite standen.

Dank an Corinna auch für die tollen Immunfluoreszenzbilder für die Titelseite.

Von Herzen danke ich meinen Eltern und auch meiner „erweiterten“ Familie für all die Unterstützung vor und während der Erstellung meiner Dissertation. Besonderer Dank an meinen Freund Christian, der mir stets mit Verständnis und Geduld zur Seite stand und mir mit viel Mühe perfekte technische Voraussetzungen für die Manuskripterstellung geschaffen hat.



---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Themenbezogene Literaturübersicht</b>	<b>5</b>
<b>2.1</b>	<b>Zur Erkrankung der Lyme Borreliose bei Mensch und Tier</b>	<b>5</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Geschichte</b>	<b>5</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Erreger</b>	<b>5</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Epidemiologie</b>	<b>6</b>
2.1.3.1	Verbreitung	6
2.1.3.2	Vektoren	8
2.1.3.3	Reservoirre und Wirte	8
2.1.3.3.1	Reservoirre und Wirte des <i>B. burgdorferi</i> s.l.-Komplexes	8
2.1.3.3.2	Reservoirre und Wirte von <i>B. spielmanii</i>	9
<b>2.1.4</b>	<b>Pathogenese</b>	<b>11</b>
<b>2.1.5</b>	<b>Klinik beim Menschen</b>	<b>13</b>
<b>2.1.6</b>	<b>Klinik beim Tier</b>	<b>14</b>
2.1.6.1	Allgemeines	14
2.1.6.2	Lyme Borreliose beim Hund	14
2.1.6.3	Lyme Borreliose bei anderen Tierarten	15
<b>2.1.7</b>	<b>Diagnostik</b>	<b>18</b>
2.1.7.1	Routinediagnostik in der Humanmedizin	18
2.1.7.2	Routinediagnostik in der Veterinärmedizin	20
<b>2.1.8</b>	<b>Therapie</b>	<b>21</b>
2.1.8.1	Borreliose-Therapie in der Humanmedizin	21
2.1.8.2	Borreliose-Therapie in der Veterinärmedizin	22
<b>2.1.9</b>	<b>Prophylaxe</b>	<b>23</b>
2.1.9.1	Allgemeine Präventionsmaßnahmen	23
2.1.9.2	Impfung	24
<b>2.2</b>	<b>Problematik der antibiotischen Behandlung der Lyme Borreliose</b>	<b>25</b>
<b>2.3</b>	<b>Ursachen von Therapieversagen, Erregerpersistenz und Spätfolgen</b>	<b>27</b>
<b>2.4</b>	<b>Wirtschaftliche Bedeutung der Lyme Borreliose</b>	<b>29</b>
<b>2.5</b>	<b><i>In vitro</i> Testung von Antibiotika</b>	<b>30</b>
<b>2.6</b>	<b>Minimale Hemmkonzentration (MHK) und minimale bakterizide Konzentration (MBK)</b>	<b>31</b>
<b>2.7</b>	<b>Genotypisierung und taxonomische Zuordnung von Borrelien</b>	<b>33</b>
<b>2.7.1</b>	<b>Geschichte und Systematik</b>	<b>33</b>
<b>2.7.2</b>	<b>Möglichkeiten der genetischen Charakterisierung</b>	<b>34</b>
<b>2.8</b>	<b>Verwendete Antibiotika</b>	<b>37</b>
<b>2.8.1</b>	<b>Doxycyclin</b>	<b>37</b>
<b>2.8.2</b>	<b>Penicillin und Amoxicillin</b>	<b>37</b>
<b>2.8.3</b>	<b>Cefuroxim und Ceftriaxon</b>	<b>39</b>

2.8.4	Erythromycin und Clarithromycin.....	40
2.8.5	Ciprofloxacin und Levofloxacin .....	41
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b> .....	<b>43</b>
3.1.1	Borrelienisolate .....	43
3.1.2	Geräte .....	43
3.1.3	Chemikalien .....	46
3.1.4	Marker .....	47
3.1.5	Enzyme und Primer.....	47
3.1.6	Verbrauchsmaterial.....	48
3.1.7	Mikrotiterplatten .....	49
3.1.8	Lösungen.....	49
3.1.8.1	Zusammensetzung der Puffer-Lösungen	49
3.1.8.2	Zusammensetzung sonstiger Lösungen	50
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>51</b>
3.2.1	Herstellung von Borrelien-Nährmedium.....	51
3.2.2	Herstellung und Verwendung von Phenolrot (konzentriert) .....	52
3.2.3	Kultivierung von Borrelien.....	53
3.2.4	RFLP-Analyse der 5S-23S rRNA Intergenic Spacer DNA .....	53
3.2.4.1	Durchführung der 5S-23S PCR	53
3.2.4.2	Herstellung der Agarose-Gele, Probenvorbereitung und Durchführung der Gelelektrophorese	54
3.2.4.3	Restriktionsanalyse der 5S-23S PCR-Amplifikate	55
3.2.4.4	Herstellung der Polyacrylamidgele für die RFLP-Analyse	56
3.2.4.5	Probenvorbereitung und Restriktionsanalyse	56
3.2.5	Sequenzierung und Alignment der 5S-23S Intergenic Spacer DNA.....	57
3.2.6	Plasmidprofil-Analyse mittels PFGE.....	58
3.2.6.1	Plasmidisolierung	58
3.2.6.2	Herstellung von Agarose-Gelen und Probenvorbereitung	59
3.2.6.3	PFGE und Plasmidprofilanalyse	60
3.2.7	Qualitätskontrolle mit <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213.....	60
3.2.8	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) .....	61
3.2.9	Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) .....	63
3.2.10	Durchführung von Abtötungskinetiken .....	64
3.2.11	Statistische Analyse .....	65
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>67</b>
<b>4.1</b>	<b>Genetische Charakterisierung der Isolate</b> .....	<b>67</b>
4.1.1	5S-23S PCR .....	67

---

4.1.2	RFLP-Analyse der 5S-23S Intergenic Spacer Region .....	67
4.1.3	Phylogenetischer Stammbaum auf Basis der 5S-23S Intergenic Spacer-Sequenzen der untersuchten Stämme .....	69
4.1.4	Plasmidprofilanalyse mittels PFGE .....	71
4.2	Ergebnisse der Qualitätskontrolle mit <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	74
4.3	Standardisierte MHK-Bestimmung bei <i>B. burgdorferi</i> s.l. _____	75
4.3.1	MHK von Doxycyclin und Makroliden .....	78
4.3.2	MHK von $\beta$ -Lactam-Antibiotika.....	80
4.3.3	MHK von Chinolonen .....	83
4.4	Standardisierte MBK-Bestimmung bei <i>B. burgdorferi</i> s.l. _____	84
4.4.1	MBK von Doxycyclin und Makroliden.....	85
4.4.2	MBK von $\beta$ -Lactam-Antibiotika .....	88
4.4.3	MBK von Chinolonen.....	90
4.5	Exemplarische Abtötungskinetiken für das <i>B. spielmanii</i> -Isolat PC Eq 17 _	91
5	Diskussion _____	97
5.1	Bedeutung von <i>B. spielmanii</i> als Erreger der Lyme Borreliose _____	97
5.2	Zur genetischen Charakterisierung der Isolate _____	99
5.3	Qualitätskontrolle mit <i>S. aureus</i> ATCC 29213 zur Untersuchung von Antibiotika-Medium-Interaktionen _____	103
5.4	<i>In vitro</i> Testung von <i>B. burgdorferi</i> s.l. gegen Antibiotika und Chemotherapeutika _____	104
5.4.1	<i>In vitro</i> Testung von Doxycyclin .....	106
5.4.2	<i>In vitro</i> Testung von Penicillin .....	107
5.4.3	<i>In vitro</i> Testung von Amoxicillin .....	109
5.4.4	<i>In vitro</i> Testung von Cefuroxim .....	110
5.4.5	<i>In vitro</i> Testung von Ceftriaxon .....	112
5.4.6	<i>In vitro</i> Testung von Erythromycin und Clarithromycin .....	113
5.4.7	<i>In vitro</i> Testung von Fluorchinolonen.....	114
5.5	Vergleichende Betrachtung des <i>in vitro</i> Empfindlichkeitsspektrums von <i>B. spielmanii</i> _____	115
5.6	Abtötungskinetiken _____	120
5.7	Mögliche Mechanismen von Erregerpersistenz und klinischem Therapieversagen _____	121
6	Zusammenfassung _____	125
7	Summary _____	127
8	Literaturverzeichnis _____	129
9	Anhang _____	144

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ACA	Acrodermatitis chronica atrophicans
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxidsulfat
<i>B.</i>	<i>Borrelia</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
BSK-Medium	Barbour-Stoenner-Kelly-Medium
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
cm	Zentimeter
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribosenucleotidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
G	Guanosin
h	Stunde
HCl	Salzsäure
<i>I.</i>	<i>Ixodes</i>
IFA	Immunfluoreszenz-Assay
IFT	Immunfluoreszenz-Test
IE	internationale Einheiten
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
kb	Kilobasen

---

KBE	Kolonie-bildende Einheiten
KGW	Körpergewicht
LB	Lyme Borreliose
LD	Lyme Disease
MBK	Minimale bakterizide Konzentration
ME	Mega-Einheiten bzw. $10^6$ internationale Einheiten
mg	Milligramm
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MLSA	Multilocus-Sequenzanalyse
min	Minute
mM	Millimol
NaOH	Natriumhydroxid
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NEB	NE-Buffer
nm	Nanometer
NSAIDs	Nichtsteroidale Antiphlogistika
Osp	Outer Surface Protein
PBS	phosphate buffer saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
p.i.	post infectionem
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SPF	spezifisch-pathogenfrei
TE	Tris-EDTA
TES	Tris-EDTA-Saccharose
TEMED	Tetramethyldiamin
TES	<i>N</i> -Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethansulfonsäure
T	Thymidin
p.o.	per os
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute

## Abkürzungsverzeichnis

---

RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
s.l.	sensu lato
s.s.	sensu stricto
U/min	Umdrehungen pro Minute
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
V	Volt
WDDH	whole DNA-DNA-Hybridization
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1 Einleitung

Das Schraubenbakterium *Borrelia burgdorferi* ist der Erreger der Lyme Borreliose (LB) bei Mensch und Tier [Burgdorfer 1982]. Diese Zoonose hat als typische Naturherdinfektion ihr Reservoir in Wildtieren und wird durch Zecken der Gattung *Ixodes* von einem Wirbeltier auf das nächste übertragen [Anderson 1989].

Zum *B. burgdorferi* sensu lato (s.l.)-Komplex gehören weltweit mindestens 12 Genospezies.

Nachweise für die Humanpathogenität lagen jedoch bisher nur für die Genospezies *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.), *B. garinii* und *B. afzelii* vor. Erst vor kurzem konnte auch das humanpathogene Potential von *B. spielmanii* nachgewiesen werden [Richter 2004b, Wang 1999a].

Die Lyme Borreliose gilt heute als häufigste von Zecken übertragene Erkrankung in der nördlichen Hemisphäre und verursacht durch ihre direkten und indirekten Folgen jedes Jahr enorme Kosten für das Gesundheitssystem [Maes 1998, Zhang 2006]. Darüber hinaus kann die Erkrankung sowohl unbehandelt als gelegentlich auch unter adäquater antibiotischer Therapie einen chronischen Verlauf nehmen und stellt damit für die Betroffenen eine erhebliche Beeinträchtigung ihrer Lebensqualität dar.

Das Wissen über Pathogenese und Immunevasion des Erregers ist nach wie vor lückenhaft, was die Entwicklung von diagnostischen Tests und Abwehrstrategien gegen den Erreger erheblich erschwert. Problematisch in diesem Zusammenhang ist auch die Heterogenität des Erregers [Ohnishi 2001].

Zwar kann das Infektionsrisiko durch verschiedene Maßnahmen wie regelmäßige Kontrolle des Körpers auf Zecken oder generelle Meidung der Vektoren gesenkt werden, ein zuverlässiger Schutz vor Infektionen mit *B. burgdorferi* existiert jedoch derzeit noch nicht [O'Connell 1996]. Auch die Entwicklung und Anwendung verschiedener Impfstoffe brachte bisher noch keine durchschlagenden Erfolge.

Da Prophylaxe, Diagnostik und Therapie dieser Erkrankung noch immer mit erheblichen Problemen behaftet sind, ist es wichtig, auch weiterhin an der Entwicklung und Erforschung neuer Therapiekonzepte zur Bekämpfung der Lyme Borreliose zu arbeiten.

Da es sich bei *B. burgdorferi* um einen bakteriellen Erreger handelt, kommt in der Therapie der Lyme Borreliose selbstverständlich den antibiotischen Substanzen die größte Bedeutung zu.

---

Für die in Zusammenhang mit dieser Erkrankung auftretenden Phänomene der Erregerpersistenz und des Therapieversagens sowie für das Auftreten von Spätfolgen und Rezidiven nach initial erfolgreicher Therapie gibt es verschiedene Erklärungen, von denen bisher keine hinreichend bewiesen werden konnte.

Eine mögliche Ursache wäre, dass der Erreger sich durch erworbene Resistenzen vor antibiotischen Substanzen schützen kann [Jackson 2007, Ruzic-Sabljić 2005]. Eine weitere Theorie besagt, dass *B. burgdorferi* das Phänomen der phänotypischen Persistenz zeigt, d.h. also durch eine Veränderung des Phänotyps die Wirtsabwehr und die bakterizide Wirkung chemischer Substanzen umgehen kann [Brorson 1998a, 1997]. Auch denkbar wäre, dass durch die individuelle Stoffwechselsituation bei einzelnen Patienten eventuell keine ausreichend hohen Wirkstoffspiegel erreicht werden können, um den Erreger zuverlässig zu hemmen oder abzutöten [Hunfeld 2006b].

Darüber hinaus geht man davon aus, dass zumindest ein Teil der auftretenden Spätfolgen nicht durch den Erreger selbst, sondern durch autoimmune Mechanismen verursacht wird [Raveche 2005, Steere 2001]. Darüber hinaus gibt es eine Reihe von Erkrankungen, deren Ausprägungen nicht eindeutig von späten Stadien der Lyme Borreliose zu unterscheiden sind und daher als Lyme Borreliose fehldiagnostiziert werden können [Drozdowski 2006, Seidel 2007].

Ansatzpunkt dieser Untersuchungen ist die Überlegung, dass möglicherweise die unterschiedliche Antibiotikaempfindlichkeit einzelner Isolate oder sogar ganzer Genospezies verantwortlich für das Versagen einer Therapie sein könnte. Da ein direkter Erregernachweis durch Kultur oder mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion) und damit auch die Identifikation der Genospezies oft schwierig, aufwändig und in späten Stadien der Erkrankung oder im Anschluss an eine antibiotische Behandlung häufig sogar unmöglich ist, richtet sich die Wahl der Therapie ausschließlich nach dem Stadium der Erkrankung und der individuellen Situation des Patienten.

*In vitro* Untersuchungen über die antibiotische Empfindlichkeit der humanpathogenen Genospezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii* haben gezeigt, dass es zum Teil signifikante Unterschiede zwischen den Genospezies bezüglich ihres Ansprechens auf Antibiotika gibt [Baradaran-Dilmaghani 1996, Henneberg 2002, Hunfeld 2000b, Sicklinger 2003]. Diese Unterschiede erscheinen jedoch nicht groß genug, um klinisch relevant zu sein. Da für die erst kürzlich entdeckte und als humanpathogen identifizierte Genospezies *B. spielmanii* noch keinerlei Daten bezüglich ihrer *in vitro* oder gar *in vivo* Empfindlichkeit gegen Antibiotika vorliegen, wäre es durchaus denkbar, dass *B.*

*spielmanii*-Isolate auf Grund eines abweichenden Ansprechens auf antibiotische Substanzen zumindest in manchen Fällen Ursache für das Auftreten von Therapieversagen, Rezidiven oder Spätfolgen sein könnten.

Deshalb war das Ziel der vorliegenden Untersuchungen, das antibiotische Empfindlichkeitsspektrum der Genospezies *B. spielmanii* im Vergleich zu den übrigen humanpathogenen Genospezies näher zu charakterisieren, um eine genospeziesspezifisch erhöhte oder erniedrigte Empfindlichkeit gegen therapierelevante Antibiotika zu bestätigen oder auszuschließen. Zusätzlich sollten zudem durch molekulargenetische Methoden die getesteten Isolate genotypisch charakterisiert werden.



## 2 Themenbezogene Literaturübersicht

### 2.1 Zur Erkrankung der Lyme Borreliose bei Mensch und Tier

#### 2.1.1 Geschichte

Die Lyme Disease (LD) wurde nach der Stadt Lyme im Bundesstaat Connecticut (USA) benannt. Dort traten in den 70er Jahren bei Jugendlichen gehäuft Arthritiden auf, die zunächst als juvenile rheumatoide Arthritis diagnostiziert wurden. Ein Viertel der Patienten berichtete vom Auftreten eines Erythems, bevor die Gelenksbeschwerden begannen. Da die Fälle besonders im Sommer und Frühherbst auftraten, wurde frühzeitig eine Infektion als Ursache vermutet, bei der der Erreger durch Arthropoden übertragen wird [Steere 1977a, Steere 1977b]. Weiterhin lag die Vermutung nahe, dass der Erreger der LD bakterieller Natur sein musste, weil durch antibiotische Behandlung eine Verbesserung der Symptome erzielt werden konnte [Steere 1980].

Im Jahr 1982 identifizierte der Schweizer *Willy Burgdorfer* schließlich Spirochäten in Zecken der Spezies *I. damini* als Ursache der LD, die später den Namen *Borrelia burgdorferi* erhielten [Burgdorfer 1982]. Seither ist diese Erkrankung auch unter dem Namen Lyme Borreliose bekannt.

Schnell wurde klar, dass die Verbreitung dieser Erkrankung sich nicht allein auf Connecticut beschränkte, sondern vielmehr korrelierend mit dem Auftreten der Vektoren in zahlreichen Bundesstaaten der USA sowie auch in Europa und Asien auftrat.

Heute gilt die Lyme Borreliose als die häufigste durch Zecken übertragene Erkrankung der nördlichen Hemisphäre. Man weiß inzwischen, dass diese klassische bakterielle Zoonose nicht allein beim Menschen vorkommt, sondern auch bei verschiedenen Haussäugetieren von Bedeutung ist. Ihrer durch verschiedenste Faktoren bedingten zunehmenden Verbreitung wegen wird die Lyme Borreliose heute darüber hinaus zu den so genannten „emerging bacterial zoonoses“ gerechnet [Higgins 2004].

#### 2.1.2 Erreger

Erreger der Borreliose bei Mensch und Tier sind Schraubenbakterien des *B. burgdorferi* s.l.-Komplexes. Die Gattung *Borrelia* aus der Familie der Spirochaetaceae umfasst mindestens 12 Genospezies, von denen derzeit die Genospezies *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii*, *B. afzelii* und seit kurzer Zeit auch *B. spielmanii* nachweislich als humanpathogen gelten [Richter 2004b, Wang 1999a]. Für die Genospezies *B. bissettii*, *B. valaisiana* und *B. lusitaniae* wird ebenfalls ein Zusammenhang mit der Entstehung

---

einer Borreliose beim Menschen vermutet. Dies konnte jedoch noch nicht endgültig bewiesen werden [Collares-Pereira 2004, Diza 2004, Picken 1996, Rijpkema 1997, Strle 1997].

Bei Borrelien handelt es sich um 0,2-0,5 µm breite und 3-20 µm lange schraubenförmig gewundene Bakterien. Sie besitzen 7-30 periplasmatische Endoflagellen, die an den Enden der Bakterienzelle entspringen und sich in 3-10 lockeren Windungen um die Zelle winden. Darüber hinaus besitzen sie als Träger der Erbinformation neben einem linear angeordneten Chromosom auch lineare und zirkuläre Plasmide [Rolle 2002].

Borrelien sind sehr anspruchsvolle Bakterien, die unter mikroaerophilen Bedingungen wachsen und komplexe Nährmedien benötigen. Die optimale Wachstumstemperatur für Borrelien beträgt 33 °C [Heroldova 1998]. Die durchschnittliche Generationszeit beträgt in der exponentiellen Phase des Wachstums 10-12 h, womit Borrelien zu den langsam wachsenden Bakterien zählen. Unter weniger optimalen Bedingungen kann die Generationszeit durchaus auch wesentlich länger sein [Barbour 1986, Pollack 1993].

### **2.1.3 Epidemiologie**

#### **2.1.3.1 Verbreitung**

Die Lyme Borreliose ist in Amerika, Europa und Asien weit verbreitet. Die genaue Inzidenz der Erkrankung ist jedoch schwer festzustellen, da die Dunkelziffer auf Grund von Fehldiagnosen und einem in vielen europäischen Ländern mangelhaften Meldesystem nach wie vor hoch ist.

Die jährliche Inzidenz in Europa wird zwischen 3,9 und 137/100.000 Einwohner geschätzt [O'Connell 1998, Stanek 1996]. Laut Berichten der World Health Organisation (WHO) liegen Slowenien und Österreich mit 120 bzw. 130 Fällen pro 100.000 Einwohner an der Spitze der Statistik [WHO/CDS/VPH 1995]. In Slowenien wird die Borreliose-Inzidenz für das Jahr 2002 sogar mit 168/100.000 Einwohner angegeben (National Notifiable Communicable Diseases Surveillance System, Slovenia, unveröffentlichte Daten). In diesem Land ist die Lyme Borreliose bereits seit 15 Jahren meldepflichtig.

In den USA wird die Inzidenz für das Jahr 2005 durch die CDC (Centers for Disease Control and Prevention) mit 7,86/100.000 Einwohner angegeben, wobei in Staaten wie Connecticut oder Delaware sogar eine Inzidenz von 51,56 bzw. von 76,58/100.000 Einwohner vorlag. Pro Jahr werden in den USA insgesamt rund 20.000 Fälle von Lyme

---

Borreliose gemeldet, wobei auch hier die tatsächliche Inzidenz wesentlich höher liegen dürfte [CDC 2007].

In Deutschland gehört die Lyme Borreliose nicht zu den generell meldepflichtigen Erkrankungen. Es gibt jedoch seit einigen Jahren in den östlichen Bundesländern (Berlin, Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen, Sachsen-Anhalt) ein Meldesystem auf Länderebene, wodurch für diese Bundesländer genauere Zahlen vorliegen. Hiernach liegt die Zahl der gemeldeten Fälle in den 6 östlichen Bundesländern in den Jahren 2002-2006 bei 23.170, während die jährliche Inzidenz mit 27,5/100.000 Einwohner angegeben wird. Dabei gibt es starke Schwankungen zwischen den einzelnen Bundesländern [RKI 2007]. Insgesamt wird die Zahl der Neuerkrankungen in Deutschland pro Jahr auf 60.000 - 100.000 Fälle geschätzt [Wilske 2005].

Auch die Verteilung und Häufigkeit der Genospezies in den Vektorzecken unterliegt geographischen bzw. regionalen Schwankungen. So wird in den USA ausschließlich die Genospezies *B. burgdorferi* s.s. als Erreger der humanen und caninen Lyme Borreliose gefunden [Marti Ras 1997]. In Europa hingegen ist *B. garinii* die häufigste humanpathogene Genospezies, gefolgt von *B. afzelii* [Saint Girons 1998, Wilske 1996]. In Deutschland gilt *B. afzelii* als die vorherrschende Genospezies [Franke 2008, Maetzel 2005, Schaarschmidt 2001]. Fingerle et al. fanden in ihren Untersuchungen jedoch mit 34,3 % eine leichte Dominanz von *B. garinii* gegenüber *B. afzelii* mit 25,1 % [Fingerle 2008]. *B. spielmanii* weist keine flächendeckende, sondern eine eher regionale bzw. lokale Verbreitung auf und ist damit bezogen auf Europa die seltenste Spezies. In endemischen Gebieten sind jedoch bis zu 20 % der Borrelien-positiven Zecken Träger dieser Genospezies. Der als Hauptwirt für *B. spielmanii* geltende Gartenschläfer (*Eliomus quercinus*) ist in diesen Gebieten zu nahezu 100 % infiziert [Richter 2004b].

Auch serologische Untersuchungen bei Hunden zeigen eine weitreichende Verbreitung der Infektion in Europa, wobei die Seroprävalenz regional stark schwanken kann.

Es fehlen jedoch, wie auch beim Menschen, umfassende aktuelle Studien zur Seroprävalenz von *B. burgdorferi* und zum Vorkommen der Lyme Borreliose beim Hund in Deutschland. Untersuchungen aus der Slowakei zeigen, dass bei Jagdhunden die Seroprävalenz mit 40 % deutlich höher ist als bei anderen Gebrauchshunden mit 12 %. Bei niederländischen Jagdhunden soll die Seroprävalenz bei 18 % liegen [Goossens 2001] und in Berlin zeigte eine Studie eine Seroprävalenz von 10 % [Kasbohrer 1990]. Einer aktuellen Untersuchung aus der Schweiz entsprechend haben 58 % der Berner

Sennenhunde Antikörper gegen *B. burgdorferi*, wohingegen bei anderen Rassen nur zu 12 % Antikörper gefunden werden konnten [Gerber 2007]. Auch andere Autoren berichten von einer deutlichen Überrepräsentation der Berner Sennenhunde im Patientenkollektiv [Hovius 2007].

### 2.1.3.2 Vektoren

Die Borreliose wird übertragen von Zecken der Gattung *Ixodes*. Alleiniger Vektor in Mitteleuropa ist *I. ricinus* („gemeiner Holzbock“), weiter östlich steht die Zeckenart *I. persulcatus* im Vordergrund. In Nord-, Nordost-, und Zentralamerika findet man vor allem *I. scapularis* („deer tick“, „black-legged tick“) und an der Pazifikküste ist als Hauptvektor *I. pacificus* („western black-legged tick“) zu nennen [Anderson 1989, Burgdorfer 1985, Gray 2002a, Korenberg 1987].

Der Lebenszyklus von *I. ricinus* umfasst 4 Entwicklungsstadien (Ei, Larve, Nymphe, Adultus). Als typische 3-wirtige Zecke benötigt der „gemeine Holzbock“ auf jeder Stufe der Entwicklung einen neuen Wirt, von dem er nach dem Saugakt abfällt, um sich am Boden zu häuten und dann einen anderen Wirt aufzusuchen. Dabei werden die Borrelien durch die Zecke von Wirbeltier zu Wirbeltier übertragen. Da eine transovariable Übertragung von *B. burgdorferi* nur selten stattfindet, sind die Larven primär nicht infektiös. Sie können sich aber beim Saugakt selber infizieren und später als Nymphe und Adultus die Infektion weitergeben [Gray 2002b, Nefedova 2004].

*I. ricinus* überträgt als weiteren bakteriellen Erreger neben *B. burgdorferi* auch *Anaplasma phagocytophilum*, das Virus der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) sowie die den Protozoen zugehörigen Babesien auf Mensch und Tier [Swanson 2006]. In näherer Vergangenheit hat sich als Resultat der globalen Erwärmung, des damit verbundenen Klimawandels und der Veränderung der Umwelt durch den Menschen das Verbreitungsgebiet der Zeckenpopulation sowie die Häufigkeit ihres Auftretens ständig vergrößert, womit auch den durch diese Zecken übertragenen Krankheiten zunehmende Bedeutung zukommt [Gray 2002b].

### 2.1.3.3 Reservoir und Wirte

#### 2.1.3.3.1 Reservoir und Wirte des *B. burgdorferi* s.l.-Komplexes

Als Reservoir dienen den Spirochäten eine Vielzahl verschiedener Vertebraten, wobei die einzelnen Genospezies verschiedene Wirte zu bevorzugen scheinen. So nimmt man derzeit an, dass die Genospezies *B. afzelii* an Nager adaptiert ist, wohingegen *B. garinii*

und *B. valaisiana* häufiger in Vögeln gefunden werden. Für die neu entdeckte Genospezies *B. spielmanii* wurde als Reservoirwirt der Gartenschläfer identifiziert. Trotz der Adaptation der einzelnen Genospezies an bestimmte Reservoirwirte finden sich jedoch auch gemeinsame Wirte, und Mehrfachinfektionen mit verschiedenen Genospezies sind keine Seltenheit [Richter 2004a].

Als Wirte fand man bisher bereits 9 kleine und 7 mittlere Säugerspezies sowie 16 Vogelarten [Gern 1998].

Besondere Bedeutung kommen hierbei in Zentraleuropa, nicht zuletzt auch wegen der Häufigkeit ihres Auftretens, der Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*) und der Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*) zu [Matuschka 1992]. Ein weiterer wichtiger Reservoirwirt ist der Siebenschläfer (*Glis glis*), der zwar insgesamt seltener ist, aber auf Grund seiner längeren Lebensdauer eine große Anzahl von Zecken infizieren und somit die Infektion verbreiten kann [Matuschka 1994]. Daneben können auch Igel (*Erinaceus europaeus*), Haselmaus (*Muscardinus avellanarius*), Weissfußmaus (*Peromyscus leucopus*), Hausspitzmaus (*Crocidura russula*) und viele weitere Nagetiere Wirte für Borrelien sein.

Gegenüber den Nagetieren scheinen wilde Huftiere eher eine untergeordnete Rolle als Reservoir für Borrelien zu spielen [Gern 1998]. Zwar sind sie in hohem Maße mit der Zecke *I. ricinus* befallen und tragen damit zu deren Verbreitung und Vermehrung bei, jedoch zeigen neuere Untersuchungen, dass Borrelien in Hufwild zumeist nicht persistieren können. Beim Saugakt an Rotwild (*Cervus elaphus*) soll es sogar zur Abtötung der in der Zecke befindlichen Borrelien und damit zu einer Reduktion der Infektion kommen [Wodecka 2007].

#### **2.1.3.3.2 Reservoir und Wirte von *B. spielmanii***

Bereits 1999, also noch vor der Beschreibung von *B. spielmanii* als vierte Borrelien-Genospezies mit humanpathogenem Potential, erkannten Matuschka et al. die hohe Kompetenz des Gartenschläfers für die Übertragung von Spirochäteninfektionen [Matuschka 1999].

Der Gartenschläfer ist ein Kleinsäuger aus der Familie der Bilche (Gliridae), dessen Verbreitung von Südeuropa bis Zentraleuropa und östlich bis zum Ural reicht. Auch auf Sardinien und Sizilien existieren Unterarten des Gartenschläfers [Niethammer 1987]. In Deutschland findet man den Gartenschläfer zahlreich in den Alpen, im Bayrischen Wald

und im Erzgebirge. In Norddeutschland werden nur selten Einzelexemplare angetroffen, die dort jedoch keine reproduktionsfähige Population bilden.

Das bevorzugte Habitat dieses Nagers sind feuchte Wälder, häufig ist er aber auch in Obstanbaugebieten zu finden. Wichtig für das Auftreten dieses Tieres ist das Vorhandensein von Versteckmöglichkeiten, wie sie etwa Mauern oder dichte Vegetation bieten. Auf Grund dieser speziellen Ansprüche ist die Verbreitung des Gartenschläfers begrenzter als die anderer Nagetiere [Richter 2004a, Vaterlaus 1998]. Trotz des begrenzten Auftretens kommt dem Gartenschläfer jedoch eine enorm wichtige Rolle in der Verbreitung der Lyme Borreliose zu. Nach Studien von Matuschka et al. sollen diese Nager 5-7 mal häufiger Infektionen auf die Vektorpopulation übertragen, als Mäuse dies tun. Gründe hierfür werden gesehen in der signifikant höheren Dichte der Nymphenbesiedlung, der Präferenz für einen stark mit Zecken besiedelten Lebensraum (feuchte Wälder, dichte Vegetation) und der im Vergleich zu Mäusen deutlich längeren Lebensspanne, auf Grund derer die Infektion an eine hohe Zahl von Zecken weitergegeben werden kann. Ein weiterer Faktor ist die Kongruenz der Aktivitätsphasen und des Lebenszyklus des Gartenschläfers mit der Phase der höchsten Infektiosität der Zeckenpopulation. Darüber hinaus konnten Matuschka et al. feststellen, dass infizierte Gartenschläfer mindestens doppelt so häufig Borrelien auf saugende Zecken übertragen wie infizierte Mäuse und damit eine höhere Kompetenz als Reservoir für Spirochäten besitzen [Matuschka 1999].

Im Jahr 2004 wiesen Richter et al. nach, dass das Hauptreservoir von *B. spielmanii* im Gartenschläfer zu finden ist. Sie untersuchten Zecken und verschiedene in Fallen gefangene Kleinnager in mehreren Regionen in Deutschland und Frankreich und stellten fest, dass in einzelnen Gebieten bis zu 75 % der Gartenschläfer mit *B. spielmanii* infiziert waren. Auch konnten sie die Persistenz dieser Spirochäten im Gartenschläfer und dessen hohe Infektionskompetenz für saugende Vektoren nachweisen. Da zudem der Gartenschläfer in allen Regionen vorkam, in denen bisher Borrelien des Typs A14S, sprich Vertreter der Genospezies *B. spielmanii*, gefunden werden konnten, galt das Hauptreservoir für *B. spielmanii* als identifiziert.

Nur in Einzelfällen konnte diese Genospezies bisher bei anderen Säugern wie etwa bei der Haselmaus oder dem Igel nachgewiesen werden [Richter 2004a, Skuballa 2007].

#### 2.1.4 Pathogenese

Borrelien benötigen wie oben bereits erwähnt einen Vektor, um infektiös für Säugetiere zu werden. Eine direkte Übertragung von Wirbeltier zu Wirbeltier, etwa von Hund zu Mensch über Speichel, Blut oder Urin, ist auf natürlichem Weg nicht möglich. Jedoch konnte in Experimenten mit Mäusen die Übertragbarkeit von *B. burgdorferi* mittels Bluttransfusion gezeigt werden [Gabitzsch 2006]. Beim Menschen ist eine derartige Übertragung bisher weder unter natürlichen noch unter experimentellen Bedingungen beschrieben worden.

Die Übertragung der Mikroorganismen von der Zecke auf den Wirt beginnt circa 24 bis 48 h nach der Anheftung der Zecke. Innerhalb dieser Zeit vermehren sich die Borrelien im Avertebraten, gelangen dann über das Darmepithel in die Hämolymphe, verteilen sich in den Speicheldrüsen und infizieren schließlich den Wirt über den Zeckenspeichel [de Silva 1995].

Dabei exprimiert *B. burgdorferi* in der Zecke andere Antigene als dies im Wirbeltier der Fall ist. Im Darm der Zecke kommt vermehrt OspA zur Expression, während das Antigen OspC einer Down-Regulation unterliegt. Nach einer Blutmahlzeit kehrt dieser Prozess sich ins Gegenteil um, und es kommt zu einer vermehrten Expression von OspC im Vertebraten [de Silva 1995, de Silva 1997, Pal 2000].

Am Ort des Zeckenbisses replizieren sich die Borrelien nun im Wirbeltier unter optimalen Temperaturen weiter und migrieren von dort aus weiter durch das Gewebe. Innerhalb einiger Wochen können sie sich in verschiedensten Geweben ausbreiten und auch nahe gelegene Gelenke besiedeln. Die Manifestation von Symptomen findet sich in der Frühphase der Infektion vor allem in Organen (Haut, Gelenke, Lymphknoten), die dem Zeckenbiss nahe gelegen sind, was die Annahme unterstreicht, dass Borrelien sich eher über Migration durch die Gewebe ausbreiten, als hämatogen im Körper zu disseminieren.

Weiter entfernt liegende Gelenke erkranken erst später, wenn die migrierende Borrelien die Synovia erreichen, sich hinreichend vermehrt haben und beginnen, mit den Wirtszellen in Wechselwirkung zu treten [Straubinger 1997a].

Borrelien sind im Körper vorwiegend extrazellulär aufzufinden. Vereinzelt wird von einem intrazellulären Auftreten in Synovialzellen und Bindegewebsfibroblasten bei an Lyme-Arthritis erkrankten Patienten berichtet [Chary-Valckenaere 1998]. Nach experimenteller Infektion ließen sich Borrelien auch intrazellulär in Zellkulturen aus

Endothelzellen, Hautfibroblasten und Synovialzellen nachweisen [Comstock 1991, Girschick 1996, Klempner 1993].

Die Interaktion der Borrelien mit den Wirtszellen im Verlaufe der Infektion führt zu einer Hochregulation und Ausschüttung von Immundefaktoren wie etwa proinflammatorischen Zytokinen. Neben dem Chemokin Interleukin 8 (IL-8), welches ein potenter chemotaktischer Faktor für polymorphkernige Neutrophile (PMNs) ist, können auch IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  vermehrt in der Synovialmembran von experimentell mit *B. burgdorferi* infizierten Hunden nachgewiesen werden [Straubinger 1997a, Straubinger 1998].

Straubinger et al. vermuten, dass vom Wirtsorganismus lokal produzierte Faktoren in den Gelenken sowie in Perikard und ZNS akkumulieren und dort die Migration von Leukozyten in das Gewebe und die betroffenen Körperhöhlen provozieren. Gleichzeitig treten auch vermehrt hemmende Faktoren wie etwa das IL-10 auf. Diese hemmenden Faktoren wirken der Produktion und Ausschüttung von proinflammatorischen Substanzen entgegen und begrenzen damit das Ausmaß der Entzündung.

Die Migration von *B. burgdorferi* sowie die Interaktion mit den Wirtszellen, welche sich in einem Wechselspiel der Produktion von inflammatorischen und antiinflammatorischen Faktoren äußert, könnte der Grund für das intermittierende Auftreten der Arthritis im Verlauf der Erkrankung sein [Straubinger 2000a].

Nicht alle infizierten Individuen entwickeln Symptome. Die Gründe für dieses Phänomen sind bisher nicht hinreichend bekannt. Es wird jedoch angenommen, dass die Anzahl der im Gewebe befindlichen Organismen von Individuum zu Individuum schwankt, und dass große Mengen von Spirochäten notwendig sind, um eine klinisch erfassbare Reaktion im Körper hervorzurufen [Yang 1994].

Auch die Mitbeteiligung einer genetischen Komponente des Wirtes bei der Entstehung der Lyme Borreliose und der Schwere und Ausprägung der Symptome wird diskutiert [Steere 1990]. Neuere Untersuchungen über die Infektionshäufigkeit verschiedener Hunderassen mit Borrelien gehen gar davon aus, dass der Berner Sennenhund eine rassespezifisch erhöhte Empfänglichkeit für die Infektion mit Borrelien besitzt [Hovius 2007].

Schon seit längerem ist bekannt, dass ein Zusammenhang zwischen der Genospezies und der Art bzw. dem Ort der klinischen Manifestation besteht [van Dam 1993]. So konnten Untersuchungen zeigen, dass die Genospezies *B. afzelii* zumeist jedoch nicht ausschließlich für die Entstehung der Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA)

---

verantwortlich ist [Picken 1998]. Die vorwiegende klinische Manifestation von *B. burgdorferi* s.s. ist dahingegen die Lyme-Arthritis, und *B. garinii* wird in 60-70 % der Fälle als Ursache der Neuroborreliose identifiziert [Lunemann 2001, Saint Girons 1998, Wilske 1996].

Bei Menschen wie auch bei Hunden kann *B. burgdorferi* zu persistenten Infektionen führen [Johnson 1984, Preac-Mursic 1989, Straubinger 1997b]. Ein wichtiger Mechanismus um das Immunsystem des Wirtes zu umgehen ist für extrazelluläre Organismen die Produktion einer Vielfalt von Oberflächenproteinen. Auch Borrelien nutzen diese Strategie, um der Immunantwort im Körper des Vertebratenwirtes zu entgehen. Besondere Wichtigkeit besitzen hier das Lipoprotein VlsE [Lawrenz 1999, Zhang 1997] sowie auch das Outer Surface Protein E (OspE) [Sung 2000].

Darüber hinaus besitzen manche Borrelien die Fähigkeit, durch Bindung der Komplementfaktoren Faktor H und FHL-1 der komplementvermittelten Lyse zu entgehen. Dieser als Serumresistenz bezeichnete Mechanismus scheint eine entscheidende Rolle bei der Immunevasion des Erregers zu spielen. Untersuchungen konnten zeigen, dass Isolate der Genospezies *B. spielmanii* und *B. afzelii* zumeist serumresistent sind, während *B. garinii* als nicht serumresistent gilt und *B. burgdorferi* s.s. in Hinblick auf dieses Phänomen ein intermediäres Verhalten zeigt [Herzberger 2007, Kraiczy 2000a].

Studien von Straubinger et. al konnten abgesehen hiervon zeigen, dass die Anzahl der Borrelien in Hautbiopsien während einer Borrelien-Infektion im Verlauf der Zeit abnimmt und am niedrigsten ist, wenn keine klinischen Symptome zu beobachten sind [Straubinger 2000b]. Diese Tatsache erschwert die Identifikation von Borrelien insbesondere in Fällen, in denen keine typischen klinischen Anzeichen vorhanden sind.

### **2.1.5 Klinik beim Menschen**

Die klinischen Erscheinungen der Lyme Borreliose beim Menschen werden in 3 Stadien unterteilt.

Das Stadium I (Lokalinfektion) ist charakterisiert durch das so genannte Erythema migrans („Wanderröte“, EM), das bei 70-90 % der Infizierten auftritt [Gerber 1996]. Diese typische Hautveränderung, die an der Stelle des Zeckenbisses als ca. faustgroße Rötung beginnt und sich zentrifugal häufig in Form eines Ringes oder Doppelringes ausbreitet, entsteht zumeist einige Tage bis Wochen nach dem Zeckenbiss und wird im

Verlauf der Erkrankung häufig von Allgemeinsymptomen wie Fieber, Myalgien, Kopfschmerzen, Müdigkeit und Lymphknotenschwellung begleitet.

Wochen oder gar Monate nach dem Zeckenbiss kann die Erkrankung in das Stadium II (frühe disseminierte Infektion) übergehen, welches durch das Auftreten der lymphozytären Meningoradiculitis Bannwarth (Garin-Bujadoux-Bannwarth-Syndrom) charakterisiert ist. Häufig tritt im Stadium II auch eine Fazialisparese auf.

Im Stadium III (chronische Organmanifestation), welches sich Monate bis Jahre später manifestieren kann, kommt es zu Arthritiden und der sogenannten Acrodermatitis chronica atrophicans Herxheimer. Auch chronische Enzephalomyelitiden können als Spätfolgen auftreten [Rolle 2002].

## **2.1.6 Klinik beim Tier**

### **2.1.6.1 Allgemeines**

Das Auftreten und die Auswirkungen von Infektionen mit *B. burgdorferi* beim Tier sind weit weniger gut untersucht, als dies beim Menschen der Fall ist.

Schon seit langem ist bekannt, dass eine Vielzahl von Wildtieren (im Besonderen Vögel und Nager) als Reservoirwirte für Borrelien dienen. Häufig zeigen diese Tiere sich seropositiv bezüglich Antikörpern gegen *B. burgdorferi*. Diese Seropositivität scheint jedoch bei den Reservoirwirten ohne pathophysiologische Bedeutung zu sein.

Bei domestizierten Haustieren kommen hingegen klinische Erkrankungen durchaus vor. Bereits 1982 konnte Burgdorfer zeigen, dass mit Borrelien infizierte Zecken lang anhaltende Hautläsionen bei Hasen der Rasse „Weiße Neuseeländer“ verursachten, die 10-12 Wochen nach dem Zeckenbiss auftraten [Burgdorfer 1982]. Beweise für symptomatische Verläufe liegen derzeit für Hund, Pferd und Rind vor [Chang 2001, Chang 2000, Gall 2006, Kornblatt 1985, Lengauer 2006, Lischer 2000, Skotarczak 2002, Stefancikova 2002].

Ob auch andere Haussäuger oder Zootiere an Lyme Borreliose erkranken können, ist nach wie vor unklar.

### **2.1.6.2 Lyme Borreliose beim Hund**

Beim Hund äußert sich die Erkrankung typischerweise durch rezidivierende Lahmheiten auf Grund von akuter oder subakuter Arthritis und Phasen von Leistungsschwäche oft kombiniert mit Fieber [Appel 1993, Chang 2001, Straubinger 1997a]. Auch Niereninsuffizienz, Veränderungen am Herzen (z.B. AV-Block) und sogar

Fazialispareesen bzw. Neuroborreliose können beobachtet werden [Azuma 1994, Chang 2001, Dambach 1997, Levy 1988].

Summers et al. infizierten 2005 insgesamt 62 Hunde experimentell mit *B. burgdorferi* und konnten feststellen, dass als vorwiegende klinische Manifestation rezidivierende Lahmheiten (bis zu 6 Episoden) mit Gelenkschwellung und Schmerzen insbesondere in Schulter- und Ellenbogengelenken auftraten. In der Sektion fanden sich eine Lymphadenopathie im Bereich des Zeckenbisses, exsudative und nicht-exsudative Entzündungen von Gelenkkapseln und Sehnen sowie in rund 20 % der Fälle eine Periarteriitis und eine Perineuritis, die in Analogie zu der beim Menschen auftretenden Mikroangiopathie bei Syphilis und Lyme Borreliose-Infektionen stehen. Rund 40 % der Hunde waren lediglich subklinisch infiziert, sie zeigten jedoch häufig mikroskopische Veränderungen an den Gelenken im Sinne einer Synovitis. Die Haut im Bereich des Zeckenbisses wies neben einer Hyperkeratose auch eine exsudative oder nicht-exsudative Dermatitis auf [Summers 2005].

Als seltene aber fatale Manifestation der Borreliose beim Hund ist die Lyme-Nephritis beschrieben [Dambach 1997]. Diesem Syndrom kommt jedoch vermutlich nicht durch die direkte Invasion der Nieren mit *Borrelia burgdorferi* zustande, sondern wird durch andere, bisher unbekannte Pathogenitätsmechanismen verursacht [Hutton 2008].

Insgesamt scheinen nach natürlicher Infektion klinische Erscheinungen nur in ca. 5 % der Fälle aufzutreten [Levy 1993]. Nach experimenteller Infektion sollen bis zu 75 % der Tiere klinische Symptome zeigen [Appel 1993, Straubinger 1997a].

### **2.1.6.3 Lyme Borreliose bei anderen Tierarten**

Es gibt zahlreiche Berichte über klinische Symptome bei Rindern, die in Zusammenhang mit Seropositivität bei den betroffenen Tieren auftraten. Dennoch gelang und gelingt auch in diesen Fällen nur vereinzelt die Bestätigung eines Kausalzusammenhangs durch einen direkten Erregernachweis. So konnten z.B. bei zwei Kühen aus der Schweiz mittels PCR aus der Milch und aus Synovialflüssigkeit DNA von *B. burgdorferi* s.s. und *B. afzelii* nachgewiesen werden. Diese Kühe waren durch erythematöse Hautläsionen am Euter, durch reduzierte Milchleistung und verringerten Appetit sowie durch schlechten Allgemeinzustand, steifen Gang und Gelenkschwellungen auffällig geworden [Lischer 2000]. Lengauer et al. untersuchten in der Weidesaison 2002 gesammelte Serumproben von 319 Rindern von 31 Bauernhöfen in Bayern und stellten hierbei eine Seroprävalenz für Borrelien-Antikörper von 45,6 %

fest. Dabei schwankte die Seroprävalenz auf die einzelnen Bestände bezogen zwischen 0 und 100 % [Lengauer 2006].

Auch beim Pferd ist die Seroprävalenz in Europa sehr hoch. In manchen Gebieten soll sie bei über 50 % und teils sogar bis zu 90 % liegen [Müller 2002, Stefancikova 2005]. Demgegenüber steht eine verschwindend geringe Anzahl klinisch auffälliger Pferde, deren Symptomatik nach Ausschluss anderer Ursachen und in Verbindung mit hohen Antikörpertitern eindeutig auf eine Borreliose-Erkrankung zurückzuführen ist [Butler 2005]. Als klinische Symptome werden von Tierärzten und Pferdebesitzern zumeist chronische Leistungsschwäche und orthopädische Probleme genannt. Diese führen dann in Zusammenhang mit positiven Antikörpertitern zur Diagnose Lyme Borreliose. Trotzdem bleibt umstritten, wie hoch die Inzidenz dieser Erkrankung in der Pferdepopulation tatsächlich ist. Auf Grund der diagnostischen Problematik und dem lückenhaften Wissen über die Auswirkungen von Borrelieninfektionen auf Equiden wird diese Erkrankung wahrscheinlich auf der einen Seite häufig übersehen, auf der anderen Seite jedoch auch gern überdiagnostiziert [Gall 2006].

Im Jahr 2000 konnte erstmals bewiesen werden, dass Pferde sich experimentell mit Borrelien infizieren lassen. 7 spezifisch-pathogenfreie (SPF) Ponies wurden mit Hilfe von Zecken mit Borrelien infiziert und zeigten anschließend eine Serokonversion als Reaktion auf den Erreger. Es ließen sich jedoch weder klinische noch signifikante histopathologische Veränderungen nachweisen [Chang 2000]. In einer folgenden Studie konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass sich aus Gewebeproben experimentell infizierter Ponies 5 Monate nach der Inokulation des Erregers über Zecken Borrelien anzüchten lassen [Chang 2005].

Bei Katzen werden häufig Antikörper gegen *B. burgdorferi* gefunden, doch konnte noch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen natürlicher Exposition und dem Auftreten einer klinischen Erkrankung nachgewiesen werden. Einer Untersuchung aus den USA zu Folge haben jedoch dort fast 50 % der Katzen Antikörper gegen *B. burgdorferi* [Magnarelli 2005]. Nur eine Studie berichtet über das Auftreten von Arthritis bei Katzen nach experimenteller Infektion und legt damit die Vermutung nahe, dass der Befall mit Borreliose-infizierten Zecken auch bei der Katze die Lyme Borreliose auszulösen vermag [Gibson 1995]. Demgegenüber stehen Untersuchungen von Burgess et. al, die nach experimenteller Infektion von 15 Katzen zwar eine Serokonversion und zum Teil das Auftreten von Borrelien im peripheren Blut beobachteten, jedoch keinerlei klinische Symptome nachweisen konnten [Burgess 1992].

Des Öfteren wurden auch bereits bei Schafen und Ziegen Antikörper gegen Borrelien gefunden. Es wurden in diesem Zusammenhang jedoch keine Symptome beobachtet, so dass davon auszugehen ist, dass Schafe und Ziegen inkompetente Wirte für diesen Erreger sind [Travnicek 2002]. Auch bei verschiedenen Zootieren konnten Antikörper ohne klinische Beschwerden gefunden werden [Stoebel 2003].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwar der Kontakt mit *B. burgdorferi* s.l. bei zahlreichen Haus- und Nutztieren häufig zu sein scheint, die Morbidität im Allgemeinen bei diesen Tieren mit Ausnahme des Hundes jedoch vermutlich gering ist.

## **2.1.7 Diagnostik**

### **2.1.7.1 Routinediagnostik in der Humanmedizin**

Die Diagnostik der Lyme Borreliose ist auf Grund der speziellen Eigenschaften des Erregers sowie der vielen offenen Fragen bezüglich der Pathogenese und des Verhaltens von Borrelien im Wirbeltier nach wie vor problembehaftet.

Die Diagnose Borreliose sollte nie allein auf Grund von Laborergebnissen gestellt werden, sondern muss immer die Anamnese (Zeckenexposition) und Klinik einbeziehen. Auch das Ansprechen auf antibiotische Therapie und der Ausschluss anderer Erkrankungen können zur Diagnosesicherung herangezogen werden.

Liegt durch Anamnese und Klinik der Verdacht auf Lyme Borreliose vor, muss von Fall zu Fall entschieden werden, welche Nachweismethode unter Einbeziehung der individuellen Situation des Patienten die größte Aussicht auf Erfolg hat.

Als Goldstandard in der Diagnostik der Lyme Borreliose ist nach wie vor der direkte Nachweis von Borrelien durch Anlegen einer Kultur zu betrachten, da nur so das Vorhandensein von lebens- und vermehrungsfähigen Organismen nachweisbar ist [Aguero-Rosenfeld 2005]. Da Borrelien jedoch bezüglich der Kulturbedingungen sehr anspruchsvoll sind, und darüber hinaus die Anzahl von Spirochäten im Patientenmaterial häufig sehr niedrig sein kann, ist auch bei Vorliegen einer patenten Borrelien-Infektion der Nachweis durch Kultur oft nicht möglich. Deshalb ist nur das positive Resultat beweisend, ein negatives Ergebnis schließt eine Borrelien-Infektion aber nicht aus.

Ist die Kultur nicht möglich, kann alternativ hierzu auch eine PCR durchgeführt werden. Hierdurch kann Erreger-DNA aufgefunden werden, ein Beweis der Lebensfähigkeit des Erregers ist mit dieser Methode jedoch nicht zu erbringen.

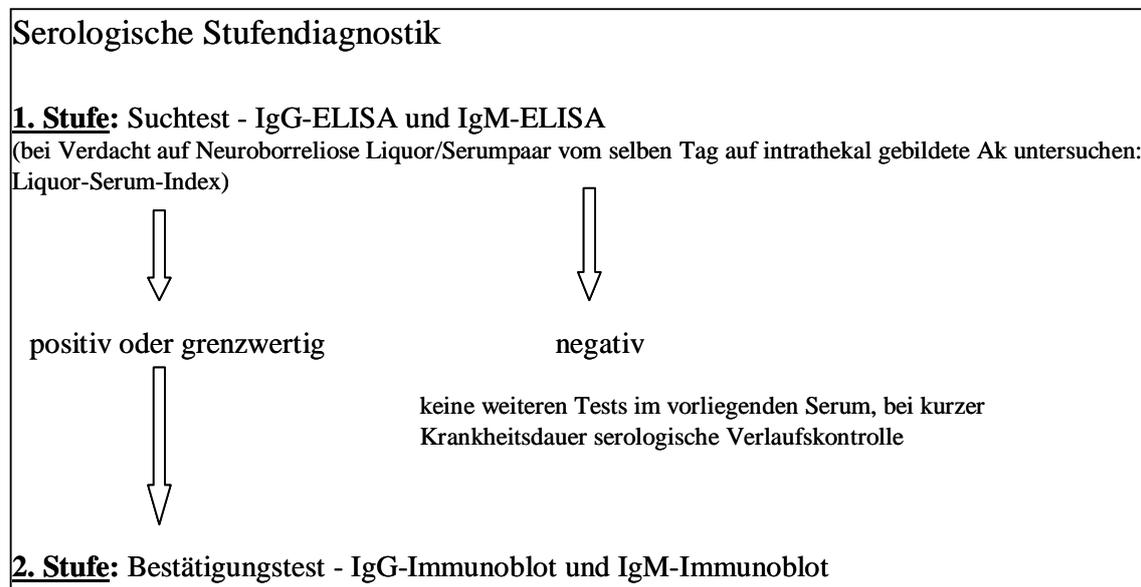
Je nach Herkunft der Biopsie liegt die Nachweiswahrscheinlichkeit unterschiedlich hoch. So können aus Hautbiopsien von EM-Patienten in 50-70 % der Fälle Borrelien kultiviert oder mittels PCR nachgewiesen werden, in der Haut von ACA-Patienten wird man mittels PCR in ca. 60 % der Fälle fündig, in Synovialgewebe und -flüssigkeit zu 50-70 %, und im Liquor liegt die Nachweiswahrscheinlichkeit nur bei etwa 10-30 % [Wilske 2005]. Wesentlich seltener ist der kulturelle Nachweis von Borrelien aus Blut, Synovia oder Herzgewebe [Aberer 1996, Logar 1999, Lomholt 2000, O'Connell 1996, Schwartz 1992b, Strle 1993, Zore 2002]. Eine Anzucht von Spirochäten nach antibiotischer Behandlung ist ebenfalls kaum mehr möglich [Nadelman 1993].

Der niedrigen Sensitivität des direkten Erregernachweises steht die geringe Spezifität des indirekten Erregernachweises gegenüber.

Die serologische Routinediagnostik beruht auf einem zweistufigen Verfahren. Dabei wird in einem ersten Schritt ein möglichst sensitiver Screening-Test, wie ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) angewandt, welcher bei positivem Ergebnis durch einen spezifischeren Bestätigungs-Test (z.B. Western Blot) ergänzt wird [Aguero-Rosenfeld 2005].

Die am häufigsten verwendete Methode zum serologischen Screening auf Lyme Borreliose ist der ELISA. Dieser Test weist mittels synthetischer Peptide, aufgereinigter oder auch rekombinant hergestellter Antigene das Vorhandensein von speziellen Antikörpern im Serum des Patienten nach. Er ist auch bei einer großen Zahl von Proben relativ einfach anzuwenden und ist zudem einfach und objektiv auswertbar.

Der klassischerweise als Bestätigungstest eingesetzte Western Blot (Immunoblot) weist Antikörper gegen bestimmte Borrelien-Proteine nach. Bei diesem Verfahren binden im Serum des Patienten vorhandene Antikörper an auf eine Trägermembran aufgebrachte Borrelien-Antigene. Diese Antigen-Antikörper-Reaktion wird mit Hilfe einer Farbreaktion in Form von spezifischen Banden auf einem Blot-Streifen sichtbar.



**Abbildung 1: Serologische Stufendiagnostik bei Verdacht auf Lyme Borreliose** entnommen aus: MiQ 12 Lyme Borreliose - Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, Wilske et al. 2000

Eine Vielzahl weiterer Tests und Variationen der oben genannten Tests werden in der Diagnostik der Lyme Borreliose verwendet bzw. befinden sich noch in Erprobung, da alle vorhandenen Testsysteme in der alleinigen Anwendung häufig keine ausreichende Sensitivität und Spezifität erreichen. Eine entscheidende Verbesserung der Standardisierung des Immunoblots wurde in den vergangenen Jahren erreicht durch die Verwendung von rekombinanten Antigenen (p100, p58, VlsE, OspC, DbpA) an Stelle von Ganzzell-Lysat-Antigenen. Damit liegen die Nachweisraten von Serum-Antikörpern inzwischen bei 20-50% im Stadium I, bei 70-90 % im Stadium II und bei fast 100 % im Stadium III [Wilske 2005].

### **2.1.7.2 Routinediagnostik in der Veterinärmedizin**

In der Veterinärmedizin kommt dem direkten Erregernachweis aus Patientenmaterial wenig Bedeutung zu, da die Diagnostik fast immer erst in späten Stadien der Erkrankung ansetzt, wenn Symptome chronischer Borreliose (vor allem rezidivierende Lahmheit) beim Tier evident werden. In diesen Stadien ist der direkte Nachweis nur ausgesprochen selten möglich. Kommerzielle Labore untersuchen jedoch auf Wunsch Patientenmaterial mittels PCR auf Borrelien-DNA.

Wesentlich größere Bedeutung hat bei Tieren die Serologie, die von verschiedenen veterinärmedizinischen Laboren analog dem Vorgehen beim Menschen als zweistufiges Verfahren durchgeführt wird.

Auch beim Tier kommt die in Abbildung 1 dargestellte Stufendiagnostik in Form einer Kombination aus ELISA und Western Blot zum Einsatz. Neben diesem klassischen Weg wird in der Veterinärmedizin seit Kurzem der Nachweis von Anti-C6-Antikörpern angeboten, die im Wirbeltier ausschließlich dann gebildet werden, wenn es lebende und vermehrungsfähige Borrelien beherbergt. Hiermit wird eine Unterscheidung zwischen Impf- und Infektionstitern möglich. Auch hier wird in einem zweistufigen Verfahren vorgegangen, um eine möglichst hohe Sensitivität und Spezifität zu erzielen. Der qualitative Nachweis von Anti-C6-Antikörpern (Snap® 3Dx™ ELISA, IDEXX GmbH, Ludwigsburg, Deutschland) wird dabei im Falle eines positiven Ergebnisses gefolgt von einer quantitativen Analyse der vorhandenen Antikörper (Quant C6™ ELISA, IDEXX GmbH, Ludwigsburg, Deutschland).

Der Hersteller gibt an, dass der Nachweis oft schon 3 Wochen post infectionem positiv ist, und dass keine Kreuzreaktionen mit anderen Spirochäten bekannt sind. Als weiterer Vorteil wird die direkte Korrelation des Anti-C6-Titers mit der Menge der vorhandenen

Borrelien genannt, wodurch auch eine zuverlässige Kontrolle des Therapieerfolges möglich sein soll [Levy 2008, Liang 2000]. Diese Beobachtung kann jedoch nicht von allen Autoren nachvollzogen werden, weshalb die Verwendung des Anti-C6-Antikörper ELISA zum Nachweis des Therapieerfolges umstritten ist [Fleming 2004].

## **2.1.8 Therapie**

### **2.1.8.1 Borreliose-Therapie in der Humanmedizin**

Grundlage der Behandlung jeglicher Form der Lyme Borreliose ist die antibiotische Therapie. Dabei sind die Wahl des Antibiotikums, der Applikationsweg und die Dauer der Behandlung abhängig vom Stadium und der Schwere der Erkrankung sowie von der individuellen Situation des Patienten (z.B. Schwangerschaft, Penicillinallergie etc.).

Das EM, das Borrelien-Lymphozytom, die ACA und die Lyme-Arthritis werden vorwiegend oral behandelt. Treten neurologische Symptome, schwere Lyme-Karditis oder Augen-Manifestationen auf, ist initial die intravenöse (i.v.) Applikation zu empfehlen. Neue Studien konnten jedoch auch für einige dieser Indikationen die Gleichwertigkeit der oralen Applikation von Doxycyclin mit der intravenösen Gabe von Ceftriaxon zeigen [Ljostad 2008].

Für die orale Therapie stehen Doxycyclin, Amoxicillin, Cefuroxim und bei Intoleranzen gegen diese Stoffe auch Azithromycin zur Verfügung. Für die intravenöse Therapie werden Ceftriaxon, Cefotaxim oder Penicillin G verwendet [Fingerle 2006a].

Aktuelle Therapieempfehlungen zur Behandlung der Lyme-Borreliose zeigt Tabelle 1.

**Tabelle 1:** Behandlung der Schildzecken-Borreliose

modifiziert nach: Stanek et al., Antibiotika Monitor, 23.Jahrgang, Heft 1/2007

Antibiotikum	Gabe	Dosierung Erwachsene	Dosierung Kinder	Dauer
<b>Erythema Migrans &amp; Borrelien-Lymphozytom</b>				
Penicillin V	oral	2-3 x 1-1,5 Mio	0,1-0,15 Mio/kg	14 Tage (10-21 Tage)
Amoxicillin	oral	3 x 500-1000 mg	20-50 mg/kg	14 Tage (10-21 Tage)
Doxycyclin*	oral	2 x 100 mg	nicht für Kinder	14 Tage (10-21 Tage)
Cefuroxim-Axetil	oral	2 x 500 mg	30-40 mg	14 Tage (10-21 Tage)
<b>Neuroborreliose</b>				
Ceftriaxon	i.v.	2 g	50-100 mg/kg	14 Tage (10-30 Tage)
Penicillin G	i.v.	20 Mio	0,25-0,5 Mio/kg	14 Tage (10-30 Tage)
Doxycyclin* <sup>1</sup>	oral	2 x 100 mg	nicht für Kinder	21 Tage (14-30 Tage)
Ausnahmefälle: <sup>1</sup> Penicillinallergie oder isolierte Fazialisparese und negativer Liquorbefund (keine Pleozytose, keine intrathekalen Antikörper)				
<b>Acrodermatitis chronica atrophicans, Arthritis, Borrelien-Karditis</b>				
Doxycyclin*	oral	2 x 100 mg	nicht für Kinder	21 Tage (14-30 Tage)
Amoxicillin	oral	3 x 500-1000 mg	20-50 mg/kg	21 Tage (14-30 Tage)
Ceftriaxon	i.v.	2 g	50-100 mg/kg	21 Tage (14-30 Tage)
* nicht für Kinder, Schwangere, stillende Mütter				

### 2.1.8.2 Borreliose-Therapie in der Veterinärmedizin

Da Borreliose-Infektionen bei Tieren fast immer erst im Spätstadium diagnostiziert werden, erübrigt sich die Ausarbeitung stadienabhängiger Therapieschemata weitgehend.

Auch wird in den seltensten Fällen der intravenösen Applikation der Vorzug gegeben werden, da dieser die Hospitalisation des Patienten beinhaltet, was aus Kostengründen oder wegen mangelnder Compliance des Patienten häufig nicht über einen längeren Zeitraum möglich ist. Die Applikation von Tabletten kann dagegen vom Patientenbesitzer mühelos auch über mehrere Wochen zu Hause durchgeführt werden. Die am häufigsten angewendete bzw. empfohlene Therapie ist die Gabe von Doxycyclin in einer Dosis von 10 mg/kg p.o. zweimal täglich über 4 Wochen [Littman 2006]. Alternativ hierzu (z.B. bei trächtigen oder laktierenden Hündinnen) wird Amoxicillin

mit einer Dosis von 20 mg/kg p.o zweimal täglich über 4 Wochen verabreicht [Tilley 2003].

Zusätzlich wird je nach Schwere der Erkrankung und nach dem betroffenen Organsystem symptomatisch therapiert. Bei anhaltender Lahmheit und Schmerzhaftigkeit der Gelenke im Zuge einer Lyme-Arthritis empfiehlt sich die Gabe von Glucocorticoiden oder nicht-steroidalen Entzündungshemmern (NSAIDs). Bei der Behandlung einer Niereninsuffizienz auf Grund einer Glomerulonephritis steht eine intensive Infusionstherapie im Vordergrund. Kardiale Manifestationen müssen ebenfalls vorwiegend symptomatisch, z.B. mit ACE-Hemmern oder Diuretika, behandelt werden [Kahn 2005].

## **2.1.9 Prophylaxe**

### **2.1.9.1 Allgemeine Präventionsmaßnahmen**

Die wirksamste Prophylaxe zur Verhinderung einer Borreliose-Infektion bei Mensch und Tier besteht nach wie vor in der Vermeidung von Zeckenbissen. Das Tragen von Schutzkleidung (z.B. lange Hosen und Ärmel), insbesondere bei Bewegung in Wiesen und im Unterholz (Jäger, spielende Kinder etc.), ist ebenso anzuraten wie das Auftragen von Repellents (z.B. Pyrethroide) auf die Haut bzw. auf das Fell [O'Connell 1996]. Auch für den Hund gibt es verschiedene einfach anwendbare und zugelassene Präparate (z.B. mit Permethrin, Fipronil, Amitraz etc. als Halsband, Spray oder Spot-on), die dem Zeckenbefall entgegen wirken.

Eine Reduktion der Zeckenpopulation und damit indirekt auch der Befallsrate lässt sich erreichen durch die Alteration des Zeckenhabitats, sprich durch das Mähen von Wiesen, die Entfernung von Buschwerk oder die Reduktion von Wildverkehr in bestimmten Gebieten.

Trotz der häufig erheblichen Reduktion der Befallsrate bei Anwendung der oben genannten protektiven Maßnahmen lässt sich eine Exposition mit Zecken insbesondere beim Hund meist nicht völlig vermeiden. Da aber die Übertragung von Borrelien aus der Zecke auf den Vertebraten-Wirt nicht sofort, sondern erst nach einigen Stunden stattfindet, ist es stets sinnvoll, nach jeder Aktivität in von Zecken bewohnten Gebieten den gesamten Körper sorgfältig nach Zecken abzusuchen und diese sofort zu entfernen. Insbesondere bei langhaarigen, dunkelhäutigen, großen Hunden ist diese Methode jedoch praktisch kaum durchführbar, zumal gerade Nymphen mit einem Durchmesser von ca. 1 mm leicht übersehen werden können [Straubinger 2000a, Wormser 2006].

### 2.1.9.2 Impfung

Verschiedene Vakzinen zur Borreliose-Prophylaxe wurden bereits getestet bzw. waren auf dem Markt erhältlich.

Für die Humanmedizin steht derzeit kein Impfstoff mehr zur Verfügung, nachdem der in den USA zuletzt zugelassene Impfstoff Lymerix (Fa. GlaxoSmithKline) auf Grund möglicher Nebenwirkungen und mutmaßlich auch wegen der daraus resultierenden sinkenden Verkaufszahlen und medizinrechtlichen Probleme in den USA vom Markt genommen wurde.

In der Veterinärmedizin wurde 1998 in Frankreich ein Impfstoff für den Hund zugelassen (Merilym® ad us. vet., Fa. Merial), der seit 1999 auch auf dem deutschen Markt erhältlich ist. Dieser Lysatimpfstoff wird ausschließlich aus Zellen der Spezies *B. burgdorferi* s.s. hergestellt, soll laut Herstellerangabe aber auch Kreuzimmunität gegen andere Borrelien-Genospezies hervorrufen. Bisher gibt es jedoch noch keinen Nachweis, dass vom Tier nach Kontakt protektive Antikörper gegen eine oder mehrere Spezies gebildet werden, weshalb die Anwendung dieses Impfstoffes nach wie vor sehr umstritten ist.

In den USA sind derzeit für den Hund verschiedene Impfstoffe gegen *B. burgdorferi* erhältlich. Diese Impfstoffe enthalten entweder ein einzelnes rekombinantes Antigen mit oder ohne Adjuvans (OspA-Subunit-Vakzine) oder ein Ganzzell-Lysat, welches alle Antigene der in Kultur angezüchteten und chemisch inaktivierten *B. burgdorferi* s.s.-Zellen sowie ein Adjuvans enthält. Beide Arten von Vakzinen sollen die Übertragung von *B. burgdorferi* auf den Wirt verhindern [Straubinger 2000a]. Geimpfte Tiere produzieren Antikörper, die im Blut und in den Geweben präsent sind und bei der Blutmahlzeit der Zecke auch auf diese übergehen.

Wie bereits dargestellt exprimiert *B. burgdorferi* in der Zecke vermehrt das Antigen OspA, welches bei Übergang in den Vertebratenwirt einer Down-Regulation unterliegt. Daher können durch eine OspA-Subunit-Vakzine induzierte, neutralisierende (protektive) Antikörper bereits im Darm der Zecke an OspA binden und die Spirochäten immobilisieren oder töten [de Silva 1997]. Dieser Mechanismus verhindert die Übertragung von Borrelien in die Haut des Wirtes.

Da das Immunsystem des Wirtes keinen längerfristigen natürlichen Kontakt zu den Antigenen der Borrelien hat, entsteht offensichtlich keine dauerhafte Immunität. Daher werden eine zweimalige Grundimmunisierung und mindestens jährliche Wiederholungsimpfungen empfohlen, um den Antikörpertiter auf einem protektiven

Level zu erhalten [Straubinger 1995, Töpfer 2007]. Problematisch ist in diesem Zusammenhang auch die antigenetische Variabilität der Borrelien. Neue Untersuchungen unterstützen die schon seit langem bestehende Vermutung, dass die auf dem Markt erhältlichen Vakzinen, die ausschließlich auf Basis von *B. burgdorferi* s.s.-Antigenen hergestellt werden, keine Kreuzimmunität gegen die anderen Borrelienspezies erzeugen und damit in Europa so gut wie unwirksam sind [Töpfer 2007].

Bisher ist darüber hinaus nicht bekannt, welche Auswirkungen die Vakzinen auf Hunde haben, die bereits vor der Impfung mit *B. burgdorferi* infiziert waren. Es besteht die Möglichkeit, dass z.B. durch die Bildung und Ablagerung von Immunkomplexen negative Auswirkungen auf die Gesundheit des Hundes entstehen könnten [Straubinger 2000a]. Die Entwicklung von Vakzinen für andere Haus- und Nutztierarten als den Hund scheint derzeit auf Grund fehlender Untersuchungen zur tatsächlichen Prävalenz und Inzidenz klinischer Erkrankungen sowie zur wirtschaftlichen Bedeutung derselben ebenfalls fraglich.

## **2.2 Problematik der antibiotischen Behandlung der Lyme Borreliose**

Seit der Identifizierung des Bakteriums *B. burgdorferi* als Ursache der Lyme Borreliose haben sich eine Vielzahl von antibiotischen Substanzen in klinischen Studien und *in vitro* Experimenten als wirksam gegen diesen Mikroorganismus erwiesen. Dennoch liegen für so gut wie alle in der Behandlung der Lyme Borreliose bedeutsamen Antibiotika Berichte über ein gelegentliches Therapieversagen vor [Hassler 1990, Hunfeld 2002a, Preac-Mursic 1989, Strle 1993, Wormser 2003].

Die Problematik der antibiotischen Behandlung der Lyme Borreliose besteht unter anderem darin, dass das Wissen über ihre Durchführung und über die Wirkung antibiotischer Substanzen auf Borrelien im Wesentlichen auf *in vitro* Testungen von relativ wenigen Borrelienisolaten beruht [Hunfeld 2006b]. Umfassende klinische Studien über die *in vivo* Wirksamkeit therapierelevanter Antibiotika, insbesondere unter vergleichender Betrachtung der verschiedenen Genospezies, fehlen.

Beginnt die antibiotische Behandlung in frühen Stadien der Lyme Borreliose, so ist sie generell in mehr als 90 % der Fälle erfolgreich [Gerber 1996, Smith 2002].

Man geht davon aus, dass es bei etwa 5 % der Patienten im Stadium I zu klinischem Therapieversagen und unerwünschten Folgezuständen kommt [Dattwyler 1997,

---

Wormser 2003]. Bei erst im Stadium II und III behandelten Patienten können diese Prozentzahlen durchaus noch höher liegen [Cameron 2006].

Betrachtet man die Problematik der antibiotischen Behandlung der Lyme Borreliose aus Sicht des Veterinärmediziners, so fällt auf, dass in der Literatur nur sehr vereinzelt Untersuchungen zu diesem Komplex zu finden sind. Das Patientenkollektiv dieser Studien ist sehr klein, und darüber hinaus handelt es sich im Wesentlichen um experimentell induzierte Infektionen.

Es gibt keine Studie, die sich mit der Therapie von frühen Stadien der Lyme Borreliose beim Tier beschäftigt, jedoch kommt es wie beim Menschen auch bei Pferd und Hund in späten Stadien der Lyme Borreliose häufig zu Versagen der antibiotischen Therapie. Dabei ist die Beurteilung der Spätfolgen oder des Therapieversagens beim Tier klinisch oft schwer fassbar und beruht zumeist auf den Ergebnissen der Sektion und auf postmortalen Erregernachweisen aus den Geweben [Chang 2005, Straubinger 1997b]. In der Therapie der Lyme Borreliose gibt es nicht nur Kontroversen über die Auswahl des geeigneten Antibiotikums im jeweiligen Stadium der Erkrankung, sondern vor allem auch über die Dauer der antibiotischen Behandlung. So wird häufig in der Humanmedizin für das Stadium I eine Behandlungsdauer von durchschnittlich 14 Tagen (10-21 Tage) empfohlen, im Stadium III jedoch bereits eine Dauer von 14 bis zu 30 Tagen (siehe Tabelle 1). Die Empfehlungen in der veterinärmedizinischen Literatur sind generell nicht nach Stadien gegliedert und schlagen ebenfalls eine Behandlungsdauer zwischen 2 und 4 Wochen vor [Kahn 2005, Tilley 2003]. Trotzdem gibt es nach wie vor stark unterschiedliche Ansichten über die adäquate Dauer der antibiotischen Therapie. Dabei geben das Auftreten von Therapieversagern und Spätfolgen in Kombination mit den derzeit noch immer unzulänglichen diagnostischen Tests, die nicht verlässlich zwischen totalem Versagen der Therapie, echten endogenen Rezidiven, möglichen Reinfektionen oder Koinfektionen mit anderen Vektor-übertragenen Pathogenen unterscheiden können [Hunfeld 2002a] häufig Anlass zu Missinterpretationen und führen zur Rechtfertigung langfristiger antibiotischer Therapien [Hunfeld 2004]. Auf Basis andauernder Beschwerden werden in der Praxis zum Teil monatelange antibiotische Therapien verschrieben, ohne dass ein labordiagnostischer Nachweis einer aktiven Lyme Borreliose vorliegen würde. Dies erscheint insbesondere daher fragwürdig, da eine Reihe anderer Erkrankungen wie etwa Psoriasis oder Rheumatoide Arthritis ähnliche Symptome hervorrufen können [Seidel 2007].

Darüber hinaus wird als Ursache für bestimmte Spätfolgen der Lyme Borreliose wie etwa für die Lyme-Arthritis eine immunologische Komponente vermutet, da selbst bei anhaltenden Beschwerden zumeist keine lebensfähigen Borrelien mehr nachgewiesen werden können. Aus diesem Grund halten zahlreiche Autoren eine antibiotische Langzeittherapie zur Linderung oder Beseitigung von Spätfolgen für nicht sinnvoll [Auwaerter 2007, Hansmann 2007, Hunfeld 2004, Klempner 2001, Rossi 2005].

Wormser et al. kamen in einer Studie an 180 Patienten zu dem Schluss, dass bei der oralen Behandlung mit Doxycyclin keine besseren Resultate durch die Verlängerung der Therapiedauer von 10 auf 20 Tage erzielt werden konnte. Allerdings fand sich der einzige Therapieversager - er entwickelte nach 18 Tagen eine Meningitis - in der Patientengruppe, die lediglich über 10 Tage mit Doxycyclin behandelt worden war [Wormser 2003]. Stricker et al. kamen unlängst mittels einer retrospektiven Betrachtung der Literatur zu dem Schluss, dass eine über die Standarddauer von 2-4 Wochen hinaus verlängerte Therapie persistente Symptome in Zusammenhang mit Lyme Borreliose verbessern kann [Stricker 2007].

### **2.3 Ursachen von Therapieversagen, Erregerpersistenz und Spätfolgen**

Die Ursachen für das Versagen der Lyme Borreliose-Therapie, für das Phänomen der Erregerpersistenz und letztendlich auch für das Auftreten von Spätfolgen im Zusammenhang mit dieser Erkrankung sind noch weitgehend ungeklärt. Es existieren jedoch zahlreiche Theorien und Erklärungsversuche, die zum Teil auch bereits mit Studien untermauert wurden.

Häufig werden Spätfolgen einer Infektion mit *B. burgdorferi* unter dem Begriff Post-Lyme-Syndrom (PLS) zusammengefasst [Bujak 1996, Wormser 2000]. Jedoch ist nach wie vor strittig, ob das PLS tatsächlich unmittelbar oder indirekt durch den Erreger *B. burgdorferi* verursacht wird. Auch gibt es Studien, in denen kein signifikanter Unterschied klinischer Beschwerden zwischen Personen mit vorausgegangener Lyme Borreliose und Vergleichspersonen der selben Altersgruppe gefunden werden konnte [Seltzer 2000].

Einige Autoren gehen dennoch davon aus, dass *B. burgdorferi* intrazellulär persistieren und somit die Immunantwort des Wirtes umgehen kann. Ein intrazelluläres Auftreten von Borrelien konnte bisher nur vereinzelt nach experimenteller Infektion von Zellkulturen aus Synovialzellen, Endothelzellen und Neuronen [Girschick 1996,

Livengood 2006, Ma 1991] sowie auch in Myozyten von experimentell infizierten Mäusen nachgewiesen werden [Pachner 1995].

Sehr umstritten sind die Untersuchungen von Brorson und Brorson, die über die Transformation von normalen, beweglichen Borrelien in zystische Formen in Kulturmedium ohne Serum, in Liquor und unter Einfluss von destilliertem Wasser berichten [Brorson 1998a, 1998b, 1997]. Die Bildung von zystischen Dauerformen, wie man sie von zahlreichen anderen Mikroorganismen kennt, wäre eine gute Erklärung für die oben genannten Problematiken, jedoch konnten die Ergebnisse von Brorson und Brorson bisher noch von keiner anderen Arbeitsgruppe reproduziert werden.

Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass die individuelle Stoffwechselsituation einzelner Patienten möglicherweise so ungünstig ist, dass verabreichte Antibiotika auf Grund pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Einflüsse am Ort der Infektion keine ausreichenden Wirkspiegel erreichen können [Hunfeld 2006b]. Die Heterogenität des Erregers *B. burgdorferi* gibt Anlass zu der Vermutung, dass die zwischen den Genospezies existierenden genotypischen Unterschiede sich auch phänotypisch in Form von unterschiedlicher Empfindlichkeit gegen antibiotische Substanzen manifestieren könnten.

Mehrere Untersuchungen verglichen daher bereits die *in vitro* Wirkung von verschiedenen antibiotischen Substanzen auf die Genospezies *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* und *B. afzelii*. Unter den getesteten Wirkstoffen befanden sich überwiegend solche, die auf Basis klinischer Erfahrungen als therapierelevant angesehen werden, aber auch Substanzen aus weniger bedeutenden Wirkstoffklassen sowie neu entwickelte Wirkstoffe [Hunfeld 2002a, Hunfeld 2001a, Hunfeld 2004, Kraiczy 2001]. Alle Autoren berichten von individuellen Unterschieden der *in vitro* Empfindlichkeit zwischen den einzelnen Isolaten. Darüber hinaus wurden teilweise auch signifikante Unterschiede zwischen den Genospezies festgestellt [Henneberg 2002, Hunfeld 2000b, Preac Mursic 1996, Sicklinger 2003].

So beobachteten Preac-Mursic et al. in ihren Untersuchungen, dass *B. garinii* eine höhere Empfindlichkeit gegen Amoxicillin, Doxycyclin, Cefotaxim, Ceftriaxon, Azithromycin und Penicillin G besaß als *B. afzelii* [Preac Mursic 1996]. Auch in Studien von Hunfeld et al. besaß *B. garinii* verglichen mit den anderen humanpathogenen Genospezies eine signifikant höhere Empfindlichkeit gegen Cephalosporine und Makrolide [Hunfeld 2000b].

Henneberg und Neuberg zeigten, dass *B. burgdorferi* s.s. weniger empfindlich gegen Cephalosporine ist, und dass *B. garinii* eine höhere Empfindlichkeit gegen Penicillin G besitzt [Henneberg 2002].

Sicklinger et al. fanden keine Unterschiede bezüglich der minimalen Hemmkonzentration (MHK), stellten jedoch signifikante Unterschiede zwischen den humanpathogenen Genospezies in der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) von Azithromycin, Amoxicillin und Ceftriaxon fest. So schien *B. garinii* besonders empfindlich gegen Azithromycin zu sein, während Amoxicillin besonders wirksam gegen *B. burgdorferi* s.s. war. Ceftriaxon war besonders wirksam gegen *B. afzelii*, etwas weniger gegen *B. garinii* und am wenigsten gegen *B. burgdorferi* s.s. [Sicklinger 2003]. Andere Studien hingegen konnten keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Genospezies feststellen [Baradaran-Dilmaghani 1996].

Da zur antibiotischen Behandlung der neu entdeckten Genospezies *B. spielmanii* noch keinerlei Daten vorliegen, und im Allgemeinen vor Behandlungsbeginn keine Speziesdiagnose durchgeführt wird, wäre eine erniedrigte antibiotische Empfindlichkeit dieser Genospezies oder einzelner Isolate durchaus eine mögliche Erklärung für ein Therapieversagen oder für Spätfolgen trotz antibiotischer Behandlung.

#### **2.4 Wirtschaftliche Bedeutung der Lyme Borreliose**

Die weltweite wirtschaftliche Bedeutung der Lyme Borreliose ist auf Grund ihrer weitreichenden Verbreitung und nicht zuletzt auch wegen der problematischen Diagnostik und Behandlung enorm. Eine Studie aus den USA aus dem Jahr 1998 beziffert die durch diese Krankheit entstehenden direkten und indirekten Kosten in einem Zeitraum von 5 Jahren allein in den Vereinigten Staaten auf 2,5 Milliarden US-Dollar [Maes 1998].

In den Jahren 1997 bis 2000 sanken die gemittelten direkten Kosten bezogen auf den einzelnen Patienten bereits von \$ 1.609 auf \$ 464 (Frühstadium der Lyme Borreliose) bzw. von \$ 4.240 auf \$ 1.380 (Spätstadium der Lyme Borreliose). Bei einer Anzahl von rund 24.000 Fällen, wie sie für das Jahr 2002 in den USA gemeldet wurden, entsteht dennoch ein geschätzter volkswirtschaftlicher Gesamtschaden von 203 Millionen US-Dollar [Zhang 2006].

## 2.5 *In vitro* Testung von Antibiotika

Nach der Identifikation des Schraubenbakteriums *B. burgdorferi* als Ursache der Lyme Borreliose beruhten die ersten Therapiekonzepte ausschließlich auf empirisch gewonnenen Daten aus klinischen Beobachtungen. Als effektive Therapeutika nennt Steere 1984 Tetracyclin, Penicillin und Erythromycin und empfiehlt für späte Stadien der Erkrankung die Applikation hoher intravenöser Dosen von Penicillin [Steere 1984]. Erste Berichte über die *in vitro* Testung von Antibiotika gegen Borrelien stammen aus den 80er Jahren [Berger 1985, Johnson 1987, Johnson 1984, Preac-Mursic 1986].

Ebenso wie es an speziellen veterinärmedizinisch-klinischen Studien über den Verlauf und die Behandlung der Lyme Borreliose mangelt, gibt es auch kaum Untersuchungen über die *in vitro* Empfindlichkeit von Borrelien, die von Tieren mit klinisch manifester Lyme Borreliose isoliert wurden. Die wenigen vorhandenen Studien beinhalten nur eine kleine Zahl von Isolaten und Antibiotika. So stellten Kim et al. 2006 die hervorragende Wirksamkeit des bei Nutztieren häufig verwendeten Antibiotikums Tilmycosin sowie der Substanzen Amoxicillin und Enrofloxacin dar, verwendeten hierzu jedoch lediglich zwei Borrelien-Isolate, die von einem Hund und einem Pferd isoliert worden waren. [Kim 2006].

Bei der Erstellung neuer Therapiekonzepte zur Behandlung der Lyme Borreliose stellt nach wie vor die *in vitro* Empfindlichkeitstestung von *B. burgdorferi* eine essentielle Grundlage dar [Boerner 1995]. Nur auf der Basis eines fundierten Wissens über das Wachstums- bzw. Absterbeverhalten dieses Erregers unter Einfluss von Antibiotika lassen sich sinnvolle neue Strategien entwerfen, um nicht nur je nach individueller Situation der Patienten eine sichere und zuverlässige Therapie zu gewährleisten, sondern auch die nach wie vor in nicht unerheblichem Umfang auftretenden Fälle von Therapieversagen, Rezidiven und Spätkomplikationen zu mindern oder gar zu vermeiden.

Die *in vitro* Testung von antibiotischen Substanzen ist auch deshalb wichtig, weil sie viele Informationen über das Verhalten des Erregers bei unterschiedlichen Bedingungen unter Einfluss dieser Substanzen liefert. Aus diesen Modellen können schließlich Rückschlüsse auf Wachstum, Vermehrung und Eigenschaften des Erregers *in vivo* gezogen und mitunter klinische Konsequenzen abgeleitet werden.

So konnten z.B. Santino et al. zeigen, dass Borrelien, die niedrigen (d. h. unter der MHK liegenden) Konzentrationen eines Antibiotikums (Erythromycin, Cefoxitim und Tetracyclin) ausgesetzt wurden, anschließend eine erhöhte MHK gegenüber dieser

Substanz und gegen Substanzen der gleichen Klasse zeigten. In den Borrelien waren also offensichtlich Resistenzen induziert worden [Santino 2006].

Dabei sind die Mechanismen der Resistenzbildung bei Borrelien weitgehend unbekannt. Erst kürzlich konnten Bunikis et al. zeigen, dass das Membranprotein BesC, welches als Tunnelprotein in der Lipiddoppelmembran der Borrelien fungiert, maßgeblich die antibiotische Resistenz der Spirochäten mitbestimmt und darüber hinaus im Mausmodell essentiell für deren Infektiosität ist. Nach Inaktivierung dieses Proteins zeigten die Borrelien-Mutanten eine 2- bis 64-fach höhere Empfindlichkeit gegen antibiotische Substanzen (u.a. Penicillin G, Tetracyclin und Azithromycin), als der Wildstamm mit aktivem BesC dies tat. Offensichtlich besitzen Borrelien folglich ein aktives Efflux-System, welches ihre Resistenz gegen antibiotische Substanzen maßgeblich bedingt [Bunikis 2008].

Nur durch *in vitro* Testung von Borrelien ist es möglich, die Wirkung von verschiedenen antibiotischen Substanzen auf einen Stamm bzw ein Isolat oder eine Genospezies zu untersuchen. Auch ein Vergleich der Genospezies und Isolate untereinander in Hinsicht auf ihre Empfindlichkeiten gegen Antibiotika wird dadurch möglich.

Trotz zahlreicher Veröffentlichungen bezüglich der *in vitro* Sensitivität von *B. burgdorferi* s.l. gegen diverse Antibiotika war es lange Zeit sehr schwierig, die in der Literatur veröffentlichten Daten bezüglich MHK und MBK zu vergleichen und damit sinnvoll zu bewerten und in Therapiekonzepte umzusetzen. Die fehlende Vergleichbarkeit der Studien untereinander kommt zu Stande durch die Verwendung einer Vielzahl unterschiedlicher, nicht standardisierter Methoden, wodurch die Spanne der Antibiotikakonzentrationen, die zur Hemmung bzw. zur Abtötung der Borrelien führen soll, nahezu unüberschaubar groß wird [Boerner 1994, Boerner 1995, Hunfeld 2002a, Hunfeld 2000a].

## **2.6 Minimale Hemmkonzentration (MHK) und minimale bakterizide Konzentration (MBK)**

Zur Darstellung der Empfindlichkeit von bakteriellen Krankheitserregern gegen Antibiotika und Chemotherapeutika werden die Begriffe MHK und MBK verwendet, welche die niedrigste Konzentration eines Stoffes beschreiben, bei der ein definierter Effekt (MHK: Hemmung; MBK: Abtötung) auf eine Bakterienkultur eintritt.

---

Mit Hilfe dieser Werte lassen sich Aussagen über das Empfindlichkeits- und Resistenzspektrum eines Stammes, einer Spezies oder auch eines Genus treffen. Ein prinzipielles Problem besteht dabei in der Tatsache, dass in der Literatur eine Vielzahl unterschiedlicher Kriterien für die Definition von MHK und MBK zu Grunde gelegt werden, wodurch eine Vergleichbarkeit der in Studien gewonnenen Werte häufig nicht problemlos möglich ist. Insbesondere für die Spezies *B. burgdorferi* fehlte es lange an einem standardisierten Versuchprotokoll für die Bestimmung der MHK und MBK [Boerner 1994].

Entsprechend der DIN-Norm 58 940 lauten die Definitionen für MHK und MBK wie folgt:

Die minimale Hemmkonzentration ist die niedrigste Konzentration eines Wirkstoffes in  $\mu\text{g/ml}$ , bei der die Vermehrung der Erreger (Erregerpopulation) unter definierten Bedingungen verhindert wird.

Die minimale Abtötungskonzentration (minimale bakterizide Konzentration) ist die niedrigste Konzentration eines Wirkstoffes in  $\mu\text{g/ml}$ , die notwendig ist, um mehr als 99,9 % der Erreger einer Population unter definierten Bedingungen abzutöten.

Auch die Leitlinie M26-A des CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) definiert die Bakterizidie eines Stoffes als eine Reduktion der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) um mindestens 3  $\log_{10}$ -Stufen, also um mindestens 99,9 % [CLSI 1999].

Die Unterschiede der einzelnen Testverfahren ergeben sich hierbei nun aus der Festlegung der „definierten Bedingungen“. Boerner et. al zeigten 1995, dass verschiedene Testbedingungen die Resultate der MHK-Testung erheblich beeinflussen können [Boerner 1995]. So haben die Inkubationsdauer und die bei Borrelien besonders lange Generationszeit einen entscheidenden Einfluss auf den Ausgang der Experimente, da natürlich ein längerer Einfluss des Antibiotikums auf die Bakterienkultur eine höhere Absterberate bedingt. Aber auch die Größe des Inokulums und nicht zuletzt die Inkubationstemperatur sind maßgeblich mitverantwortlich für die Höhe der MHK und MBK [Boerner 1994, Dever 1992, Preac Mursic 1996, Reisinger 1996].

Weitere Schwankungen ergeben sich aus der verwendeten Methode (makroskopische Kontrolle von Farbe, Trübung, Sediment, Indikatorumschlag oder mikroskopische

Bewertung) und den Kriterien für die Endpunkt-Bestimmung (keine lebensfähigen Borrelien, keine beweglichen Borrelien, weniger als 5 % bewegliche Zellen usw.).

Hunfeld et al. entwarfen und evaluierten im Jahr 2000 eine standardisierte kolorimetrische Mikrodilutionsmethode zur Bestimmung der MHK, die wichtige Parameter wie etwa die Größe des Inokulums und die Inkubationsdauer berücksichtigte und durch die kolorimetrische Messung des Indikatorumschlages ein objektives Instrument zur Kontrolle des Wachstums bot [Hunfeld 2000a]. Mit Hilfe dieser Methode wurden inzwischen zahlreiche Antibiotika auf ihre Wirksamkeit gegen *B. burgdorferi* getestet, und damit das Empfindlichkeitsprofil von *B. burgdorferi* gegen Antibiotika und Chemotherapeutika näher charakterisiert [Hunfeld 2000b, Hunfeld 2003, Hunfeld 2001a, Kraiczy 2001, Rödel 2007, Weigand 2006].

Zur Empfindlichkeit der neu entdeckten humanpathogenen Genospezies *B. spielmanii* finden sich in der Literatur derzeit noch keine Informationen, was die Testung dieser Genospezies zur Vervollständigung des Empfindlichkeitsprofils des *B. burgdorferi*-Komplexes notwendig macht. Es bietet sich dabei an, die oben genannte standardisierte kolorimetrische Mikrodilutionsmethode zu verwenden, um die gewonnenen Daten mit den bereits vorliegenden Werten vergleichen und eine Aussage über mögliche signifikante oder gar therapierelevante Unterschiede bezüglich der Resistenzen und Empfänglichkeiten der einzelnen Genospezies treffen zu können.

## **2.7 Genotypisierung und taxonomische Zuordnung von Borrelien**

### **2.7.1 Geschichte und Systematik**

Borrelien sind relativ große, schraubenförmige, gramnegative Bakterien aus der Familie der Spirochaetaceae (Ordnung: Spirochaetales). Benannt wurden sie nach *Amédée Borrel*, einem Bakteriologen aus Straßburg (1867–1937). Die Gattung *Borrelia* umfasst zahlreiche Spezies, von denen als wohl bekannteste neben *B. burgdorferi*, dem Erreger der Lyme Borreliose bei Mensch und Tier, die Spezies *B. recurrentis* (europäisches Rückfallfieber, Mensch), *B. duttoni* (zentralafrikanisches Rückfallfieber, Mensch) und *B. anserina* (Geflügelspirochätose) zu nennen sind.

*B. burgdorferi* wurde erst 1982 erstmals als Erreger der Lyme Borreliose identifiziert und wurde anschließend nach dem Entdecker *Willy Burgdorfer* benannt [Burgdorfer 1982]. Zum Zeitpunkt seiner Entdeckung ging man davon aus, dass es sich bei *B. burgdorferi* um einen einheitlichen Organismus handelt. Als dann die Zahl der Isolate aus Zecken, Patienten und Reservoirwirten auf Grund verbesserter Isolations- und

Kulturmethoden stetig anstieg, wurde schnell klar, dass die vorliegenden genetischen Unterschiede nicht allein auf eine intraspeziesspezifische Variabilität zurückzuführen waren.

Die ersten Versuche einer genotypischen Charakterisierung des damals zuerst schlicht als „Lyme disease spirochete“ bezeichneten Bakteriums wurden 1984 durchgeführt [Schmid 1984]. Ein Jahr später wurde erstmals eine Studie veröffentlicht, die *B. burgdorferi* auch für Arthritiden bei Hunden in Analogie zur humanen Lyme Borreliose verantwortlich machte [Kornblatt 1985].

### 2.7.2 Möglichkeiten der genetischen Charakterisierung

Es gibt eine Vielzahl von Methoden, mit denen Bakterien im Allgemeinen und Borrelien im Speziellen genetisch charakterisiert und taxonomisch klassifiziert werden können. Zahlreiche Verfahren dienen der Analyse von Gen- und Proteinsequenzen, der Darstellung von Plasmid- und Proteinprofilen und der Analyse von Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP) bei Borrelien [Wang 1999b].

Als Gold-Standard für die taxonomische Klassifizierung von Bakterien gilt derzeit die WDDH (whole DNA-DNA-Hybridization) [Wayne 1988]. Bei dieser Methode lagern sich im Anschluss an eine Denaturierung die DNA-Einzelstränge zweier Mikroorganismen wieder zu Doppelsträngen zusammen. Das Ausmaß der Hybridisierung - also der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Nucleinsäuren der Organismen - kann mittels radioaktiver Markierung oder mit Hilfe des UV-Absorptionsspektrums bei photometrischer Messung dargestellt werden und lässt eine Aussage über den Verwandtschaftsgrad der Mikroorganismen zu [Cypionka 2005]. Diese Methode kann jedoch nur von wenigen spezialisierten Laboren durchgeführt werden, ist nicht anwendbar bei nicht kultivierbaren Bakterien und nur begrenzt anwendbar bei langsam wachsenden Bakterien. Außerdem sind die bei Anwendung dieser Methode gewonnenen Daten teils nicht zuverlässig reproduzierbar. Daher müssen für langsam wachsende Bakterien, zu denen die Borrelien mit einer Generationszeit von 7-20 Stunden zählen, alternative Methoden zur Klassifizierung herangezogen werden [Stackebrandt 2002].

Eine weitere Methode zur taxonomischen Eingliederung von Bakterien im Besonderen auf der Gattungs- und Artebene bietet die Analyse der so genannten „Intergenic Spacer-Regionen“.

---

Diese Genabschnitte befinden sich auf der ribosomalen DNA (rDNA) zwischen zwei codierenden Regionen. Sie weisen eine hohe Sequenzvariabilität zwischen verwandten Spezies auf, da sie als nicht-codierende Regionen keinem Selektionsdruck unterliegen. Die Organisation der ribosomalen Gene bei *B. burgdorferi* ist insofern einzigartig, als die *rrl*- (23S) und *rrf*- (5S)-Gene der rDNA hintereinander dupliziert werden. Diese Besonderheit nutzten Postic et al. bereits 1994 aus, um den Restriktionspolymorphismus der PCR-Produkte darzustellen, die mit Hilfe je eines am 3' Ende des ersten *rrf*-Gens und am 5' Ende des zweiten *rrl*-Gens ansetzenden Primers hergestellt wurden. Sie erhielten Amplifikate mit einer Größe von 226-266 Basenpaaren (bp), welche mittels der Restriktionsendonuklease *Mse* I in mehrere Fragmente aufgespalten werden konnten. Nach Durchführung einer Gelelektrophorese zur Auftrennung der Fragmente und anschließender Anfärbung der DNA wurde das spezifische Restriktionsmuster des jeweiligen Isolates sichtbar. Die auf diese Weise entstandenen Restriktionsmuster A-Q ließen eine eindeutige Zuordnung der Borrelienisolate zu ihren Genospezies zu. Anhand eines Vergleichs mit den mittels DNA-DNA-Hybridisierung gewonnenen Daten konnten Postic et al. zeigen, dass diese Methode eine günstige und schnelle Möglichkeit zur Differenzierung der humanpathogenen Borrelien-Genospezies ist, und empfahlen die Anwendung für das Screening sowohl von Stammsammlungen als auch von Patientenproben [Postic 1994]. Dieses Verfahren wurde in folgender Zeit immer wieder von verschiedenen Autoren als Basis für die genetische Identifizierung von Borrelien herangezogen [Chao 2002, Derdákova 2003, Lee 2002, Masuzawa 1996, Rijpkema 1995, Wang 1999a].

Unter spezieller Berücksichtigung der neu beschriebenen Genospezies *B. spielmanii* etablierten Richter et al. 2006 ein Verfahren, welches als verlässliche Alternative zur WDDH herangezogen werden kann, um Borrelien-Isolate zu klassifizieren. Das als Multilocus-Sequenzanalyse (MLSA) bezeichnete Verfahren verwendet 7 so genannte House-Keeping-Gene (kontinuierlich exprimierte Gene, deren Produkte für den Zellerhalt grundsätzlich notwendig sind) zur genetischen Charakterisierung von Borrelien-Isolaten. Die Gen-Loci *rrs*, *hbb*, *groEL*, *recA*, *fla*, *ospA* und der *rrf-rrl* Intergenic Spacer wurden hierzu mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Die erhaltenen Daten lassen sich für eine zuverlässige und reproduzierbare phylogenetische Analyse von Borrelien nutzen und gestatten die eindeutige Zuordnung einzelner Isolate zu ihren jeweiligen Genospezies analog der WDDH [Richter 2006].

---

Daneben gibt es noch eine Reihe weiterer Verfahren, die zur Klassifizierung von Borrelien verwendet werden können. Entsprechend der Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik (MiQ 12 Lyme Borreliose) können zur Speziesdifferenzierung nach erfolgreicher Isolierung und Kultivierung eines Borrelienisolates neben der DNA-DNA-Hybridisierung und der PCR der 5S-23S Intergenic Spacer-Region mit anschließender RFLP-Analyse des Amplifikates auch eine PFGE nach Verdauung mit Mlu I, die 16S rDNA-PCR mit anschließender Sequenzierung des Amplifikates sowie eine ospA-Serotypisierung oder eine ospA-PCR mit anschließender Sequenzanalyse durchgeführt werden. Die beiden letztgenannten Verfahren machen darüber hinaus sogar eine Subspezies-Diagnose möglich [Wilske 2000].

Bei den ersten mikrobiologischen Analysen des Isolates A14S führten Wang et al. eine Proteinanalyse mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) sowie mit monoklonalen Antikörpern durch. Daneben nutzten sie zur Darstellung von genetischen Unterschieden zwischen diesem Isolat und den bekannten humanpathogenen Genospezies Sequenzanalysen der Gene für die 16S rRNA, den 5S-23S Intergenic Spacer, die Proteine ospA und ospC sowie eine RFLP-Analyse der 5S-23S Intergenic Spacer-DNA. Auf Basis der Gensequenz der 16S rRNA und der Aminosäuresequenz des Outer Surface Proteins A (OspA) erstellten sie anschließend einen Stammbaum, in den erstmals ein Isolat der später als *B. spielmanii* bezeichneten Genospezies eingegliedert wurde. Diese Untersuchungen waren jedoch nicht ausreichend, um die Spirochäten des Typs A14S einer eigenen Genospezies zuzuordnen, zumal zu diesem Zeitpunkt erst wenige Isolate zur Verfügung standen. Allerdings vermuteten Wang et al. bereits zu diesem Zeitpunkt, dass das Isolat A14S Vertreter einer bisher unbekannt humanpathogenen Genospezies sein könnte [Wang 1999a].

Mit Hilfe der 2006 neu entwickelten Methode der MLSA gelangen später sowohl eine eindeutige Klassifizierung dieses Isolats als auch die genotypische Zuordnung verschiedener europäischer und nordamerikanischer Isolate mit bislang unklarer taxonomischer Stellung [Postic 2007].

## **2.8 Verwendete Antibiotika**

### **2.8.1 Doxycyclin**

Doxycyclin ist ein bakteriostatisches Antibiotikum aus der Gruppe der Tetracycline. Es gelangt durch energieabhängige Transportsysteme in die Bakterienzelle und unterbricht dort durch Bindung an die ribosomale 30S-Untereinheit die Proteinbiosynthese [Riviere 1995]. Es ist wirksam gegen zahlreiche grampositive und gramnegative Bakterien sowie gegen Mycoplasmen und eine Reihe von Protozoen.

In der Veterinärmedizin wird es unter anderem häufig verwendet zur Therapie von Rickettsiosen bei Hund und Katze (Ehrlichiose, Anaplasrose), oder auch zur Behandlung der Haemobartonellose. Durch die hohe orale Bioverfügbarkeit eignet es sich auch zur Heimtherapie in Form von Tabletten durch den Besitzer. Neben der guten oralen Bioverfügbarkeit zeichnet sich Doxycyclin auch durch seine im Vergleich zu anderen Tetracyclinen um den Faktor 10 erhöhte Lipophilie aus, wodurch es eine hervorragende Gewebeverteilung sowie ein hohes Verteilungsvolumen erreicht.

In Epiphysenfugen kann sich Doxycyclin in Form von Chelaten ablagern und das Wachstum beeinträchtigen. Im Zahnschmelz führt Doxycyclin durch Einlagerungen zu Gelbfärbungen, weshalb eine Verabreichung dieser Substanz an Jungtiere bzw. Kinder unter 8 Jahren obsolet ist [Hayashi 1998, McEvoy 1992]. Als weitere unerwünschte Arzneimittelwirkung kann Doxycyclin zur Photosensibilisierung führen [Kroker 1999]. Auf Grund seiner guten Wirksamkeit gegen Borrelien, seiner günstigen Pharmakokinetik sowie der geringen Toxizität ist Doxycyclin in der Borreliose-Therapie sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin unter Beachtung der Kontraindikationen (Wachstum, Trächtigkeit bzw. Schwangerschaft, Laktation bzw. Stillzeit) Mittel der 1. Wahl (siehe Tabelle 1).

### **2.8.2 Penicillin und Amoxicillin**

Das Penicillin ist der Prototyp der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika und wirkt bakterizid durch Zerstörung der Zellwand. Es bindet an die von bakteriellen Organismen produzierten Peptidoglycansynthetasen (Mureinsynthetasen) und verhindert so die Synthese und Stabilisation der Zellwand. Besonders wirksam ist es daher gegen grampositive Keime, kann aber auch gegen gramnegative Kokken (Meningokokken) und Spirochäten eingesetzt werden. Als natürliches Penicillin ist es gegen Zerstörung durch  $\beta$ -Lactamasen empfindlich [Forth 2001].

---

Das klassische Penicillin G (Benzylpenicillin) ist nicht magensäurestabil und kann daher nur parenteral verabreicht werden. Das eng verwandte Penicillin V (Phenoxymethyl-Penicillin) kann zur oralen Therapie eingesetzt werden und erreicht eine Resorptionsrate von 30 %.

Beim Tier wird Penicillin häufig verwendet zur Behandlung von eitrigen Prozessen, Mastitiden und septikämischen Zuständen, die in Zusammenhang mit Penicillinempfindlichen Erregern stehen. Beim Menschen kommt es darüber hinaus abhängig vom Stadium der Erkrankung auch zur Therapie der Lyme Borreliose zum Einsatz (siehe Tabelle 1).

Wie alle  $\beta$ -Lactame ist das Penicillin in gelöster Form abhängig von Temperatur, Licht und UV-Strahlung nicht lagerungs- bzw. lösungsstabil. Auch im Serum hat es lediglich eine Halbwertszeit von 30-60 min. Durch seine ausgesprochen geringe Toxizität und große therapeutische Breite ist es selbst in hoher Dosierung gut verträglich und kann bei Jungtieren und Kindern sowie auch in der Schwangerschaft und Trächtigkeit eingesetzt werden. Einzige Kontraindikation ist das Vorhandensein einer Überempfindlichkeit gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, wie sie bei Mensch und Tier gelegentlich vorkommt [Forth 2001].

In der Veterinärmedizin wird Penicillin in Form von Mono- oder Kombinationspräparaten vorwiegend parenteral verabreicht. Es existieren für die Veterinärmedizin zugelassene Depot-Präparate, die einmal täglich verabreicht lang anhaltende aber sehr niedrige Serumspiegel induzieren.

Das Aminopenicillin Amoxicillin hat mit 70-80 % eine gegenüber dem Penicillin deutlich höhere orale Bioverfügbarkeit und darüber hinaus ein erweitertes Wirkspektrum gegen verschiedene gramnegative Erreger. Es ist ebenfalls gut verträglich, aber nicht  $\beta$ -Lactamase-stabil und kann zu allergischen Reaktionen führen. Es wird eingesetzt zur Therapie einer Vielzahl von Infektionen, häufig auch in Kombination mit Clavulansäure als  $\beta$ -Lactamase-Hemmer. Zur Therapie der Lyme Borreliose kann es in allen Stadien der Erkrankung außer bei Neuroborreliose eingesetzt werden (siehe Tabelle 1). In der Veterinärmedizin kommt es als Therapiealternative zu Doxycylin bei der Behandlung der Lyme Borreliose zum Einsatz [Kahn 2005]. Es gibt sowohl für die orale als auch für die parenterale Therapie mehrere speziell für Tiere zugelassene Präparate.

### 2.8.3 Cefuroxim und Ceftriaxon

Cefuroxim ist ein Cephalosporin der 2. Generation. Seine bakterizide Wirkung erzielt es wie alle  $\beta$ -Lactame nach Bindung an Proteine der Zellmembran durch Schädigung und Lyse der Zellwand. Cefuroxim ist nur wenig stabil gegen  $\beta$ -Lactamasen und muss auf Grund seiner relativ geringen Halbwertszeit zweimal täglich verabreicht werden. In der Humanmedizin kommt Cefuroxim unter anderem im Stadium I der Lyme Borreliose zum Einsatz (siehe Tabelle 1). Es wird in veresterter Form als Cefuroxim-Axetil zusammen mit Nahrung verabreicht, womit die orale Bioverfügbarkeit auf bis zu 60 % steigt [Forth 2001].

In der Veterinärmedizin wird es seltener eingesetzt, es existiert darüber hinaus derzeit in Deutschland kein für Tiere zugelassenes Präparat.

Bei Ceftriaxon handelt es sich um ein Cephalosporin der 3. Generation. Gegenüber zahlreichen  $\beta$ -Lactamasen von gramnegativen Erregern ist es stabil, woraus verglichen mit Cephalosporinen der 1. und 2. Generation ein erweitertes Wirkspektrum resultiert [Forth 2001].

Ceftriaxon ist stark polar und damit wenig lipophil, dadurch ist ein Eindringen in den Intrazellulärraum diesem Antibiotikum kaum möglich. Es verteilt sich im Extrazellulärraum besonders in Knochen, Perikard, Lunge, Synovia und auch im Liquor, weshalb es bevorzugt bei Meningitiden und Enzephalitiden eingesetzt wird.

Die Applikation erfolgt parenteral (vorwiegend i.v. oder i.m.) und sollte beim Tier auf Grund der zirkadianen Elimination und der geringen Eliminationshalbwertszeit zweimal täglich erfolgen, um stets ausreichend hohe Spiegel zu erreichen [Rebuelto 2002]. Beim Menschen ist die Eliminationshalbwertszeit mit 8 Stunden deutlich länger als beim Hund (< 1 Stunde), sodass hier eine einmalige Gabe ausreichend ist [Forth 2001].

Bei Patienten mit „Penicillin-Allergie“ kann es zu Hypersensitivitätsreaktionen gegen Ceftriaxon kommen. Darüber hinaus sollte dieses Arzneimittel bei gestörter Nierenfunktion nur dosisadaptiert eingesetzt werden [Joynt 2001].

Nach langer Therapiedauer kommt es häufig zu Blutbildveränderungen wie Eosinophilie, Thrombozytose und Leukopenie, seltener zu Anämie, Neutropenie, Lymphopenie und Thrombozytopenie [Plumb 2002]. Auch kann Ceftriaxon zu verminderter Spermaqualität führen, was vor allem bei Zuchttieren von Bedeutung ist [Tanyildizi 2004]. Ceftriaxon besitzt eine in zahlreichen Studien nachgewiesene ausgezeichnete Wirkung gegen Borrelien. In der Humanmedizin wird es auf Grund seiner Eigenschaften verwendet in den Stadien II und III der Lyme Borreliose (siehe

Tabelle 1). Für den Einsatz in der veterinärmedizinischen Borreliose-Therapie eignet es sich weniger, da der parenterale Einsatz häufig nicht vom Tierbesitzer selber durchgeführt werden kann, und eine mehrwöchige Hospitalisation der Patienten aus Kosten- und Tierschutzgründen nur in Ausnahmefällen durchführbar ist.

#### 2.8.4 Erythromycin und Clarithromycin

Erythromycin wird in die Klasse der Makrolid-Antibiotika eingeordnet und bewirkt durch Bindung an die spirochätalen Ribosomen eine Hemmung der Proteinbiosynthese. Grundsätzlich wirken Makrolide bakteriostatisch, können in hohen Dosen jedoch auch eine bakterizide Wirkung entfalten.

Die Aufnahme von Erythromycin in die Zelle ist abhängig vom pH-Wert. Im basischen Milieu zeigt sich eine erhöhte antimikrobielle Wirksamkeit, und auch die Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt verbessert sich mit zunehmendem pH-Wert. Aus diesem Grund sollten Makrolide nicht während oder kurz nach der Nahrungsaufnahme peroral verabreicht werden, da Nahrung im Magen Säureausschüttung und damit einen pH-Wert-Abfall bedingt. Da Erythromycin darüber hinaus eine strukturelle Ähnlichkeit zu dem körpereigenen Mediator Motilin aufweist, sind gastrointestinale Nebenwirkungen wie Erbrechen, Durchfall und Anorexie oft zu beobachten. Auch kann es durch Bildung von Erythromycin-Estolaten zu einer Schädigung der Leber kommen. Seltener treten Hypersensibilitätsreaktionen gegen Makrolide auf [Forth 2001, McEvoy 1992, Plumb 2002].

Erythromycin sollte in der Trächtigkeit und Laktation nicht eingesetzt werden, da es sowohl die Plazentaschranke als auch die Blut-Milch-Schranke überwinden kann.

Makrolid-Antibiotika können als Therapiealternative bei Lyme Borreliose eingesetzt werden, ihre hervorragende *in vitro* Wirksamkeit korreliert jedoch nicht immer mit den klinischen Effekten dieser Substanzen [Hunfeld 2006b, Hunfeld 2004]. Gründe hierfür liegen vor allem in den pharmakokinetischen Eigenschaften dieser Stoffe, da z.B. die Plasmaproteinbindung im menschlichen Körper bei 68 % und im Hasenserum, welches essentieller Bestandteil des BSK-Mediums ist, lediglich bei 7% liegt [Hansen 1992].

Bezüglich der Haupt- und Nebenwirkungen sowie der Kontraindikationen ist Clarithromycin vergleichbar mit Erythromycin. Jedoch hat Clarithromycin eine höhere orale Bioverfügbarkeit von 60-80 % bei gefütterten Tieren bzw. 70-90 % bei gefasteten Tieren. Auch erreicht es selbst bei niedrigerer Dosierung nach oraler Gabe höhere Plasmaspiegel als Erythromycin [Forth 2001].

### 2.8.5 Ciprofloxacin und Levofloxacin

Das Fluorchinolon Ciprofloxacin verhindert durch Hemmung der bakteriellen DNA-Gyrase die Faltung und Aufdrehung („Supercoiling“) der DNA und wirkt dadurch bakterizid gegen eine Vielzahl grampositiver und gramnegativer aerober Erreger [Plumb 2002]. Es ist stark lipophil, erreicht dadurch eine hervorragende Gewebsgängigkeit und reichert sich überdies in Makrophagen und Granulozyten an.

Die orale Bioverfügbarkeit unterliegt starken speziesspezifischen Schwankungen [Dowling 1995].

Bei Jungtieren sowie in der Trächtigkeit und Laktation dürfen Gyrasehemmer nicht eingesetzt werden, da sie sowohl Milch- als auch Plazenta-gängig sind und beim wachsenden Organismus zu Knorpelschäden führen [Kroker 1999]. Bei Patienten mit schweren Leber- oder Nierenfunktionsstörungen kann es zu Akkumulation des Wirkstoffes kommen [McEvoy 1992]. Seltener sind auch Hypersensibilitätsreaktionen und Störungen der Hämatopoese zu beobachten. Gyrasehemmer führen darüber hinaus oft zu gastrointestinalen Beschwerden und zu Photosensibilisierung.

Ciprofloxacin ist ein Stoffwechselprodukt des in der Veterinärmedizin zugelassenen und häufig verwendeten Wirkstoffes Enrofloxacin (Baytril®, Fa. Bayer, Leverkusen, Deutschland). Ciprofloxacin selber besitzt für Tiere in Deutschland derzeit keine Zulassung. In der Therapie der Lyme Borreliose spielt dieser Wirkstoff bisher keine bedeutende Rolle [Kraiczy 2001].

Während Ciprofloxacin der Gruppe II (systemisch anwendbare Fluorchinolone mit breiter Indikation) der Fluorchinolone zugerechnet wird, gehört Levofloxacin in die Gruppe III dieser Wirkstoffklasse (Fluorchinolone mit verbesserter Aktivität gegen grampositive und atypische Erreger). Es besitzt dem Ciprofloxacin vergleichbare pharmakodynamische Eigenschaften, hat jedoch eine deutlich höhere Halbwertszeit und erreicht im Blut höhere Spitzenkonzentrationen [Forth 2001].



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Borrelienisolat

**Tabelle 2:** Auflistung der verwendeten Borrelienisolat

Isolat	Genospezies	biolog. Herkunft	geograph. Herkunft
B31e2	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.s.	Zecke	USA
LW2	<i>Borrelia burgdorferi</i> s.s.	Haut	Deutschland
PSth	<i>Borrelia garinii</i>	Haut	Deutschland
M2094	<i>Borrelia garinii</i>	Haut	Slowenien
G1	<i>Borrelia garinii</i>	Liquor	Deutschland
FEM1	<i>Borrelia afzelii</i>	Haut	Deutschland
G600	<i>Borrelia afzelii</i>	Haut	Slowenien
G1039	<i>Borrelia afzelii</i>	Haut	Slowenien
PMew	<i>Borrelia spielmanii</i>	Haut	Deutschland
PSigII	<i>Borrelia spielmanii</i>	Haut	Deutschland
PC Eq 17	<i>Borrelia spielmanii</i>	Zecke	Frankreich
PHap	<i>Borrelia spielmanii</i>	Haut	Deutschland
PJes	<i>Borrelia spielmanii</i>	Haut	Slowenien
PAnz	<i>Borrelia spielmanii</i>	Haut	Slowenien
PMai	<i>Borrelia spielmanii</i>	Haut	Deutschland
A14S	<i>Borrelia spielmanii</i>	Haut	Niederlande
TIsarII	<i>Borrelia spielmanii</i>	Zecke	Deutschland
TIsarIII	<i>Borrelia spielmanii</i>	Zecke	Deutschland

##### 3.1.2 Geräte

Brutschränke	Heraeus Typ B5060, Heraeus Instruments, Osterrode, Deutschland Heraeus Typ B5042, Heraeus Instruments, Osterrode, Deutschland
Gelelektrophoresesystem	HORIZON® 11-14, GibcoBRL, Eggenstein, Deutschland
Geldokumentationssysteme	Photoprint, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Gelkammern	Standard Casting Stand, Bio-Rad Laboratories, Hercules (CA), USA Glass plates und Casting Clamps, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

---

	Standardgelkammer, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Densitometer	Densimat, bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Deutschland
Magnetrührer	VWR™Stirrer Nr.400614, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland Ikamag®RET, IKA® Labortechnik, Staufen, Deutschland
Mikroskop	Standard 25, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikrowelle	Microwave&Grill, Severin, Sundern, Deutschland
Netzgeräte Gelelektrophorese	Consort E 443, Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau, Deutschland Consort E 835, Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau, Deutschland
pH-Meter	654 pH-Meter, Metrohm, Filderstadt, Deutschland
Photometer	Power Wave 200™ Microplate Scanning Spectrophotometer, BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland Ultrospec3100 pro, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
PCR-Thermocycler	GeneAmp® PCR System 2400, PerkinElmer, Waltham (MA), USA GeneAmp® PCR System 2700, Applied Biosystems, Foster City (CA), USA
Pipetten	Distribiman® repetitiv pipette, Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich Eppendorf-Pipette, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Stripette®, Corning Incorporated, Corning (NY), USA

---

Pulsfeldgel-Apparat	CHEF-DR® III, Bio-Rad Laboratories, Hercules (CA), USA
Sicherheitswerkbänke	HeraSafe, Heraeus Instruments, Osterrode, Deutschland PCR OMNI, Nalge Nunc International, Rochester (NY), USA
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Waagen	Feinwaage BP110S, Sartorius, Göttingen, Deutschland Waage 822-36, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Vakuumpumpe	N820.3FT.18, KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland
Vakuumzentrifuge	Eppendorf Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexgerät	MS1 Minishaker, IKA® Labortechnik, Staufen, Deutschland Vortex Genie 2™, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5402, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Varifuge 3.OR, Heraeus Instruments, Osterrode, Deutschland Mikro 24-48R, Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland

---

### 3.1.3 Chemikalien

Acrylamid 2K, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Agarose GTQ, Karl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Agarose Electrophoresis Grade, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Albumin (bovine, 35 % solution), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Ammoniumazetat, Riedel-de Haen AG, Seelze, Deutschland

Ammoniumperoxidsulfat, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Bisacrylamid, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Borsäure, Merck, Darmstadt, Deutschland

Bromphenolblau, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

CMRL 1066 10x, GibcoBRL, Eggenstein, Deutschland

DEPC, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Dinatriumhydrogenphosphat, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

d’NTPs, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH, Ingelheim am Rhein, Deutschland

EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Ethanol absolut, J.T. Baker, Deventer, Holland

Ethanol 70 %, J.T. Baker, Deventer, Holland

Gelatine, Merck, Darmstadt, Deutschland

Glycerin Rothipuran®, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Glucose, Merck, Darmstadt, Deutschland

Hepes, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Isopropanol, Merck, Darmstadt, Deutschland

Magnesiumchlorid, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

N-Acetyl-D-glucosamine, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Natriumbicarbonat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Natrium-Citrat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Natriumchlorid, Merck, Darmstadt, Deutschland

Natriumdihydrogenphosphat, Merck, Darmstadt, Deutschland

Natrium-Pyruvat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

NE Buffer 2 (10 x Concentrate), New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland

Neopepton, Difco Laboratories, Detroit (MI), USA

Phenolrot, Merck, Darmstadt, Deutschland

Purified BSA (10 mg/ml), New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland

Rabbit serum, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Saccharose, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Sodiumdodecylsulfat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

TEMED, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Tris, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

### **3.1.4 Marker**

123 bp DNA Ladder, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

pBR322 DNA-MspI Digest, New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland

Low Range PFG Marker, New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland

MidRange PFG Marker , New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland

### **3.1.5 Enzyme und Primer**

Lysozym [50 mg/ml], Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

RNAse A [10 mg/ml], Boehringer Ingelheim Pharma GmbH, Ingelheim am Rhein, Deutschland

Taq DNA-Polymerase, Boehringer Ingelheim Pharma GmbH, Ingelheim am Rhein, Deutschland

BB5s, TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland

Sequenz: 5' - CTGCGAGTTCGCGCGGGAGA

BB23s, TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland

Sequenz: 5' - TCCTAGGCATTCACCATA

---

### 3.1.6 Verbrauchsmaterial

Deckläser	Deckläser, Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, Deutschland
Objektträger	Knittel-Gläser, Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig, Deutschland
Glasgefäße	Erlmeyer-Kolben, Fa Schott, Mainz, Deutschland
Pipettenspitzen	DistriTip Maxi ST, Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich Costar Gel Loading Tip Round, Corning Costar GmbH, Bodenheim, Deutschland TipOne, Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland epT.I.P.S, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Purification Kit	Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing RR-100, Applied Biosystems, Foster City (CA), USA
Röhrchen	Tube 30 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland Cellstar® 50ml, Greiner Bio-One, Solingen, Deutschland
Sterilfilter	Sartolab P plus, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland Millex®-GV, Millipore, Bedford (MA), USA
Tubes	Standard Reaktionsgefäße, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
UV-Küvetten	PLASTIBRAND® UV-Küvette mikro, Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Zählkammer	KOVA® Glastic® Slide 10 with Grids, Hycor Biomedical GmbH, Kassel, Deutschland

### 3.1.7 Mikrotiterplatten

#### 1. MIKRONAUT-S Dr. Hunfeld MHK II

Katalog-Nr.: ES-217-100

Merlin-Diagnostika GmbH, Bornheim-Hersel, Deutschland

Antibiotika: Doxycyclin, Ceftriaxon

#### 2. MIKRONAUT-S All Atemwegs-Studie 2007

Katalog-Nr.: ES-237-100

Merlin-Diagnostika GmbH, Bornheim-Hersel, Deutschland

Antibiotika: Penicillin G, Amoxicillin, Ciprofloxacin, Levofloxacin

#### 3. MIKRONAUT-S Pneumokokken & Haemophilus 2

Katalog-Nr.: E1-933-100

Merlin-Diagnostika GmbH, Bornheim-Hersel, Deutschland

Antibiotika: Cefuroxim, Clarithromycin, Erythromycin

#### 4. MIKRONAUT-S Dr. Hunfeld *Borrelia* MHK-Studienplatte ABT

Katalog-Nr.: ES-170-001

Merlin-Diagnostika GmbH, Bornheim-Hersel, Deutschland

Antibiotika: Clarithromycin, Erythromycin

### 3.1.8 Lösungen

#### 3.1.8.1 Zusammensetzung der Puffer-Lösungen

##### **PBS-Puffer**

10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

150 mM  $\text{NaCl}$

Die Substanzen wurden nach Mischung ad 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt, auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt und anschließend bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

**TBE-Puffer (5 x konz.)**

450 mM	Tris
450 mM	Borsäure
10 mM	EDTA (pH 8,0)

Die Substanzen wurden nach Mischung ad 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und anschließend bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

**TE-Puffer**

10 mM	Tris/HCl (pH 8,0)
1 mM	EDTA (pH 8,0)

Der Puffer wurde sterilfiltriert und bei + 4 °C gelagert.

**TES-Puffer**

50 mM	Tris
50 mM	EDTA

15 % (w/v) Saccharose

Die Substanzen wurden nach Mischung ad 500 ml mit Aqua dest. aufgefüllt, auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt und anschließend sterilfiltriert.

**SDS in TES**

Zum TES-Puffer wurde 1% SDS zugefügt.

**3.1.8.2 Zusammensetzung sonstiger Lösungen****Ethidiumbromid-Lösung**

10 µg Ethidiumbromid wurden in 1 ml 0,5 x TBE-Puffer gelöst.

**Acrylamid-Lösung**

29,2 g (30 %)	Acrylamid
0,8 g (2,7 %)	Bisacrylamid
ad 100 ml	Aqua dest.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Herstellung von Borrelien-Nährmedium

Für die Kultivierung von Borrelien wurde ein spezielles, nährstoffreiches Kulturmedium verwendet. Dieses wird als Barbour-Stoenner-Kelly-Medium (BSK-Medium) bezeichnet und in 2 Arbeitsschritten hergestellt:

#### 1. Herstellung des Grundmediums

In einen 2-Liter-Kolben wurden folgende Stoffe eingewogen:

HEPES	12,0 g
Neopepton	10,0 g
Natrium-Citrat	1,4 g
Glucose	10,0 g
Natriumbicarbonat	4,4 g
Natrium-Pyruvat	1,6 g
N-Acetylglucosamin	0,8 g

Anschließend wurden dem Kolben 800 ml Aqua dest. sowie 200 ml CMRL1066 zugefügt. Ein weiterer Meßzylinder wurde mit 1000 ml Aqua dest. aufgefüllt und bis auf 100 ml in den Kolben gegeben. Das Stoffgemisch wurde mit Hilfe eines Magnetrührers bei ca. 500 U/min in Lösung gebracht.

Anschließend wurde mittels eines pH-Meters (Fa. Metrohm) durch Zugabe von 1-molarem NaOH unter ständigem Rühren der pH-Wert des Grundmediums auf 7,6 eingestellt. Die zugegebene Menge NaOH (ca. 30 ml) wurde dem übriggebliebenen Aqua dest. entnommen und der restliche Inhalt des Kolbens wurde dem Medium zugegeben. Gegebenenfalls musste der pH-Wert anschließend mit einigen Tropfen NaOH nachkorrigiert werden.

Das fertige Grundmedium wurde sterilfiltriert und in Portionen von je 500 ml in doppelt autoklavierte Glasflaschen abgefüllt.

Anschließend wurde das Grundmedium bei -20 °C eingefroren und war so bis zu 3 Monate haltbar.

## 2. Herstellung des Kulturmediums:

Kurz vor Verwendung wurden zu 1 Liter aufgetautem Grundmedium unter sterilen Bedingungen folgende Stoffe zugefügt:

200 ml	7 % Gelatine (autoklaviert)
72 ml	hitzeinaktiviertes Kaninchenserum
70 ml	35 % Rinderserumalbumin

Die Haltbarkeit des Kulturmediums beträgt bei 4 °C ca. 4 Wochen.

### **3.2.2 Herstellung und Verwendung von Phenolrot (konzentriert)**

30 ml Tubes (Fa. Sarstedt) wurden mit 20 ml BSK-Medium gefüllt. Darin wurden 24 mg Phenolrot mittels einer Feinwaage (Fa. Sartorius) eingewogen. Nach mehrfachem kräftigen Schütteln und 1-2 Stunden Inkubation im Brutschrank bei 33 °C wurde die gesättigte Phenolrot-Lösung (1,2 mg/ml) sterilfiltriert. Zum Schluss wurde 1 ml pro Röhrchen in ein Eppendorf-Tube abgefüllt und zur Kontaminationskontrolle für mehrere Tage im Brutschrank bei 33 °C inkubiert.

Die so zubereitete Phenolrot-Lösung ist bei einer Temperatur von 4 °C gelagert mehrere Monate verwendbar.

Der Farbstoff Phenolrot besitzt jeweils ein Absorptionsmaximum bei 562 nm und 630 nm. Im basischen pH-Bereich ist der Indikator rot gefärbt, und sein Absorptionsmaximum liegt bei 562 nm. Im sauren pH-Bereich ist er dagegen gelb gefärbt, und sein Absorptionsmaximum findet sich bei 630 nm.

Der Indikator wurde fertigem BSK-Medium zugegeben, bis diese Lösung bei photometrischer Messung bei einer Wellenlänge von 562/630 nm eine Extinktion von 1,9 erreicht hatte (ca. 2-4 ml Phenolrotkonzentrat auf 45 ml BSK-Medium). Dieses mit Farbstoff versetzte Medium wurde zur Messung der MHK (siehe 3.2.4) verwendet.

Da Borrelien bei ihrem Wachstum nicht-flüchtige Säuren als Stoffwechselprodukte in das Medium abgeben und damit eine zunehmende pH-Wert-Senkung des Milieus verursachen, kann man den Farbumschlag von Phenolrot als Indikator für das Borrelienumwachstum verwenden. Durch photometrische Messung (Power Wave 200™, Fa. BioTek Instruments) lässt sich eine Kinetikgraphik errechnen (Microwin 3.0, Fa. Microtek), in der sich der Farbumschlag von rot nach gelb bzw. das hierzu

proportionales Borrelienzellwachstum als fallende Kurve widerspiegelt (siehe Punkt 3.2.8. Abbildung 2).

### **3.2.3 Kultivierung von Borrelien**

Die Anzucht von Borrelienzellen erfolgte aus eingefrorenen Stammkulturen (-70 °C) im Brutschrank bei 33 °C unter mikroaerophilen Bedingungen. Die Stammkultur wurde in 10 ml BSK-Kulturmedium inkubiert und wöchentlich auf Vitalität der Zellen hin im Dunkelfeld-Mikroskop überprüft. Anschließend wurden 2 ml der initialen Kultur in 10 ml frisches BSK-Medium gegeben und wiederum bei 33 °C inkubiert. Weiteres Passagieren der Zellen in frischem BSK-Medium erfolgte alle 3-5 Tage je nach Vitalitätsgrad und Wachstumsdichte des jeweiligen Borrelien-Stammes.

Vitalitäts- und Kontaminationskontrollen erfolgten mittels Dunkelfeld-Mikroskopie.

10 Tage vor Beginn eines Versuches zur MHK- und MBK-Bestimmung wurde die jeweilige Passage eines Stammes in 20 ml frisches BSK-Medium überimpft. Die so erhaltenen 30 ml Flüssigkultur wurden nach 2-5 Tagen in 3 Portionen aufgeteilt und wieder mit je 20 ml frischem Medium versetzt. Dies wurde nach 2-5 Tagen wiederholt, um schließlich insgesamt 180 ml Flüssigkultur zum Einsatz in den Versuchen zu erhalten. Auch hier erfolgte auf jeder Stufe eine Vitalitäts- und Kontaminationskontrolle mittels Dunkelfeld-Mikroskopie.

### **3.2.4 RFLP-Analyse der 5S-23S rRNA Intergenic Spacer DNA**

#### **3.2.4.1 Durchführung der 5S-23S PCR**

Für diesen Versuch fand das nach der in 3.2.6.1 beschriebenen Methode hergestellte DNA-Konzentrat Verwendung. Obgleich der zu amplifizierende Genabschnitt chromosomal codiert ist, konnte das Konzentrat aus der Plasmidisolierung für diesen Versuch eingesetzt werden, da Spuren von chromosomaler DNA ausreichend sind, um eine PCR durchzuführen. Die gesamte RFLP-Analyse inklusive der vorausgehenden 5S-23S PCR, der Probenvorbereitung und Gelelektrophorese (siehe Punkt 3.2.4.2) wurden nach der von Postic et al. beschriebenen Methode durchgeführt [Postic 1994].

Für einen 100 µl PCR- Reaktionsansatz wurden folgende Substanzen auf Eis vorgelegt:

**Tabelle 3:** Reaktionsansätze für die 5S-23S PCR

Menge	Substanz
71,5 µl oder 70,5 µl	Aqua dest. Aqua dest. (je nach Menge der zugegebenen DNA)
10,0 µl	MgCl <sub>2</sub>
1,0 µl	Primer 1 (BB5s)
1,0 µl	Primer 2 (BB23s)
10,0 µl	d’NTPs
0,5 µl	Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)
1 - 2 µl	DNA (Probe)

Nach Zugabe der Taq DNA-Polymerase wurde die PCR nach folgendem Schema durchgeführt:

**Tabelle 4:** PCR-Bedingungen

Initialer Zyklus		
Temperatur	Dauer	Vorgang
94 °C	5 min	Denaturierung
Weitere 24 Zyklen		
Temperatur	Dauer	Vorgang
94 °C	1 min	Denaturierung
52 °C	1 min	Annealing
72 °C	30 sec	Amplifikation

Abschließend wurde noch eine Amplifikation von 7 min bei 72 °C durchgeführt, um „full-length“ amplifizierte DNA-Fragmente zu erhalten.

Nach Abschluss der PCR wurde eine Purifikation der DNA zur Entfernung des Primers und anderer unerwünschter Verunreinigungen vorgenommen (QIAquick® PCR Purification Kit (250), Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland).

Anschließend wurden die Amplifikate bei –20 °C oder +4 °C aufbewahrt.

### 3.2.4.2 Herstellung der Agarose-Gele, Probenvorbereitung und Durchführung der Gelelektrophorese

In einen 200 ml Erlmeyer-Kolben (Duran®, Fa. Schott) wurden 2 g Agarose und 100 ml 0,5-fach TBE-Puffer eingewogen. Der Kolben wurde in der Mikrowelle (Mikrowave&Grill, Fa. Severin) für ca. 3 min erwärmt und zwischendurch geschwenkt, bis keine Schlieren mehr sichtbar waren.

Anschließend wurde die Lösung in eine Gelkammer (HORIZON®11.14, Fa. GibcoBRL) eingebracht. Nach Einlegen von 2 Kämme wurde bis zum Erstarren des Gels abgewartet, und anschließend wurden die Kämme gezogen. Zum Schluss wurde die Gelkammer vollständig mit 0,5-fach TBE-Puffer aufgefüllt.

In einer leeren Mikrotiterplatte wurden je 3 µl Bromphenolblau (BPB) und 12 µl des Amplifikates aus der vorausgehenden PCR gemischt. Zusätzlich wurden 8 µl des Markes (123 bp DNA Ladder, Fa. Invitrogen) mit 45 µl TE-Puffer und ebenfalls mit 3 µl BPB versetzt. Mit einer Gilson-Pipette wurden dann je 15 µl der vorbereiteten Mischungen in die Geltaschen des Agarosegels pipettiert.

Die Amplifikate wurden anschließend bei 140 V (Netzgerät Consort E443, Fa. Fröbel Labortechnik) bei einer Laufzeit von 45 min im Gelelektrophorese-Apparat (HORIZON®11.14, Fa. GibcoBRL) aufgetrennt.

Dann wurde das 2 %ige Agarosegel zur Anfärbung der DNA für 20 min in ein Ethidiumbromid-Bad eingebracht, anschließend 30 min im Wasserbad entfärbt und mittels eines Geldokumentationssystems (Photoprint, Fa. Peqlab) unter UV-Bestrahlung betrachtet.

### 3.2.4.3 Restriktionsanalyse der 5S-23S PCR-Amplifikate

Die Restriktionsanalyse wurde ebenfalls nach der von Postic et al. beschriebenen Methode durchgeführt [Postic 1994].

Für einen Restriktionsansatz wurden folgende Substanzen auf Eis vorgelegt:

**Tabelle 5:** Restriktionsansätze für die RFLP-Analyse

Menge	Substanz
25,1 µl	Aqua dest.
4,0 µl	10 x NEB2
0,4 µl	BSA
0,5 µl	Mse I
10,0 µl	Amplifikat

Die vorbereiteten Restriktionsansätze wurden anschließend im Thermomixer bei 37 °C und 300 U/min für 5 Stunden inkubiert und anschließend bei –20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 3.2.4.4 Herstellung der Polyacrylamidgele für die RFLP-Analyse

Zur Herstellung eines 12 %igen Polyacrylamidgels wurden folgende Substanzen verwendet:

**Tabelle 6:** Herstellung des 12 %igen Polyacrylamidgels

Menge	Substanz
11,7 ml	Acrylamid-Lösung (30 % Acrylamid + 2,7 % Bisacrylamid)
6,0 ml	5 x TBE
3,0 ml	Glycerin
150 µl	APS
15 µl	TEMED
ad. 30 ml	Aqua dest.

Die Substanzen wurden in einem Standardzylinder gemischt, in eine Gelkammer (Glass plates und Casting clamps, Fa. Sigma) gegossen und nach Einsetzen eines Kammes wurde bis zur Polymerisation abgewartet. Anschließend wurde das fertige Polyacrylamidgel über Nacht im Kühlschrank gelagert.

### 3.2.4.5 Probenvorbereitung und Restriktionsanalyse

Die bei -20 °C eingefrorenen Proben wurden aufgetaut und anschließend kurz mit Hilfe eines Vortexers aufgemischt. Anschließend wurden je 20 µl eines Restriktionsansatzes mit 6 µl BPB versetzt. Zusätzlich wurden 4 µl des ersten Markers (pBR322 DNA-MspI Digest, Fa. New England Biolabs) mit 11 µl TE-Puffer und 6 µl BPB gemischt. Vom zweiten Marker (123 bp DNA Ladder, Fa. Invitrogen) wurden 2 µl verwendet, und diese mit 15 µl TE-Puffer und 6 µl BPB versetzt.

Das Polyacrylamidgel wurde in eine Gelkammer (Standardgelkammer, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH) eingebracht, die Gelreste über den Taschen wurden mit einem Skalpell entfernt, die Taschen anschließend mit 1 x TBE-Puffer gespült, und der Puffer wieder abgesaugt.

Die vorbereiteten Proben wurden schließlich vollständig in die Taschen eingebracht, und die Gelelektrophorese wurde bei 160 V und 5,8 mA für 2 Stunden und anschließend bei 200 V und 5,6 mA für weitere 4 Stunden durchgeführt.

Zur Anfärbung der DNA wurde das Polyacrylamidgel für 30 min in ein Ethidiumbromidbad eingebracht und nach 2 Stunden Entfärbung im Wasserbad mittels eines Geldokumentationssystems (Photoprint, Fa. Peqlab) unter UV-Bestrahlung betrachtet.

### 3.2.5 Sequenzierung und Alignment der 5S-23S Intergenic Spacer DNA

Zur Sequenzierung wurden die PCR-Amplifikate (siehe 3.2.4.1) zuerst mit Hilfe des QIA quick® PCR Purification Kit (Fa. Quiagen) nach Anleitung aufgereinigt, um überschüssige Primer aus der PCR zu entfernen.

Anschließend wurde für die Sequenzierungsreaktion auf Basis einer PCR folgender Ansatz gewählt:

**Tabelle 7:** Ansatz für die Sequenzierungsreaktion auf Basis einer PCR

Menge	Substanz
4 µl	Primer BB5s, Fa. TIB® Molbiol
4 µl	Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Fa. Applied Biosystems
10 µl	Aqua dest.
2 µl	gereinigtes Amplifikat

Die sich anschließende Amplifikation fand im Gene Amp® PCR-System (Fa. Applied Biosystems) unter folgenden Bedingungen statt:

**Tabelle 8:** Bedingungen für die PCR als Basis zur Sequenzierung der 5S-23S DNA

25 Zyklen		
Temperatur	Dauer	Vorgang
96 °C	10 sec	Denaturierung
60 °C	4 min	Amplifikation

Die durchgeführte Sequenzierungsreaktion basiert auf der Kettenabbruch-Methode nach Sanger. Im Unterschied zur PCR enthält der Reaktionsansatz nur einen Primer und zusätzlich zu den Nukleotiden vier mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Dideoxynukleotide mit fehlender OH-Gruppe (Terminatoren), die bei Einbau in die entstehende DNA-Kette zum Kettenabbruch führen.

Nach Beendigung der Reaktion wurden die Proben zur weiteren Bearbeitung an das Institut für Medizinische Virologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main übersandt.

Hier erfolgte eine erneute Aufreinigung der Proben und anschließend eine Analyse der Sequenzierprodukte im ABI 3100-Avant-System (Fa. Applied Biosystems). Bei dieser Methode wird die DNA in einer Kapillare elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt. Der untere Bereich der Kapillare wird kontinuierlich mit einem Laser gescannt. Gelangt ein Terminator in diesen Bereich, wird der jeweilige Fluoreszenzfarbstoff angeregt, und

die Emission mittels einer speziellen Kamera detektiert. Diese Daten werden im Computer aufgezeichnet und zu einer Sequenz zusammengefügt.

Das anschließende Sequenzalignment sowie die Erstellung des phylogenetischen Stammbaumes wurde durchgeführt mit Hilfe von Lasergene® Version 7.1 (Fa. DNASTAR) mit dem Modul MegAlign im Modus „Clustal method with weighted residue weight table“. Dieses Programm analysiert die Sequenzen des 5S-23S Intergenic Spacers aller getesteten Borrelienisolate und vergleicht diese miteinander. Hierdurch entsteht ein Stammbaum, der den Grad der Sequenzhomologie der einzelnen Isolate darstellt, und damit Rückschlüsse auf deren phylogenetische Herkunft zulässt.

### **3.2.6 Plasmidprofil-Analyse mittels PFGE**

#### **3.2.6.1 Plasmidisolierung**

Die Plasmidisolierung wurde entsprechend der von Barbour beschriebenen Methode durchgeführt [Barbour 1988a].

Für diesen Versuch wurden wie oben beschrieben jeweils 30 ml Flüssigkultur jedes Stammes angezchtet. Die Zellkulturen wurden bei 4 °C und 5000 U für 30 min abzentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit 500 µl TES-Puffer gewaschen und in ein 2 ml-Eppendorf-Tube überführt. Das Sediment wurde in 240 µl TES-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 2,4 µl Lysozym und anschließende 15-minütige Inkubation auf Eis wurde die bakterielle Zellwand gespalten. Es folgte die Zugabe von 300 µl 1 %igem SDS in TES und 7 µl DEPC, um die enzymatische Reaktion zum Stillstand zu bringen.

Durch Zugabe von 250 µl Ammoniumacetat (NH<sub>4</sub>Ac) wurden anschließend die verbleibenden Proteine zur Präzipitation gebracht, und diese durch 10-minütige Zentrifugation bei 12.000 x g und Raumtemperatur (RT) entfernt.

Anschließend wurde zur Fällung der DNA der Überstand mit 850 µl eiskaltem Isopropanol versetzt und für 30 min bei - 20 °C inkubiert. Es wurde daraufhin erneut zentrifugiert (11.000 x g, 25 min, 4 °C), das Sediment mit 500 µl Ethanol 70 % gewaschen, wieder zentrifugiert (12.000 x g, 10 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Sediment mit einer Vakuumzentrifuge vollständig getrocknet (Eppendorf Concentrator 5301, Fa. Eppendorf).

Der getrocknete Rückstand wurde in 300 µl TE-Puffer gelöst, nach 10 min mit 3 µl RNAse A [10 mg/ml] versetzt und dann 30 min bei 37 °C inkubiert. Wiederum wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 2 µl DEPC und anschließendem kräftigen

Schütteln für 5 min zum Stillstand gebracht. Unter Verwendung von 150 µl Ammoniumacetat wurden die Proteinreste durch 5-minütige Zentrifugation bei 11.000 x g für 5 min abgetrennt. Der Überstand wurde zur erneuten Fällung von Nukleinsäuren mit 1,3 ml eiskaltem Ethanol absolut versetzt, und es folgte eine 20-minütige Inkubation bei -20 °C. Dann wurde bei 11.000 x g und 4 °C für 30 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment mit 200 µl Ethanol 70 %ig gewaschen. Nach einer erneuten 5-minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 11.000 x g wurde der Überstand verworfen und das Sediment in der Vakuumzentrifuge vollständig getrocknet. Die so erhaltene Plasmid-DNA wurde mit 40 µl TE-Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -4 °C oder -20 °C gelagert.

### **3.2.6.2 Herstellung von Agarose-Gelen und Probenvorbereitung**

Zur Herstellung des 1 %igen Agarose-Gels wurden 1,2 g Agarose GTQ mit 120 ml TBE 0,5 % zusammen in einem Glasgefäß in der Mikrowelle erwärmt, bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Die fertige Lösung wurde bis auf einen Rest von 10 ml unter Vermeidung von Blasenbildung in eine Gelkammer (Standard Casting Stand, Fa. Bio-Rad Laboratories) gegeben.

Nach dem Erstarren wurde in die von links gesehen erste und letzte Tasche des Gels jeweils ein Marker eingebracht (links: Low Range PFG Marker; rechts: MidRange PFG Marker, beide Fa. New England Biolabs GmbH).

Mit der restlichen Agarose wurden die mit Marker bestückten Taschen überschichtet.

Zur Feststellung der Plasmid-Konzentration wurden die wie in Punkt 3.2.6.1 beschrieben präparierten Proben 1:10 mit Aqua dest. verdünnt und in Messküvetten (Plastibrand® UV-Küvette mikro, Fa. Brand GmbH) eingebracht. Anschließend wurde durch photometrische Messung (Ultrospec3100 pro, Fa. Amersham Biosciences) bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm die Konzentration der Plasmide in ng/µl bestimmt.

Pro Stamm wurden 200 ng Plasmid-DNA für die PFGE verwendet, daher errechnete sich die Menge des Plasmidkonzentrates, die auf das Agarose-Gel aufgetragen wurde, nach folgender Formel:

$$200 \text{ ng} : x \text{ ng}/\mu\text{l} = y \mu\text{l}$$

x: durch photometrische Messung bestimmte DNA-Konzentration

y: benötigte Menge des Plasmid-Konzentrats

---

Anschließend wurde die errechnete Probenmenge  $y$  mit Aqua dest. ad 10  $\mu$ l sowie mit je 3  $\mu$ l Bromphenolblau versetzt und vorsichtig gemischt.

### 3.2.6.3 PFGE und Plasmidprofilanalyse

Das wie in 3.2.6.2 beschrieben vorbereitete Agarose-Gel wurde in ein Pulsfeld-Gelelektrophorese-System (CHEF-DR® III, Fa. Bio-Rad Laboratories) eingebracht und mit den Plasmid-Proben bestückt.

Anschließend erfolgte die Auftrennung der Plasmide in 0,5-fach TBE-Puffer unter folgenden Bedingungen:

Initial time: 0,9 sec  
Final time: 2,5 sec  
Winkel: 300 °  
Spannung: 6,0 V/cm  
Laufzeit: 24 h  
Temperatur: 14 °C

Nach Auftrennung der Plasmide in der PFGE wurde das Agarosegel aus der Pufferlösung entnommen, und zur Anfärbung der DNA für 30 min in eine Ethidiumbromid-Lösung eingebracht. Anschließend wurde das Gel 20 min im Wasserbad entfärbt und dann unter UV-Licht betrachtet. Die Dokumentation des Agarosegels erfolgte mittels eines Geldokumentationssystems (Photoprint, Fa. Peqlab) unter UV-Bestrahlung.

Ethidiumbromid zeigt nach Interkalation zwischen die Basen der DNA ein verändertes Anregungsspektrum, sodass die auf dem Agarosegel vorhandenen Nukleinsäuren unter UV-Licht betrachtet fluoreszieren und somit sichtbar werden.

### 3.2.7 Qualitätskontrolle mit *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Zur methodischen Qualitätskontrolle der *in vitro* Resistenzbestimmung in BSK-Medium wurden die MHK-Werte von *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 entsprechend der Richtlinie M7-A7 des CLSI im Dreifachansatz bestimmt [CLSI 2006].

Mit Hilfe dieser Versuche sollten Wechselwirkungen zwischen dem Medium und den verwendeten antibakteriellen Substanzen unter Berücksichtigung der für das Wachstum der Borrelien benötigten verhältnismäßig langen Inkubationszeit dargestellt werden.

Dies schien wichtig, da für mehrere hier verwendete antibiotische Substanzen bereits ein Aktivitätszuwachs- bzw. verlust in BSK-Medium beobachtet wurde [Hunfeld 2006b]. Im Mittelpunkt der Betrachtung stand die Testung der chemischen Stabilität der Antibiotika, und damit einhergehend ihr möglicher Wirkungsverlust während der Inkubation.

Zu diesem Zweck wurden 100 µl BSK-Medium pro Well in den Mikrotiterplatten vorgelegt und über 48 h bei 33 °C inkubiert. Anschließend wurde eine Suspension von *S. aureus* ATCC 29213 in 0,9 %iger Kochsalzlösung hergestellt, und diese mittels eines Densitometers (Densimat, Fa. BioMerieux) auf eine Trübung entsprechend dem McFarland-Standard 0,5 eingestellt. Dies entspricht einer Dichte von  $10^7$  KBE/ml.

Schließlich wurde diese Suspension 1:5 mit 0,9 %iger Kochsalzlösung verdünnt. Je 5µl dieser Verdünnung wurden mit weiteren 95 µl BSK-Medium versetzt in die Wells gegeben und nochmals 20 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der MHK des Referenzstammes auf Basis der Knopfbildung und der Trübung des Mediums in den einzelnen Wells.

### **3.2.8 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)**

Zur Bestimmung der MHK wurde eine standardisierte kolorimetrische Mikrodilutionsmethode verwendet [Hunfeld 2000a]. Die einzelnen Isolate wurden wie oben beschrieben in 30 ml-Röhrchen (Fa. Sarstedt) angezüchtet. Am Tag der Testung wurden die Flüssigkultur in 50 ml-Röhrchen (Fa. Greiner Bio-One) überführt und anschließend bei 4 °C und 5000 U/min für 30 min zentrifugiert (Varifuge 3.OR, Fa. Heraeus Instruments).

Der entstandene Überstand wurde unter der Sicherheitswerkbank (HeraSafe, Fa. Heraeus Instruments) abgossen, die übrigbleibenden Borrelien-Pellets wurden mit 600 µl vorinkubiertem BSK-Medium resuspendiert und in einem einzigen Röhrchen vereint. Von dem Borrelienkonzentrat wurden 20 µl entnommen und anschließend eine Verdünnungsreihe mit vorgelegtem PBS-Puffer angefertigt (1:100, 1:1000, 1:2000, 1:4000). Aus jeder Verdünnungsstufe wurde ein Aliquot von 10 µl entnommen und in eine Zählkammer (KOVA® Glastic® Slide 10 with Grids, Fa. Hycor Biomedical GmbH) eingebracht. Die Verdünnungsstufen wurden unter dem Mikroskop (Standard 25, Fa. Carl Zeiss AG) zuerst bei 10-facher Vergrößerung betrachtet, dann wurde die zur genauen Zählung günstigste Verdünnung ausgewählt. Der Durchschnitt aus 9 Kleinstquadraten ergab multipliziert mit dem Kammerfaktor 90 und der jeweiligen

---

Verdünnung die Anzahl der Borrelien pro  $\mu\text{l}$  im Konzentrat. Daraus wurde die Menge an Konzentrat errechnet, die zur Einstellung des Inokulums auf eine Dichte von  $2,5 \times 10^7$  Borrelien/ml bzw.  $5 \times 10^6$  Borrelien pro Well (200  $\mu\text{l}$ ) benötigt wurde. Die Stammlösung zur Befüllung der Mikrotiterplatten bestand aus BSK-Medium, welches mit konzentriertem Phenolrot auf eine Extinktion von 1,9 eingestellt wurde, und zugefügtem Konzentrat.

Es wurden 4 verschiedene Mikrotiterplatten verwendet, die jeweils mit geometrisch verdünnten Konzentrationen der zu testenden Antibiotika beschickt waren (siehe Anhang Tabelle 32 und Tabelle 33). Nach Befüllung der Mikrotiterplatten mit je 200  $\mu\text{l}$  Stammlösung pro Well unter der Sicherheitswerkbank wurden die Platten mit Klebefolie luftdicht verschlossen, und es wurde umgehend die Anfangs-Extinktion ( $E_0$ ) mittels photometrischer Messung (Power Wave 200™, Fa. BioTek Instruments) bei einer Wellenlänge von 562/630 nm festgestellt. Eine detaillierte Darstellung der Funktion des Farbstoffes Phenolrot bei der photometrischen Bestimmung der MHK gibt Abschnitt 3.2.2.

Anschließend wurden die Mikrotiterplatten bei 33 °C im Brutschrank (Heraeus Typ B5060, Fa. Heraeus Instruments) bebrütet, und jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubation wurde erneut photometrisch die Extinktion gemessen. Als MHK wurde die niedrigste Konzentration des jeweiligen Antibiotikums gewertet, bei der nach 72-stündiger Inkubation bei 33 °C kein Borrelienumwachstum feststellbar war.

Zumeist war initial bei der 2. Messung nach 24 Stunden in allen Wells sogar ein Anstieg der Extinktion und damit eine Hebung der Kurve zu vermerken, da der unvermeidlich unter der Folie mit eingeschlossene Sauerstoff initial zu einer Verdunkelung des Farbstoffes und damit zu einer Steigerung der Extinktion führte. Anschließend kam es auch in Wells mit hemmender Konzentration der Antibiotika wieder zu einem Absinken der Extinktion, da auch hier innerhalb der ersten 24-36 Stunden Inkubation eine geringe restliche metabolische Aktivität der Borrelien vorhanden ist, bevor es zum endgültigen Einsetzen des bakteriostatischen bzw. bakteriziden Effektes der Antibiotika kommt.

Um diesen Effekten Rechnung zu tragen und den genauen Grenzpunkt festzulegen, ab dem eine definitive Hemmung des Wachstums durch das Antibiotikum stattgefunden hatte, wurden die Extinktionen zu den Zeitpunkten  $t_0$  und  $t_{72}$  miteinander verglichen, und die Entscheidung über Wachstum bzw. Hemmung des Wachstums rechnerisch nach folgender Formel getroffen:

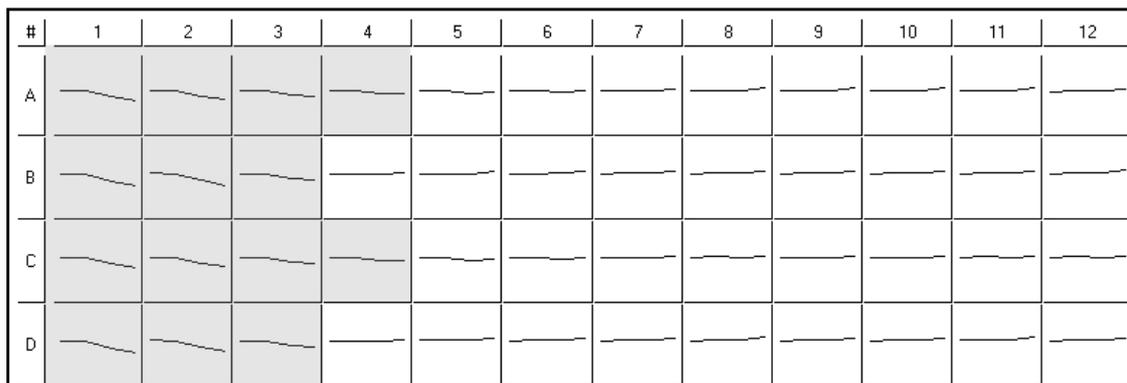
$(E_0 - 10\%) > E_{72}$ : Wachstum

$(E_0 - 10\%) < E_{72}$ : kein Wachstum

Ein Abfall der Extinktion um mehr als 10 % innerhalb von 72 Stunden Inkubation wurde folglich als positiv bezüglich des Borrelienwachstums gewertet. Sank die Extinktion innerhalb der Inkubationszeit um weniger als 10 %, so wurde diese Konzentration als hemmend auf die Borrelien betrachtet [Hunfeld 2003, Hunfeld 2005, Kraiczy 2001].

Aus den 4 Messwerten wurde zusätzlich mittels einer speziellen Software (Microwin 3.0, Fa. Microtek) eine Kinetikgraphik errechnet, in der sich das Wachstum der Borrelien als fallende Kurve widerspiegelt (siehe Abbildung 2).

Die Bestimmung der MHK wurde in drei unabhängigen Versuchsansätzen durchgeführt und als Median dieser Experimente berichtet.



**Abbildung 2: Darstellung des Prinzips der kinetischen MHK-Bestimmung mit Microwin 3.0 (Microtek, Deutschland)**

Grau unterlegte Felder zeigen abfallende Kurven bzw. Wells mit Extinktionsabfall in Folge von Wachstum und Stoffwechsel der Borrelien an.

### 3.2.9 Bestimmung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK)

Zur Bestimmung der MBK wurde eine konventionelle Subkultivierungsmethode verwendet [Hunfeld 2000b].

Nach der unter Punkt 3.2.4 beschriebenen 72-stündigen Inkubation der Mikrotiterplatten wurden aus allen Wells ohne Wachstum (d. h. ohne photometrisch messbaren Farbumschlag) unter sterilen Bedingungen Aliquote von 18  $\mu$ l (bzw. 1,9  $\mu$ l für die Makrolid-Antibiotika Erythromycin und Clarithromycin) entnommen und in Eppendorf-Tubes mit 1332  $\mu$ l (bzw. 1900  $\mu$ l) frischem BSK-Medium verdünnt. Auf diese Weise wurde eine Verdünnung des enthaltenen Antibiotikums von 1:75 (1:1000 für die Makrolide) erreicht. Dies war wichtig, um eine Antibiotikakonzentration zu erhalten,

die deutlich unter der MHK der jeweiligen Substanz lag. Damit wurde verhindert, dass das Antibiotikum weiterhin einen hemmenden Effekt auf die Kultur hatte.

Anschließend wurden die Tubes für weitere 3 Wochen im Brutschrank bei 33 °C inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte eine erste makroskopische Beurteilung des Farbumschlags im Medium gefolgt von einer Betrachtung der Flüssigkultur im Dunkelfeldmikroskop (Standard 25, Fa. Carl Zeiss AG). Pro Tube wurden 6 µl entnommen und auf einen Objektträger aufgebracht. Anschließend wurden 5 Sichtfelder auf das Vorhandensein von Borrelien untersucht. Als MBK wurde die niedrigste Konzentration des Antibiotikums gewertet, bei der nach 72-stündiger Inkubation unter Einfluss der Substanz und anschließender 3-wöchiger Subkultivierung keine Borrelien mehr auffindbar waren. Die Bestimmung der MBK wurde ebenfalls in drei unabhängigen Versuchsansätzen durchgeführt und als Median dieser Experimente berichtet [Hunfeld 2000b].

### **3.2.10 Durchführung von Abtötungskinetiken**

Für die Erstellung der Abtötungskinetiken wurde der *B. spielmanii*-Stamm PC Eq 17 verwendet. Dieser wurde analog zur unter Punkt 3.2.4 beschriebenen Methode zur kolorimetrischen Bestimmung der MHK auf eine Inokulumsdichte von  $5 \times 10^6$  Borrelien/Well ( $2,5 \times 10^7$  Borrelien/ml) eingestellt und auf insgesamt 5 Mikrotiterplatten aufgebracht, die mit geometrisch verdünnten Konzentrationen der Antibiotika Doxycyclin und Ceftriaxon beschickt waren (siehe Tabelle 10 und Tabelle 11).

Diese beiden Substanzen wurden ausgewählt, da sie zum Einen eine nachgewiesene hohe Effizienz gegen Borrelien besitzen und damit zu den Standardmedikamenten in der Therapie der Lyme Borreliose gehören. Zum Anderen schien es wichtig, mit Hilfe der Abtötungskinetiken auch die Unterschiede zwischen antibiotischen Substanzen mit verschiedenem Wirkungsmechanismus darzustellen, weshalb je ein bakterizides (Ceftriaxon) und ein bakteriostatisches (Doxycyclin) Antibiotikum zum Einsatz kam.

Die Mikrotiterplatten wurden wie üblich bei 33 °C im Brutschrank inkubiert und nach 0, 24, 48, 72, 96 und 120 Stunden wurde die Extinktion mittels photometrischer Messung bestimmt. Im Anschluss an diese Messung wurde jeweils eine Mikrotiterplatte geöffnet, um sämtliche Wells einzeln mittels Zählkammer im Dunkelfeldmikroskop auszählen zu können. Je nach Bedarf wurden die aus jedem Well entnommenen 50 µl bis zu 80-fach verdünnt, um eine gut auszählbare Inokulumsdichte zu erhalten.

Als Indikatoren für die Lebensfähigkeit der Borrelien wurden analog zu den Versuchen von Hunfeld et al. deren Motilität und Morphologie herangezogen. Dem entsprechend gingen in die Zählung nur morphologisch intakte und bewegliche Zellen ein [Hunfeld 2004, Kraiczy 2001].

Aus der Zählung wurde mittels folgender Formel die jeweilige Gesamtzahl von Borrelien pro Well zu einem bestimmten Zeitpunkt bestimmt:

$$B_{\text{ges.}} = B_{\text{gez.}} \times \text{Kammerfaktor} \times \text{Verdünnung} \times 200 \mu\text{l}$$

$B_{\text{ges.}}$ : Gesamtzahl Borrelien pro Well (200  $\mu\text{l}$ )

$B_{\text{gez.}}$ : Gesamtzahl Borrelien in 9 Kleinstquadraten der Zählkammer

Kammerfaktor: 90

Die hieraus errechnete Anzahl vitaler Borrelien in einem ml Inokulumssuspension in jedem einzelnen Well unter Einfluss der verschiedenen eingesetzten Konzentrationen der Antibiotika zu den Zeitpunkten  $t_0$ ,  $t_{24}$ ,  $t_{48}$ ,  $t_{72}$ ,  $t_{96}$  und  $t_{120}$  wurde anschließend graphisch dargestellt (Microsoft® Office Excel 2003, Fa. Microsoft).

Die errechneten Werte für alle Konzentrationen sowie für die Wells ohne Antibiotikum, dargestellt als Mittelwert aus 2 Versuchen, zeigen Tabelle 41 und Tabelle 42 im Anhang. Die graphische Darstellung dieser Experimente zeigen Abbildung 9 (Doxycyclin) und Abbildung 10 (Ceftriaxon).

### 3.2.11 Statistische Analyse

Zur statistische Analysierung der gemessenen MHK- und MBK-Werte bzw. um mögliche Unterschiede in der antibiotischen Empfindlichkeit zwischen *B. spielmanii* und den übrigen humanpathogenen Genospezies aufzudecken, wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet [Kruskal 1953, 1952]. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe von BIAS (Version 8.3.8., Epsilon Verlag, Hochheim, Deutschland).

Dieser Test (Varianzanalyse von Rangdaten) ist eine Erweiterung des U-Tests (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test), welcher zum Vergleich von zwei Gruppen bei Vorliegen von wenigstens ordinalskalierten Merkmalen dient. Beide Testarten werden der nicht-parametrischen Statistik zugeordnet.

Der Kruskal-Wallis-Test prüft die Nullhypothese  $H_0$ , dass p Populationen sich nicht unterscheiden. Hierdurch können mehrere Gruppen bewertet werden, wobei keine Voraussetzungen an die Verteilung der Populationen (verteilungsfrei) geknüpft werden.

---

In den Daten wird nur die ordinale Information oder Ranginformation genutzt. Die Daten aus allen  $p$  Stichproben werden zusammengeworfen und in eine Reihenfolge gebracht. Anschließend werden den Daten Rangplätze zugeordnet, und für jede Stichprobe wird die Rangsumme  $T$  berechnet. Mit Hilfe der Rangsumme  $T$  lässt sich weiterhin als Prüfgröße des Kruskal-Wallis-Tests ein sogenannter  $H$ -Wert berechnen. Dieser folgt einer Chi-Quadrat-Verteilung mit  $p - 1$  Freiheitsgraden. Die berechnete Prüfgröße  $H$  wird mit einer theoretischen Größe aus der Chi-Quadrat-Verteilung für eine gewählte Irrtumswahrscheinlichkeit verglichen. Ist der errechnete  $H$ -Wert größer als der  $H$ -Wert aus der Chi-Quadrat-Tabelle, wird  $H_0$  verworfen. Es besteht also ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Mit diesem Verfahren sollten mögliche Heterogenitäten in den Antibiotika-Empfindlichkeitsmustern von Borrelien untersucht bzw. aufgedeckt werden. Als signifikant wurde  $p < 0,05$  angesehen.

Mit Hilfe dieses Test wurden sowohl ein Vergleich der Genospezies *B. spielmanii* mit der Gesamtheit der übrigen humanpathogenen Genospezies durchgeführt (2-Gruppenanalyse), als auch durch Erweiterung der Berechnungen um den Post-Test nach Dunn [Dunn 1946] ein Vergleich aller 4 Genospezies untereinander durchgeführt (4-Gruppenanalyse).

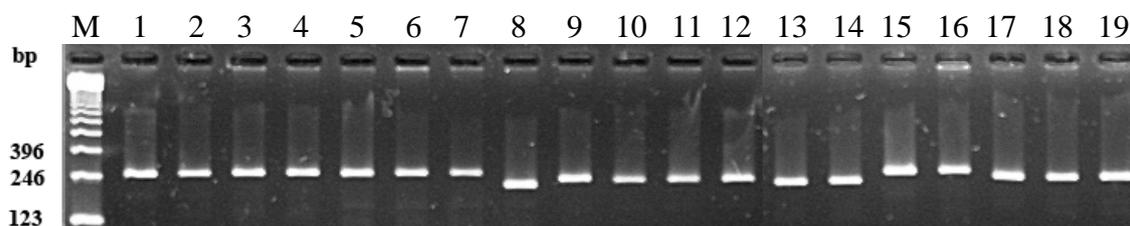
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Genetische Charakterisierung der Isolate

#### 4.1.1 5S-23S PCR

Die 5S-23S Intergenic Spacer Region aller Isolate wurde wie in 3.2.4.1 beschrieben nach der Methode von Postic et al. mittels PCR amplifiziert, und die Amplifikate wurden anschließend auf einem 2 %igen Agarosegel durch Gelelektrophorese und anschließende Färbung der DNA mit Ethidiumbromid dargestellt [Postic 1994].

Das Ergebnis dieses Versuches zeigt Abbildung 3.



**Abbildung 3: Gelelektrophorese der 5S-23S Intergenic Spacer Region von *B. burgdorferi* s.l.-Isolaten auf einem 2 %igen Agarosegel**

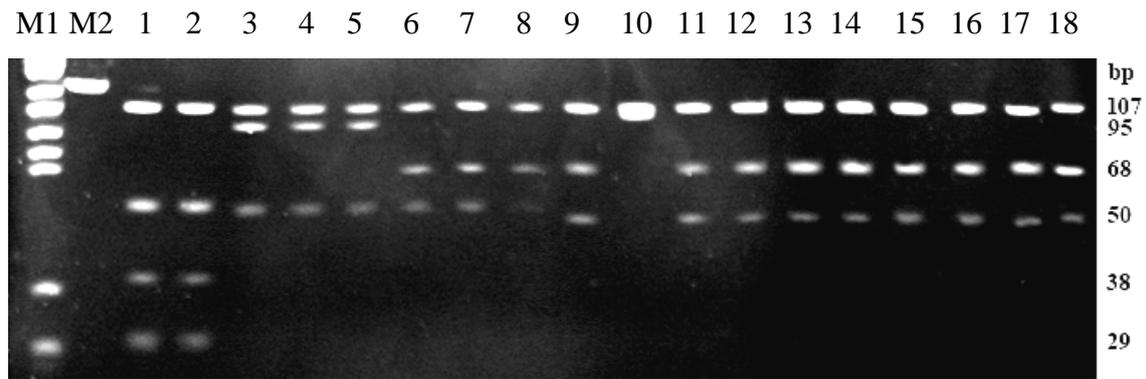
M: 123 bp DNA Ladder, 1: B31e2, 2: G1, 3: M1622, 4: M2094, 5: FEM1, 6: G600, 7: G1039, 8: PC Eq 17, 9: PMew, 10: PMai, 11: PSigII, 12: PHap, 13: PANz, 14: PJes, 15: LW2, 16: PStH, 17: A14S, 18: TIsarIII, 19: TIsarII  
1,15: *B. burgdorferi* s.s.; 2-4, 16: *B. garinii*, 5-7: *B. afzelii*; 8-14, 17-19: *B. spielmanii*

Der als Größenstandard verwendete 123 Basenpaar-Marker (123 bp DNA Ladder, Fa. Invitrogen) zeigt Fragmente im Bereich um die 246 bp-Markierung an. Dabei sind die DNA-Fragmente der Genospezies *B. spielmanii* (Spur 8-14 und 17-19) etwas kleiner, als die der übrigen Isolate. So liegen die *B. spielmanii* DNA-Amplifikate alle unterhalb der 246 bp-Markierung, die Amplifikate der Referenzstämme sind jedoch größer als 246 bp. Das kleinste Fragment zeigt der Stamm PC Eq 17 (Spur 8).

Zur weiteren Differenzierung der 5S-23S PCR-Amplifikate und als Basis für ein Sequenzalignment der Isolate wurde eine Sequenzierung durchgeführt (siehe Punkt 3.2.5).

#### 4.1.2 RFLP-Analyse der 5S-23S Intergenic Spacer Region

Nach Verdauung der Amplifikate aus der 5S-23S PCR mittels der Restriktionsendonuklease Mse I und anschließender Auftrennung der Fragmente mittels Gelelektrophorese auf einem 12 %igen Polyacrylamidgel ergab sich das in Abbildung 4 dargestellte Bild.



**Abbildung 4: RFLP-Analyse der 5S-23S Intergenic Spacer Region von *B. burgdorferi* s.l.-Isolaten**

Die mittels PCR amplifizierte DNA wurde unter Zugabe der Restriktionsendonuklease Mse I aufgespalten und anschließend durch Gelelektrophorese auf einem 12 %igen Polyacrylamidgel dargestellt; M1: pBR322 DNA-MspI Digest, M2: 123 bp DNA Ladder, 1,2: B31e2, LW2 (*B. burgdorferi* s.s.), 3,4,5: PStH, M1622, M2094 (*B. garinii*), 6,7,8: FEM1, G600, G1039 (*B. afzelii*), 9-18: A14S, PC Eq 17, PMew, PMai, PSigII, PHap, PANz, PJes, TIsarII, TIsarIII (*B. spielmanii*)

Spur 1 und 2 zeigen *B. burgdorferi* s.s.-Isolate. Das Restriktionsmuster entspricht dem von Postic et al. beschriebenen Muster A mit 108, 51, 38 und 29 bp. Die Spuren 3-5 zeigen *B. garinii*-Isolate mit dem für diese Genospezies typischen RFLP-Muster B (108, 95 und 50 bp). Die auf den Spuren 6-8 aufgetragenen *B. afzelii*-Isolate weisen das Muster D mit 108, 68, 50 und 20 bp auf. Kleine Fragmente sind auf dem Gel wie auch in diesem Fall so gut wie nicht darstellbar und müssen im Zweifelsfall mittels Sequenzierung ermittelt werden [Postic 1994].

Die Spuren 9-18 zeigen das Restriktionsmuster der getesteten *B. spielmanii*-Isolate. Dieses ähnelt in hohem Maße dem RFLP-Muster von *B. afzelii*.

Des Weiteren war auffällig, dass der Stamm PC Eq 17 (Spur 10) nach Verdauung mit Mse I nur ein einziges großes Fragment im Bereich von 107 bp aufwies. Bei wiederholter Durchführung des Versuches ergab sich das selbe Ergebnis, weshalb bei diesem Stamm von einer Mutation im Bereich des 5S-23S Intergenic Spacers ausgegangen werden muss, welche diesen DNA-Bereich für das verwendete Restriktionsenzym inkompatibel macht.

Da mit Hilfe der Methode von Postic et al. zwar eine Abgrenzung von *B. burgdorferi* s.s. und *B. garinii*, jedoch keine eindeutige Unterscheidung von *B. afzelii* und *B. spielmanii* möglich war, wurden weitere molekulargenetische Methoden zur Differenzierung herangezogen.

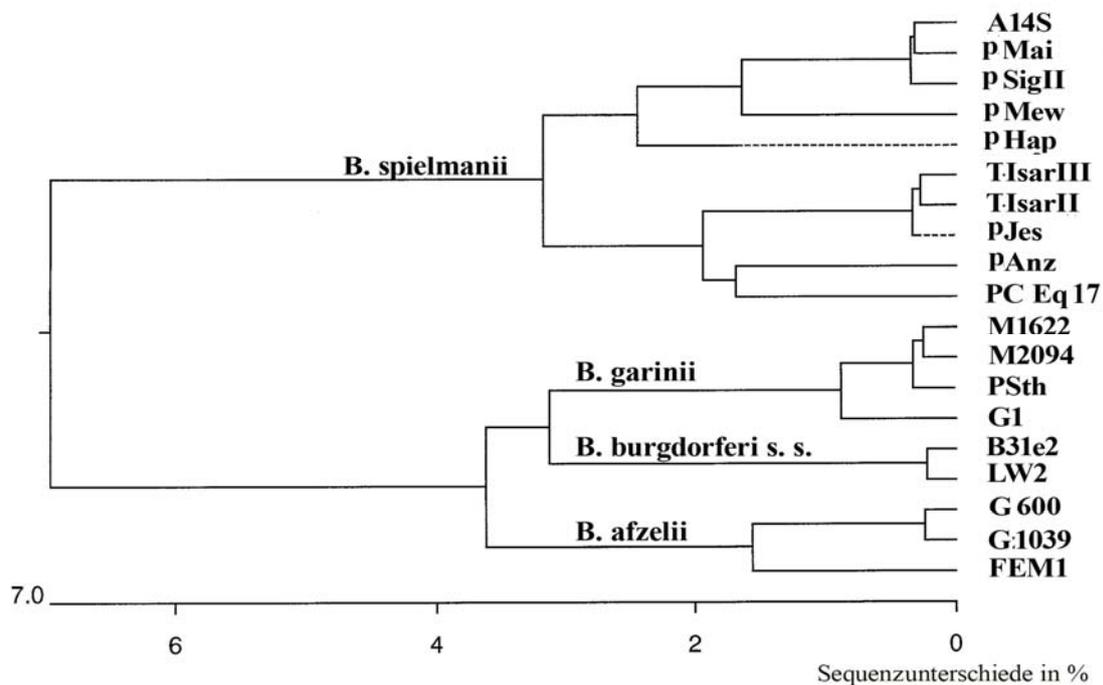
#### 4.1.3 Phylogenetischer Stammbaum auf Basis der 5S-23S Intergenic Spacer-Sequenzen der untersuchten Stämme

Bei der Sequenzierung der 5S-23S Intergenic Spacer DNA ergaben sich für diese Nukleinsäure-Fragmente Längen zwischen 186 und 234 bp. Dabei waren, wie bereits Abbildung 3 vermuten ließ, die 5S-23S Intergenic Spacer von *B. spielmanii* deutlich kleiner (185-211 bp) als die Intergenic Spacer der übrigen Genospezies (214-236 bp).

Im Anschluss an die Sequenzierung der 5S-23S PCR-Amplifikate wurde eine phylogenetische Analyse mittels der Software Lasergene® Version 7.1 (Fa. DNASTAR) durchgeführt. Die phylogenetische Analyse der getesteten *B. burgdorferi* s.l.-Isolate basierend auf den Sequenzen der 5S-23S Intergenic Spacer DNA mit Hilfe von Lasergene® (Modus: Clustal method with weighted residue weight table) ergab den in Abbildung 5 dargestellten phylogenetischen Stammbaum.

Dieser verdeutlicht die evolutionären Beziehungen zwischen den Genospezies, die sich in den Unterschieden der Sequenz des betrachteten Genabschnittes widerspiegeln.

Als nicht-codierende Region unterliegt der 5S-23S Intergenic Spacer keinem Selektionsdruck und ist daher für diese Methode besonders gut geeignet.



**Abbildung 5: Phylogenetischer Stammbaum von *B. burgdorferi* s.l. auf Basis der Sequenzen der 5S-23S Intergenic Spacer DNA**

Sequenzalignment durchgeführt mit MegAlign (Lasergene® Version 7.1, Fa. DNASTAR), Erstellung des Stammbaumes im Modus „Clustal method with weighted residue weight table“. Die x-Achse zeigt Unterschiede in den DNA-Sequenzen der einzelnen Isolate in % an.

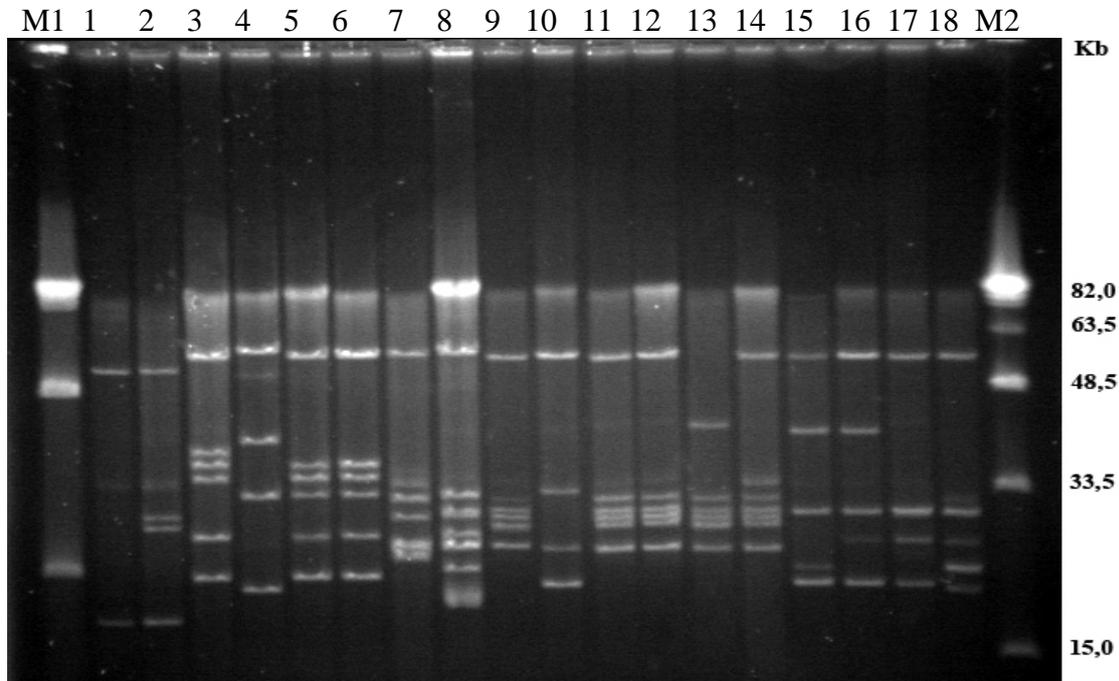
Mit Hilfe des Sequenzalignments des 5S-23S Intergenic Spacers war eine eindeutige Zuordnung aller Isolate zu ihrer Genospezies möglich. Dabei bestätigte sich die bereits von anderen Autoren beobachtete hohe Variabilität dieses Locus innerhalb einer Genospezies verglichen mit anderen Gen-Loci [Richter 2006].

*B. spielmanii* clustert in 2 Gruppen mit einer Sequenzhomologität von 97 % zwischen diesen beiden Gruppen. Diese Beobachtung steht in Einklang mit der von Fingerle et al. mit einer vergleichbaren Anzahl von Isolaten durchgeführten genetischen Analyse [Fingerle 2007a]. Die Sequenzübereinstimmung mit den übrigen humanpathogenen Genospezies lag bei mehr als 93 %.

Mit dieser Methode konnte in Ergänzung zur RFLP-Analyse mit Mse I sicher und eindeutig zwischen allen humanpathogenen Borrelien-Genospezies unterschieden werden. Auch die Zugehörigkeit des Isolates PC Eq 17 zur Genospezies *B. spielmanii* konnte bestätigt werden.

#### 4.1.4 Plasmidprofilanalyse mittels PFGE

Die Plasmidprofilanalyse mittels PFGE nach der Methode von Barbour et. al. ergab für die einzelnen Isolate die in Abbildung 6 dargestellten Resultate [Barbour 1988a].



**Abbildung 6: Plasmidprofile von *B. burgdorferi* s.l.-Isolaten dargestellt mittels PFGE auf einem 1 %igen Agarosegel**

M1: Low Range PFG Marker, 1,2: B31e2, LW2 (*B. burgdorferi* s.s.), 3,4,5,6: PSth, G1, M1622, M2094 (*B. garinii*), 7, 8: FEM1, G600 (*B. afzelii*), 9-18: A14S, PC Eq 17, PMew, PMai, PSigII, PHap, PAnz, PJes, TIsarII, TIsarIII (*B. spielmanii*), M2: MidRange PFG Marker (Fa. New England Biolabs GmbH)

Abbildung 6 zeigt die Plasmidmuster von 18 bezüglich ihrer MHK und MBK getesteten *B. burgdorferi* s.l.-Isolate. Die Spuren 1 und 2 zeigen Isolate der Genospezies *B. burgdorferi* s.s., auf den Spuren 3-6 sind *B. garinii*-Isolate aufgetragen. Spur 7 und 8 zeigen *B. afzelii*-Isolate, und die Spuren 9-18 zeigen das Plasmidmuster aller getesteten *B. spielmanii*-Isolate.

Die Anzahl der Plasmide der Isolate reichte von 4 bis 7, und die Größe der Plasmide betrug zwischen 16 und 62 Kilobasen (kb). Die Mehrzahl der Plasmide lag im Bereich zwischen 20 und 33 kb. Diese Angaben beziehen sich auf die Lage der Plasmide im Gel und wurden relativ zum ganz rechts aufgetragenen MidRange PFG-Marker angegeben. Sie spiegeln nicht die exakte molekulare Größe der Plasmide wieder.

---

Alle Isolate mit Ausnahme des *B. spielmanii*-Isolates PSigII (Spur 13) wiesen ein einziges großes Plasmid im Bereich von ca. 50 kb auf. Dieses lineare Plasmid ist Träger der beiden Proteine OspA und OspB [Barbour 1988b, Casjens 1993].

Im Bereich unterhalb von 33 kb lassen sich bei Betrachtung des Plasmidmusters der *B. spielmanii*-Isolate deutlich zwei Gruppen unterscheiden.

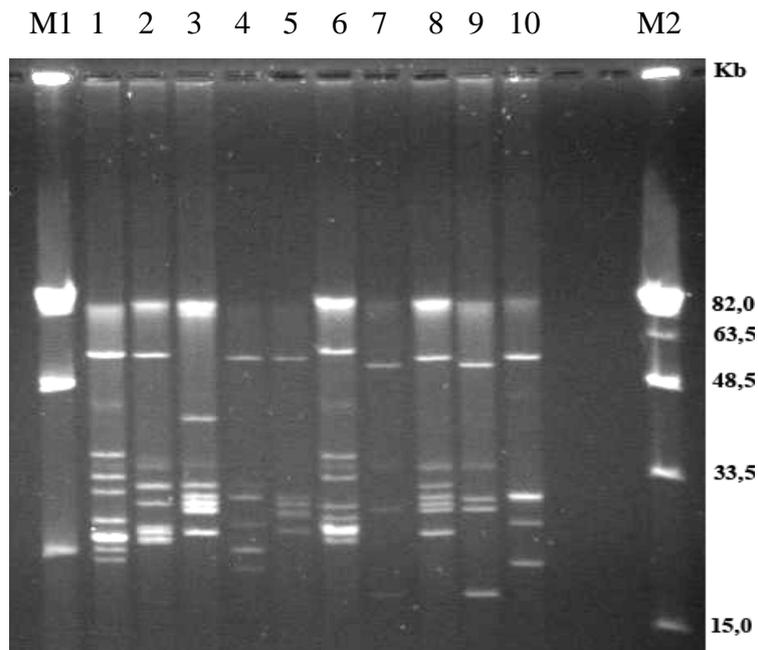
Starke Ähnlichkeit bezogen auf das Plasmidmuster besitzen die *B. spielmanii*-Isolate A14S, PMew, PMai, PHap und PSigII, welche ein charakteristisches Muster von 5 Plasmiden im Bereich unterhalb von 33 kb aufweisen. Auch bei den Stämmen PJes, PANz, TIsarII und TIsarIII lassen sich deutliche Übereinstimmungen finden. Alle diese Isolate besitzen ein charakteristisches Plasmid mit ca. 30 kb und eines mit ca. 20 kb. Der Stamm PC Eq 17 nimmt insofern eine Zwischenstellung ein, da er sowohl ein für die erstgenannte Gruppe typisches Plasmid als auch ein in der zweitgenannten Gruppe vorkommendes Plasmid besitzt. Da PC Eq 17 jedoch nicht die für die erstgenannte Gruppe typische Formation von 5 Plasmiden besitzt, ist er eher der 2. Gruppe zuzuordnen.

Die Ähnlichkeiten zwischen den Isolaten decken sich nur teilweise mit der geographischen Herkunft der jeweiligen Isolate (siehe Tabelle 2).

Ein exakt identisches Plasmidmuster zeigten die *B. garinii*-Isolate M1622 und M2094 sowie die *B. spielmanii*-Isolate PMew und PMai ebenso wie PJes und PANz.

Die beiden erstgenannten Isolate stammen aus zwei aufeinanderfolgenden Hautbiopsaten eines Patienten, die *B. spielmanii*-Isolate jedoch von unterschiedlichen Patienten.

Zur Ergänzung und Bestätigung der Ergebnisse wurde ein zweites Agarosegel angefertigt, auf dem zusätzlich die Plasmidprofile der beiden *B. afzelii*-Isolate EB1 sowie G1039 dargestellt wurden. In Abbildung 7 sind die Spuren 1, 2 und 6 der Genospezies *B. afzelii* zuzuordnen, die Spuren 7 und 9 stellen *B. burgdorferi* s.s. dar, und die Spuren 3, 4, 5, 8 und 10 zeigen Isolate von *B. spielmanii*.



**Abbildung 7: Plasmidprofile von *B. burgdorferi* s.l.-Isolaten dargestellt mittels PFGE auf einem 1 %igen Agarosegel**

M1: Low Range PFG Marker, 1: EB1, 2: FEM1, 3: PSigII, 4: TIsarII, 5: A14S, 6: G1039, 7: B31, 8: PHap, 9: LW2, 10: TIsarIII, M2: MidRange PFG Marker (Fa. New England Biolabs GmbH);

1, 2, 6: *B. afzelii*; 7, 9: *B. burgdorferi* s.s.; 3-5, 8, 10: *B. spielmanii*

Hier liegt die Anzahl der Plasmide zwischen 4 und 9 pro Isolat. Die Isolate G1039 und G600, welche aus zwei aufeinanderfolgenden Hautbiopsaten eines Patienten stammen, zeigen kein identisches Plasmidmuster. Auch hier findet sich für alle Isolate mit Ausnahme des Stammes PSigII ein großes Plasmid von ca. 49 kb. Wiederum liegt der Großteil der Plasmide zwischen 20 und 33 kb.

Ebenfalls fällt auf, dass das oberhalb von 50 kb liegende größte Plasmid, welches bekanntermaßen für die genetische Information für die Proteine OspA und OspB enthält [Casjens 1993], bei den *B. burgdorferi* s.s.-Isolaten deutlich kleiner ist, als bei den übrigen Isolaten.

Beim Vergleich der Ergebnisse der Plasmidprofilanalyse mit den Ergebnissen der Sequenzanalyse der Intergenic Spacer DNA lässt sich feststellen, dass die Aufteilung der *B. spielmanii*-Isolate in zwei Gruppen auf Basis ihres Plasmidmusters sich exakt mit der Auftrennung dieser Isolate im phylogenetischen Stammbaum auf Basis der Sequenz ihrer 5S-23 Intergenic Spacer DNA deckt.

Die Kombination von RFLP-Analyse mit Mse I, Sequenzalignment des 5S-23S Intergenic Spacers mit anschließender Erstellung eines phylogenetischen Stammbaumes

sowie der Plasmidprofilanalyse mittels PFGE war also hervorragend geeignet zur sicheren und eindeutigen genetischen Charakterisierung aller getesteten Isolate.

#### **4.2 Ergebnisse der Qualitätskontrolle mit *Staphylococcus aureus* ATCC 29213**

Bei der Bestimmung der MHK des Referenzstammes *S. aureus* ATCC 29213 schwankten die Ergebnisse der im Dreifachansatz durchgeführten Experimente lediglich um eine  $\log_2$ -Verdünnungsstufe, was für die sehr gute Reproduzierbarkeit der Versuche spricht. Alle Ergebnisse der Qualitätskontrollexperimente zeigt Tabelle 34 im Anhang. Den Median der Ergebnisse im Vergleich mit den durch das CLSI vorgegebenen Grenzwerte für diesen Referenzstamm zeigt Tabelle 9.

Für das Makrolid Erythromycin sowie für die Gyrasehemmer Ciprofloxacin und Levofloxacin lag der ermittelte Median an der unteren Grenze der durch das CLSI veröffentlichten Testspanne, für das Makrolid Clarithromycin sogar eine Verdünnungsstufe niedriger. Der für Doxycyclin und Ceftriaxon gefundene Median lag jeweils in der Mitte der CLSI-Testspanne.

Für das Antibiotikum Penicillin war keine Endpunktbestimmung möglich, da auf der kommerziellen Mikrotiterplatte die höchste Konzentration dieser Substanz  $1\mu\text{g/ml}$  beträgt. Anhand der deutlichen Trübung und Knopfbildung im letzten Well ( $1\mu\text{g/ml}$ ) war jedoch anzunehmen, dass die tatsächliche MHK deutlich über  $2\mu\text{g/ml}$  lag.

Der Median der MHK von Cefuroxim lag an der oberen durch die CLSI akzeptierten Grenze.

Bei dem  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum Amoxicillin hingegen zeigte sich deutlich der Einfluss der 48 Stunden langen Vorinkubation der sterilen Lösung aus Antibiotikum und BSK-Medium. Hier kam der Median der MHK zwei  $\log_2$ -Verdünnungsstufen oberhalb der zulässigen Grenze zu liegen, was auf einen Wirkungsverlust der Substanz während der Inkubation in BSK-Medium spricht.

Insgesamt zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse der Qualitätskontrollexperimente mit den durch das CLSI für den *S. aureus*-Referenzstamm herausgegebenen MHK-Werten der verwendeten Antibiotika.

Abweichungen auf Grund von Interaktionen des BSK-Mediums mit den antibiotischen Substanzen ergaben sich jedoch für die Antibiotika Clarithromycin und Amoxicillin. Für Penicillin war testbedingt keine exakte Bestimmung der MHK möglich, da diese oberhalb des messbaren Bereiches zu liegen kam.

**Tabelle 9:** Bestimmung der MHK von *S. aureus* ATCC 29213 entsprechend des Richtlinie M7-A7 des CLSI. Beimpfung der Mikrotiterplatten nach Lösung der lyophilisierten Antibiotika mit BSK-Medium und 48h Inkubation bei 33 °C. Angabe der MHK in µg/ml als Median aus 3 Experimenten.

Antibiotikum	Range CLSI in µg/ml	Median MHK in µg/ml
Doxycyclin	0,12-0,5	0,25
Penicillin	0,25-2	>1
Amoxicillin	0,12-0,5	2
Ceftriaxon	1-8	4
Cefuroxim	0,5-2	2
Ciprofloxacin	0,12-0,5	0,125
Levofloxacin	0,06-0,5	0,125
Erythromycin	0,25-1	0,25
Clarithromycin	0,12-0,5	0,063

### 4.3 Standardisierte MHK-Bestimmung bei *B. burgdorferi* s.l.

Als Beispiel zur Bestimmung der MHK (in µg/ml) anhand des durch kinetische Messungen festgestellten Absorptionsabfalls einer Flüssigkultur von Borrelien mit Phenolrot-Zusatz innerhalb von 72 Stunden Inkubation sei hier das Experiment mit dem *B. spielmanii*-Stamm Pjes dargestellt.

In Tabelle 10 sind die zugehörigen Konzentrationen der Antibiotika Doxycyclin und Ceftriaxon auf der speziell gefertigten Mikrotiterplatte (Fa. Merlin-Diagnostika GmbH) nach Zugabe von 200 µl Inokulumssuspension zu jedem Well aufgeführt. Tabelle 11 zeigt vergleichend hierzu die in den einzelnen Wells bzw. Feldern der mit Doxycyclin beschickten Reihe A jeweils nach 0 und 27 Stunden Inkubation photometrisch gemessene Extinktion (Photometer Power Wave 200, Fa. BioTek Instruments).

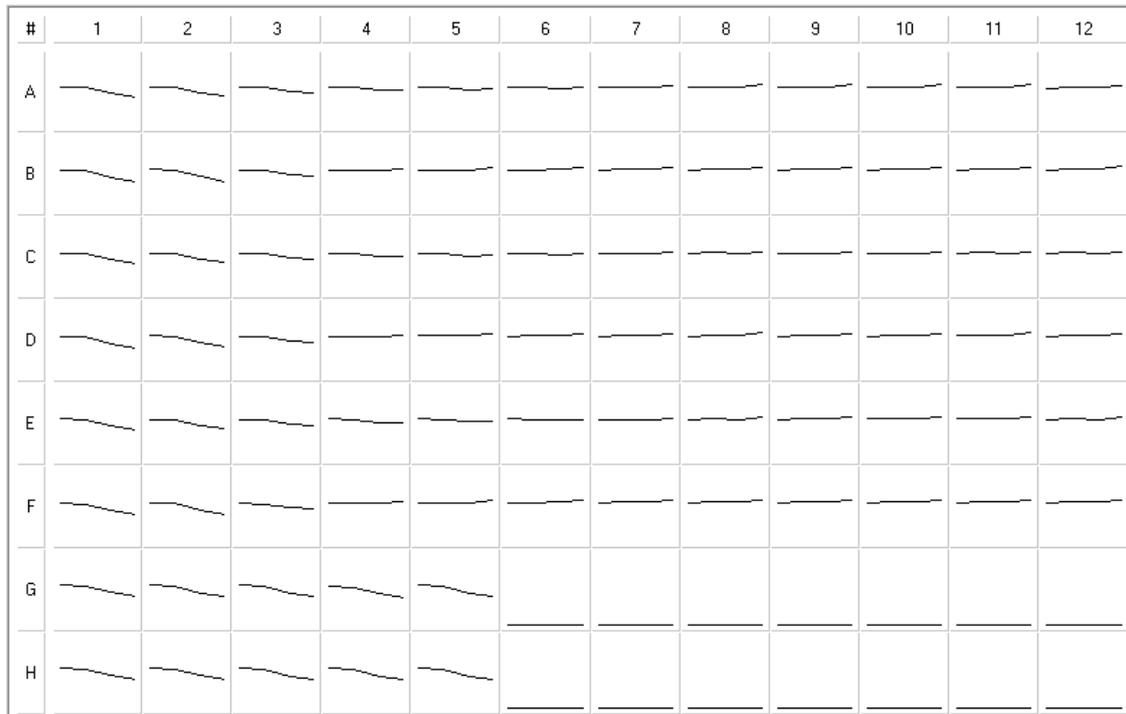
**Tabelle 10:** Konzentration von Doxycyclin und Ceftriaxon (µg/ml) nach Zugabe von 200 µl Inokulumssuspension

Feld	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Doxycyclin	0,016	0,031	0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	3	4	5	6
Ceftriaxon	0,004	0,008	0,016	0,031	0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8

**Tabelle 11:** Exemplarische Darstellung der Extinktion zu den Zeitpunkten  $t_0$  und  $t_{72}$  in der von links nach rechts mit steigenden Konzentrationen von Doxycyclin beschickten Reihe A

Feld	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E $t_0$	2,34	2,35	2,32	2,35	2,31	2,31	2,33	2,32	2,33	2,32	2,32	2,30
E $t_{72}$	1,71	1,83	1,98	2,16	2,24	2,31	2,44	2,48	2,49	2,48	2,48	2,46

Die auf Basis der photometrisch gemessenen Extinktionswerte mit Hilfe des Programmes Microwin 3.0 (Fa. Microtek) erstellte Kinetikgraphik zeigt Abbildung 8.



**Abbildung 8: Kinetische Messung der MHK-Werte ( $\mu\text{g/ml}$ ) des *B. spielmanii*-Isolates PJs anhand des Absorptionsabfalls innerhalb von 72 h Inkubation**

Reihe A, C, E: Doxycyclin (Dox), Reihe B, D, F: Ceftriaxon (Cef), Reihe G, H: Wachstumskontrolle (GC)

Betrachtet man z.B. Reihe A, in der das zu den Tetracyclinen gehörende Antibiotikum Doxycyclin von links nach rechts in steigender Konzentration aufgetragen ist (siehe Tabelle 10), so zeigt sich in den Feldern A1-A3 eine deutlich abfallende Kurve, im Feld A4 eine geringgradig fallende Kurve und in den Feldern A5-A12 eine nahezu waagerechte Linie. Eine abgesenkte Kurve zeigt einen Umschlag des Indikators und damit Borrelienwachstum an. Eine Gerade entsteht, wenn kein Wachstum und damit kein Stoffwechsel der Bakterien stattfindet.

Im vorliegenden Beispiel zeigte die Kinetik-Grafik in den Feldern A1-A4 eine abfallende Kurve, in den übrigen Feldern eine Gerade. Für die Felder A3 und A4, die sich der Wachstumskinetik zu Folge im Grenzbereich zwischen Wachstum und Hemmung befanden, wurde die Berechnung nach der in Punkt 3.2.8 beschriebenen Formel durchgeführt. Es war im Feld A3 in diesem Fall  $E_{t_0}$  2,32 und  $E_{t_{72}}$  1,98 (siehe Tabelle 11). Die Extinktion hatte sich also um mehr als 10 % gesenkt, ein Wachstum hatte stattgefunden. Im Feld A4 lag  $E_{t_0}$  bei 2,35 und  $E_{t_{72}}$  bei 2,16. Damit hatte sich die Extinktion um weniger als 10 % gesenkt, das Borrelienwachstum war gehemmt. Das Feld A4 enthielt folglich die niedrigste Konzentration des Antibiotikums, die in der

---

Lage war, das Borrelienwachstum zu hemmen. Damit lag die MHK von Doxycyclin für den Stamm PJes bei 0,125 µg/ml (siehe Anhang Tabelle 35).

Analog hierzu ergab die Berechnung für die mit Ceftriaxon beschickte Reihe B eine Hemmung des Wachstums ab Feld B4. Damit lag die MHK von Ceftriaxon für den Stamm PJes bei 0,031 µg/ml (siehe Anhang Tabelle 37).

Die Reihen G und H waren nicht mit Antibiotikum beschickt und dienten als Wachstumskontrolle. Im vorliegenden Versuch zeigten sie eine abfallende Kurve und rechnerisch eine deutliche Verminderung der Extinktion.

Die antimikrobielle Empfindlichkeit wurde für jeden Stamm und für jedes Antibiotikum in drei verschiedenen Versuchsansätzen bestimmt. Dabei bewegte sich die methodisch bedingte Schwankungsbreite zwischen den einzelnen Versuchen in einem Bereich von plus/minus einer geometrischen Verdünnungsstufe um den Mittelwert bzw. um insgesamt maximal 3 Verdünnungsstufen, was für die gute Reproduzierbarkeit der auf einer logarithmischen Reihenverdünnung zur Basis 2 beruhenden Empfindlichkeitsbestimmung spricht. Lagen ausnahmsweise größere Schwankungen vor, so wurde ein methodischer Fehler angenommen, und der Test wurde wiederholt. Die MHK-Werte der 9 getesteten Antibiotika für alle Isolate finden sich im Anhang. Die Mediane aus den Versuchen sind in Tabelle 14, 18 und 21 detailliert aufgeführt.

### 4.3.1 MHK von Doxycyclin und Makroliden

Das Tetracyclin-Antibiotikum Doxycyclin wurde zur Testung in Konzentrationen von 0,016-32 µg/ml eingesetzt. Die Testspanne der Makrolide reichte von 0,0002441 - 4 µg/ml (siehe Anhang Tabelle 31).

**Tabelle 12:** *In vitro* Empfindlichkeit von *B. burgdorferi* s.l. gegenüber Doxycyclin und Makroliden (MHK in µg/ml). Darstellung der MHK-Spanne, Mediane und MHK<sub>90</sub>-Werte für alle getesteten Isolate.

<i>B. burgdorferi</i> s.l.	Minimum	Maximum	Median	MHK <sub>90</sub> *
Substanz				
Doxycyclin	0,063	0,5	0,125	0,25
Erythromycin	0,008	0,0625	0,031	0,031
Clarithromycin	0,001	0,016	0,004	0,008

\*MHK<sub>90</sub>: MHK-Werte, bei denen 90 % der Isolate im Wachstum gehemmt werden

Sowohl Doxycyclin als auch Erythromycin und Clarithromycin wiesen eine hervorragende *in vitro* Aktivität gegen *B. burgdorferi* s.l. auf. Dabei zeigten Clarithromycin mit einer MHK<sub>90</sub> von 0,008 µg/ml und Erythromycin (MHK<sub>90</sub>: 0,031 µg/ml) die mit Abstand beste *in vitro* Wirksamkeit unter allen getesteten Antibiotika.

Aber auch Doxycyclin (MHK<sub>90</sub>: 0,25 µg/ml) war gut wirksam.

Bei der differenzierten Betrachtung der einzelnen Isolate unter Berücksichtigung ihrer Genospezies ergaben sich die in Tabelle 13 aufgeführten Werte.

**Tabelle 13:** *In vitro* Empfindlichkeit von *B. burgdorferi* s.l. gegenüber Doxycyclin und Makroliden (MHK in µg/ml). Darstellung von Median und MHK-Spanne der einzelnen Genospezies.

Genospezies		<i>B. spielmanii</i>	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii</i>
Substanz					
Doxycyclin	Min.	0,063	0,125	0,063	0,125
	Max.	0,5	0,5	0,25	0,5
	Median	0,125	0,25	0,125	0,25
Erythromycin	Min.	0,008	0,031	0,016	0,016
	Max.	0,063	0,063	0,031	0,063
	Median	0,016	0,031	0,031	0,031
Clarithromycin	Min.	0,001	0,004	0,002	0,002
	Max.	0,008	0,016	0,008	0,008
	Median	0,004	0,008	0,008	0,004

Alle Ergebnisse der MHK-Testung von Doxycyclin, Erythromycin und Clarithromycin sind in Tabelle 35 und 36 im Anhang dargestellt.

Die Mediane der für jeden Stamm und jede Substanz durchgeführten drei Versuche zeigt Tabelle 14.

**Tabelle 14:** *In vitro* Empfindlichkeit von *B. burgdorferi* s.l. gegenüber Doxycyclin, Erythromycin und Clarithromycin (MHK in µg/ml). Die antimikrobielle Empfindlichkeit wurde in drei verschiedenen Versuchsansätzen bestimmt, und die MHK-Werte für jeden Stamm sind als Median von drei Experimenten angegeben.

Substanz	Doxycyclin	Erythromycin *	Clarithromycin *
<i>Genospezies</i>			
<b>Isolate</b>			
<i>B. spielmanii</i>			
<b>PMew</b>	0,5	0,031	0,008
<b>PSigII</b>	0,125	0,008	0,002
<b>PCEq</b>	0,125	0,016	0,002
<b>PHap</b>	0,063	0,008	0,002
<b>PJes</b>	0,125	0,016	0,004
<b>PAnz</b>	0,063	0,008	0,002
<b>PMai</b>	0,125	0,008	0,002
<b>A14S</b>	0,125	0,016	0,004
<b>TIsarII</b>	0,25	0,031	0,008
<b>TIsarIII</b>	0,125	0,031	0,008
<i>B. burgdorferi sensu strictu</i>			
<b>B31e2</b>	0,25	0,031	0,008
<b>LW2</b>	0,125	0,031	0,004
<i>B. afzelii</i>			
<b>FEM1</b>	0,125	0,031	0,004
<b>G600</b>	0,25	0,031	0,008
<b>G1039</b>	0,125	0,016	0,004
<i>B.garinii</i>			
<b>PSth</b>	0,25	0,031	0,008
<b>M2094</b>	0,25	0,031	0,004
<b>G1</b>	0,125	0,016	0,002

\* Werte gerundet auf 3. Stelle hinter dem Komma

Bei der statistischen Analyse der Experimente (N=54) wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests (Bias Version 8.3.8., Epsilon Verlag, Hochheim, Deutschland) die Isolate der Genospezies *B. spielmanii* (n=10) mit der Gruppe der Vergleichsisolate (n=8) verglichen.

Es ergab sich bei dieser Betrachtung für das Antibiotikum Doxycyclin eine an der Grenze der Signifikanz ( $p = 0,05$ ) liegende höhere MHK der Vergleichsisolate gegenüber den *B. spielmanii*-Isolaten.

Für die Substanzen Erythromycin und Clarithromycin lag die MHK in der Gruppe der Vergleichsisolate signifikant höher ( $p < 0,05$ ) als bei den Isolaten der *B. spielmanii*-Gruppe.

Beim detaillierten Vergleich aller 4 Genospezies untereinander zeigte sich, dass für das Antibiotikum Doxycyclin lediglich die *B. garinii*-Isolate eine signifikant höhere MHK aufwiesen als die *B. spielmanii*-Isolate. Für die anderen Genospezies ergaben sich sowohl im Vergleich mit *B. spielmanii* als auch untereinander keine Signifikanzen hinsichtlich der MHK von Doxycyclin.

Bei der detaillierten Betrachtung der Makrolide zeigte sich, dass sowohl die *B. burgdorferi* s.s.-Isolate als auch die *B. afzelii*-Isolate eine signifikant höhere MHK sowohl für Erythromycin als auch für Clarithromycin aufwiesen als die *B. spielmanii*-Isolate. *B. garinii* zeigte darüber hinaus für Erythromycin eine signifikant höhere MHK als *B. spielmanii*.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die getesteten Isolate der Genospezies *B. spielmanii* insgesamt verglichen mit den Vergleichsisolaten der übrigen humanpathogenen Genospezies eine erhöhte *in vitro* Empfindlichkeit gegen die in unseren Versuchen getesteten Makrolide zu haben scheinen.

#### 4.3.2 MHK von $\beta$ -Lactam-Antibiotika

Folgende Konzentrationen der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika wurden getestet.

**Tabelle 15:** Testspanne der  $\beta$ -Lactame in  $\mu\text{g/ml}$ , Endkonzentration nach Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Inokulumssuspension.

Substanzklasse		Substanz	Testspanne in $\mu\text{g/ml}$
$\beta$ -Lactame	Penicilline	Penicillin	0,016 - 1
		Amoxicillin	0,125 - 16
	Cephalosporine	Ceftriaxon	0,004 - 8
		Cefuroxim	0,063 - 8

Unter den getesteten  $\beta$ -Lactamen zeigte Ceftriaxon mit einer  $\text{MHK}_{90}$  von 0,063  $\mu\text{g/ml}$  die beste *in vitro* Aktivität gegen *B. burgdorferi*. Es folgten Penicillin und Cefuroxim mit einer  $\text{MHK}_{90}$  von jeweils 0,25  $\mu\text{g/ml}$  und schließlich Amoxicillin ( $\text{MHK}_{90}$ : 2  $\mu\text{g/ml}$ ). Dabei wiesen Amoxicillin und Penicillin mit einer MHK-Spanne von 6 bzw. 7 Verdünnungsstufen zwischen den einzelnen Isolaten deutlich größere Schwankungen auf als Ceftriaxon und Cefuroxim mit einer Spanne von je 4 Verdünnungsstufen.

Die Spanne der gemessenen MHK-Werte sowie den Median und die MHK<sub>90</sub>-Werte bezogen auf die Gesamtheit der getesteten Isolate zeigt Tabelle 16.

**Tabelle 16:** *In vitro* Empfindlichkeit von *B. burgdorferi* s.l. gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (MHK in  $\mu\text{g/ml}$ ). Darstellung der MHK-Spanne, Mediane und MHK<sub>90</sub>-Werte für alle getesteten Isolate.

<i>B. burgdorferi</i> s.l.	Minimum	Maximum	Median	MHK <sub>90</sub>
Substanz				
Penicillin	$\leq 0,016$	$> 1$	0,125	0,25
Amoxicillin	$\leq 0,125$	4	0,5	2
Ceftriaxon	0,016	0,125	0,031	0,063
Cefuroxim	$\leq 0,063$	0,5	0,125	0,25

MHK<sub>90</sub>: MHK-Werte, bei denen 90 % der Isolate im Wachstum gehemmt werden

Bei der differenzierten Betrachtung der einzelnen Genospezies ergaben sich für Minimum, Maximum und Median die in Tabelle 17 dargestellten Werte.

**Tabelle 17:** *In vitro* Empfindlichkeit von *B. burgdorferi* s.l. gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (MHK in  $\mu\text{g/ml}$ ). Darstellung von Median und MHK-Spanne der einzelnen Genospezies.

Genospezies		<i>B. spielmanii</i>	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii</i>
Substanz					
Penicillin	Min.	$\leq 0,016$	0,031	0,25	$\leq 0,016$
	Max.	0,25	0,25	$> 1$	0,031
	Median	0,094	0,125	0,25	0,016
Amoxicillin	Min.	$\leq 0,125$	0,25	0,5	$\leq 0,125$
	Max.	2	2	4	0,5
	Median	0,5	1,0	1,0	0,125
Ceftriaxon	Min.	0,016	0,031	0,031	0,031
	Max.	0,125	0,063	0,125	0,031
	Median	0,031	0,031	0,063	0,031
Cefuroxim	Min.	$\leq 0,063$	0,125	0,125	0,125
	Max.	0,5	0,25	0,5	0,25
	Median	0,125	0,125	0,25	0,125

Alle gemessenen MHK-Werte der im Dreifachansatz durchgeführten Versuche zur Testung der Empfindlichkeit von *B. burgdorferi* s.l. gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika zeigen Tabelle 37, 38, 39 und 40 im Anhang. Die *in vitro* Empfindlichkeit der einzelnen Isolate dargestellt als Median von drei Experimenten ist in Tabelle 18 zu sehen.

**Tabelle 18:** *In vitro* Empfindlichkeit von *B. burgdorferi* s.l. gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (MHK in  $\mu\text{g/ml}$ ). Die antimikrobielle Empfindlichkeit wurde in drei verschiedenen Versuchsansätzen bestimmt, und die MHK-Werte für jeden Stamm sind als Median von drei Experimenten angegeben.

Substanz	Penicillin	Amoxicillin	Ceftriaxon	Cefuroxim
<i>Genospezies</i>				
<b>Isolate</b>				
<i>B. spielmanii</i>				
<b>PMew</b>	0,25	1	0,125	0,125
<b>PSigII</b>	0,063	0,5	0,031	0,125
<b>PCEq</b>	0,063	0,5	0,031	0,125
<b>PHap</b>	0,25	2	0,063	0,25
<b>PJes</b>	0,031	0,25	0,031	0,125
<b>PAnz</b>	0,031	0,25	0,016	0,125
<b>PMai</b>	0,25	2	0,063	0,125
<b>A14S</b>	0,031	0,25	0,031	0,125
<b>TIsarII</b>	0,031	$\leq 0,125$	0,016	0,125
<b>TIsarIII</b>	0,25	2	0,063	0,5
<i>B. burgdorferi sensu strictu</i>				
<b>B31e2</b>	0,063	0,5	0,031	0,125
<b>LW2</b>	0,125	1	0,031	0,125
<i>B. afzelii</i>				
<b>FEM1</b>	$> 1$	4	0,063	0,5
<b>G600</b>	0,25	1	0,063	0,25
<b>G1039</b>	0,25	0,5	0,031	0,125
<i>B. garinii</i>				
<b>PSth</b>	$\leq 0,016$	0,125	0,031	0,125
<b>M2094</b>	0,031	0,25	0,031	0,125
<b>G1</b>	$\leq 0,016$	$\leq 0,125$	0,031	0,125

Bei der statistischen Analyse mittels Kruskal-Wallis Test (N=54) ergaben sich im Vergleich von *B. spielmanii* mit der Gruppe der Vergleichsisolate (2-Gruppenvergleich) keine signifikanten Unterschiede.

Beim Vergleich aller 4 Genospezies miteinander (4-Gruppenvergleich) zeigten sich für die MHK von Ceftriaxon ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

Bei der Betrachtung von Amoxicillin und Penicillin lagen jeweils die minimalen Hemmkonzentrationen von *B. spielmanii*, *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s. signifikant höher als von *B. garinii* ( $p < 0,05$ ). Darüber hinaus lag für Penicillin die MHK von *B. afzelii* höher als für *B. burgdorferi* s.s. und für *B. spielmanii*. Für Amoxicillin zeigte sich ein Trend zu einer höheren MHK von *B. afzelii* gegenüber *B. spielmanii* ( $p = 0,06$ ).

Für das Antibiotikum Cefuroxim lag die MHK von *B. afzelii* signifikant höher als von *B. spielmanii* und *B. garinii*.

Zusammengefasst lässt sich also feststellen, dass die Genospezies *B. garinii* in unseren Untersuchungen zumeist signifikant niedrigere Hemmkonzentrationen für die  $\beta$ -Lactame aufwies, und damit eine höhere *in vitro* Empfindlichkeit besaß als die übrigen Genospezies. Im Gegensatz dazu zeigte *B. afzelii* häufig eine niedrigere *in vitro* Empfindlichkeit, insbesondere im Vergleich mit *B. spielmanii* und *B. garinii*.

### 4.3.3 MHK von Chinolonen

Die Testspanne für die Chinolone lag zwischen 0,031 und 4  $\mu\text{g/ml}$ . Die Spanne der MHK-Werte, den Median und die  $\text{MHK}_{90}$  für *B. burgdorferi* s.l. sowie die einzelnen Werte aufgliedert nach Genospezies zeigen Tabelle 19 und Tabelle 20.

**Tabelle 19:** *In vitro* Empfindlichkeit von *B. burgdorferi* s.l. gegenüber Chinolonen (MHK in  $\mu\text{g/ml}$ ). Darstellung der MHK-Spanne, Mediane und  $\text{MHK}_{90}$ -Werte für alle getesteten Isolate.

<i>B. burgdorferi</i> s.l.	Minimum	Maximum	Median	$\text{MHK}_{90}$
Substanz				
Ciprofloxacin	0,25	> 4	2	> 4
Levofloxacin	0,25	> 4	4	> 4

**Tabelle 20:** *In vitro* Empfindlichkeit von *B. burgdorferi* s.l. gegenüber Chinolonen (MHK in  $\mu\text{g/ml}$ ). Darstellung von Median und MHK-Spanne der einzelnen Genospezies.

Genospezies		<i>B. spielmanii</i>	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii</i>
Substanz					
Ciprofloxacin	Min.	0,25	2	1	1
	Max.	> 4	> 4	> 4	> 4
	Median	2	3	2	1
Levofloxacin	Min.	0,25	4	2	2
	Max.	> 4	4	> 4	> 4
	Median	4	4	4	2

Im Einzelnen ergaben sich für die Isolate die in Tabelle 21 als Median aus drei Messungen dargestellten Daten bezüglich der *in vitro* Empfindlichkeit gegen Chinolone. Die Ergebnisse sämtlicher Messungen finden sich in Tabelle 39 und Tabelle 40 im Anhang.

**Tabelle 21:** *In vitro* Empfindlichkeit von *B. burgdorferi* s.l. gegenüber Chinolonen (MHK in µg/ml). Die antimikrobielle Empfindlichkeit wurde in drei verschiedenen Versuchsansätzen bestimmt, und die MHK-Werte für jeden Stamm sind als Median von drei Experimenten angegeben.

Substanz	Ciprofloxacin	Levofloxacin
<i>Genospezies</i>		
<b>Isolate</b>		
<i>B. spielmanii</i>		
<b>PMew</b>	> 4	> 4
<b>PSigII</b>	1	2
<b>PCEq</b>	1	2
<b>PHap</b>	4	4
<b>PJes</b>	4	> 4
<b>PAnz</b>	1	2
<b>PMai</b>	4	> 4
<b>A14S</b>	1	2
<b>TIsarII</b>	0,25	0,5
<b>TIsarIII</b>	2	4
<i>B. burgdorferi sensu strictu</i>		
<b>B31e2</b>	4	4
<b>LW2</b>	2	4
<i>B. afzelii</i>		
<b>FEM1</b>	> 4	4
<b>G600</b>	2	4
<b>G1039</b>	1	2
<i>B. garinii</i>		
<b>PStH</b>	1	2
<b>M2094</b>	> 4	> 4
<b>G1</b>	1	2

Die statistische Analyse ergab, dass weder im 2-Gruppenvergleich (*B. spielmanii* verglichen mit den Referenzstämmen) noch im 4-Gruppenvergleich (alle Genospezies untereinander verglichen) signifikante Unterschiede zwischen den Genospezies bezüglich ihrer *in vitro* Empfindlichkeit gegen Chinolone vorlagen (N=54).

#### 4.4 Standardisierte MBK-Bestimmung bei *B. burgdorferi* s.l.

Die Bestimmung der MBK wurde wie in Punkt 3.2.9 beschrieben mittels einer konventionellen Subkultivierungsmethode durchgeführt. Dabei wurde die makroskopische Beurteilung der Tubes grundsätzlich ergänzt durch die mikroskopische Suche nach vitalen Borrelien in der Flüssigkultur. Im gelb verfärbten Medium fanden sich in allen Fällen noch lebende Borrelien, diese Tubes wurden jedoch zur

Kontaminationskontrolle ebenfalls mikroskopiert. In makroskopisch unverfärbtem Medium wurden häufig ebenfalls vitale Borrelien gefunden, jedoch reichte deren Anzahl und Stoffwechselaktivität noch nicht aus, um einen Farbumschlag zu verursachen. Deshalb wurde der Inhalt unverfärbter Tubes besonders sorgfältig unter dem Mikroskop betrachtet.

Auch zur Bestimmung der MBK wurden die Versuche im Dreifachansatz durchgeführt. Die erhaltenen Resultate lagen innerhalb einer Spanne von drei geometrischen Verdünnungsstufen bzw. schwankten maximal plus/minus eine Verdünnungsstufe um den Median, was wiederum die gute Reproduzierbarkeit des Tests unterstrich.

#### 4.4.1 MBK von Doxycyclin und Makroliden

Es ergaben sich für die MBK der Antibiotika Doxycyclin, Erythromycin und Clarithromycin für alle getesteten Isolate die in Tabelle 22 gezeigten Resultate.

**Tabelle 22:** *In vitro* Empfindlichkeit von *B. burgdorferi* s.l. gegenüber Doxycyclin und Makroliden (MBK in µg/ml). Darstellung der MBK-Spanne, Mediane und MBK<sub>90</sub>-Werte für alle getesteten Isolate.

<i>B. burgdorferi</i> s.l.	Minimum	Maximum	Median	MBK <sub>90</sub>
Substanz				
Doxycyclin	2	32	16	16
Erythromycin	1	> 4	2	4
Clarithromycin	0,25	4	1	1

Aufgegliedert nach Genospezies ergaben sich im Einzelnen die in Tabelle 23 dargestellten Werte.

**Tabelle 23:** *In vitro* Empfindlichkeit von *B. burgdorferi* s.l. gegenüber Doxycyclin und Makroliden (MBK in µg/ml). Darstellung von Median und MBK-Spanne der einzelnen Genospezies.

Genospezies		<i>B. spielmanii</i>	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii</i>
Substanz					
Doxycyclin	Min.	4	16	2	8
	Max.	16	32	4	32
	Median	16	32	4	16
Erythromycin	Min.	1	4	2	2
	Max.	4	> 4	2	4
	Median	2	4	2	4
Clarithromycin	Min.	0,25	2	0,5	1
	Max.	2	4	2	2
	Median	1	2	1	1

Für jeden einzelnen Stamm ergaben sich als Median aus 3 Versuchen die hier differenziert aufgeführten Resultate. Die Ergebnisse aller Messungen finden sich im Anhang in Tabelle 35 und 36.

**Tabelle 24:** *In vitro* Empfindlichkeit von *B. burgdorferi* s.l. gegenüber Doxycyclin, Erythromycin und Clarithromycin (MBK in µg/ml). Die antimikrobielle Empfindlichkeit wurde in drei verschiedenen Versuchsansätzen bestimmt, und die MBK-Werte für jeden Stamm sind als Median von drei Experimenten angegeben.

Substanz	Doxycyclin	Erythromycin *	Clarithromycin *
<i>Genospezies</i>			
<b>Isolate</b>			
<i>B. spielmanii</i>			
<b>PMew</b>	16	2	1
<b>PSigII</b>	8	2	1
<b>PCEq</b>	16	4	1
<b>PHap</b>	16	2	0,5
<b>PJes</b>	8	1	0,5
<b>PAnz</b>	8	2	1
<b>PMai</b>	8	1	0,5
<b>A14S</b>	16	2	1
<b>TIsarII</b>	16	1	0,5
<b>TIsarIII</b>	8	2	1
<i>B. burgdorferi sensu stricto</i>			
<b>B31e2</b>	16	4	2
<b>LW2</b>	32	4	4
<i>B. afzelii</i>			
<b>FEM1</b>	4	2	1
<b>G600</b>	2	2	0,5
<b>G1039</b>	4	2	1
<i>B. garinii</i>			
<b>PSth</b>	32	4	2
<b>M2094</b>	16	4	1
<b>G1</b>	16	4	1

Bei der statistischen Analyse der genospeziespezifischen Unterschiede der MBK von Doxycyclin, Erythromycin und Clarithromycin ergaben sich in der 2-Gruppenanalyse mittels Kruskal-Wallis-Test (N=54) keine signifikanten Unterschiede für Doxycyclin, jedoch signifikant höhere MBK-Werte der Vergleichsisolate gegenüber *B. spielmanii* für die Makrolide ( $p < 0,05$ ).

Für Doxycyclin zeigte sich *B. afzelii* signifikant empfindlicher als *B. spielmanii*, *B. burgdorferi* s.s. und *B. garinii*. Darüber hinaus lag die MBK von *B. burgdorferi* s.s.

---

signifikant höher als von *B. spielmanii* ( $p < 0,05$ ). Die Genospezies *B. garinii* zeigte lediglich einen Trend in diese Richtung ( $p=0,07$ ). Die detaillierte statistische Analyse zeigte für beide Makrolide analog der Ergebnisse der MHK-Analyse signifikant höhere MBK-Werte für *B. burgdorferi* s.s. und *B. garinii* gegenüber *B. spielmanii*. Darüber hinaus ergab sich für Erythromycin eine signifikant höhere MBK von *B. burgdorferi* s. s und *B. garinii* gegenüber *B. afzelii*, sowie für Clarithromycin ebenfalls eine signifikant höhere MBK von *B. burgdorferi* s.s. gegenüber *B. afzelii*. Für den Vergleich von *B. garinii* zu *B. afzelii* zeigte sich ebenfalls einen Trend in diese Richtung.

Es fand sich also bei der MBK der Makrolide ähnlich wie auch bei der MHK dieser Substanzen eine insgesamt höhere *in vitro* Empfindlichkeit der Genospezies *B. spielmanii* und *B. afzelii* verglichen mit *B. burgdorferi* s.s. und *B. garinii*.

#### 4.4.2 MBK von $\beta$ -Lactam-Antibiotika

Die ausgewählten  $\beta$ -Lactame zeigten die in Tabelle 25 und 26 aufgeführten Werte bezüglich der minimalen und maximalen MBK sowie des Medians für *B. burgdorferi* s.l. bzw. jede einzelne Genospezies. Darüber hinaus ist die MBK<sub>90</sub> bezogen auf alle getesteten Isolate angegeben.

**Tabelle 25:** *In vitro* Empfindlichkeit von *B. burgdorferi* s.l. gegenüber  $\beta$ -Lactamen (MHK in  $\mu\text{g/ml}$ ). Darstellung der MBK-Spanne, Mediane und MBK<sub>90</sub>-Werte für alle getesteten Isolate.

<i>B. burgdorferi</i> s.l.	Minimum	Maximum	Median	MBK <sub>90</sub>
Substanz				
Penicillin	0,5	> 1	> 1	> 1
Amoxicillin	2	> 16	16	> 16
Ceftriaxon	0,25	4	2	4
Cefuroxim	1	> 8	> 8	> 8

**Tabelle 26:** *In vitro* Empfindlichkeit von *B. burgdorferi* s.l. gegenüber  $\beta$ -Lactamen (MBK in  $\mu\text{g/ml}$ ). Darstellung von Median und MBK-Spanne der einzelnen Genospezies.

Genospezies		<i>B. spielmanii</i>	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii</i>
Substanz					
Penicillin	Min.	0,5	> 1	1	> 1
	Max.	> 1	> 1	> 1	> 1
	Median	> 1	> 1	> 1	> 1
Amoxicillin	Min.	2	4	2	8
	Max.	> 16	16	8	> 16
	Median	16	12	4	16
Ceftriaxon	Min.	0,5	2	0,25	1
	Max.	4	4	4	2
	Median	1	3	0,5	2
Cefuroxim	Min.	1	8	4	> 8
	Max.	> 8	> 8	> 8	> 8
	Median	> 8	> 8	8	> 8

Im Einzelnen ergaben sich folgende Werte für jedes einzelne Isolat. Die Daten aus allen Experimenten sind im Anhang dargestellt.

**Tabelle 27:** *In vitro* Empfindlichkeit von *B. burgdorferi* s.l. gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (MBK in  $\mu\text{g/ml}$ ). Die antimikrobielle Empfindlichkeit wurde in drei verschiedenen Versuchsansätzen bestimmt, und die MBK-Werte für jeden Stamm sind als Median von drei Experimenten angegeben.

Substanz	Penicillin	Amoxicillin	Ceftriaxon	Cefuroxim
<i>Genospezies</i>				
<b>Isolate</b>				
<i>B. spielmanii</i>				
<b>PMew</b>	> 1	> 16	4	> 8
<b>PSigII</b>	> 1	16	1	8
<b>PCEq</b>	> 1	> 16	2	> 8
<b>PHap</b>	> 1	> 16	2	> 8
<b>PJes</b>	> 1	16	2	8
<b>PAnz</b>	> 1	16	1	> 8
<b>PMai</b>	> 1	8	4	8
<b>A14S</b>	> 1	16	0,5	8
<b>TI sarII</b>	1	16	0,5	2
<b>TI sarIII</b>	0,5	4	0,5	4
<i>B. burgdorferi sensu strictu</i>				
<b>B31e2</b>	> 1	16	2	> 8
<b>LW2</b>	> 1	4	4	8
<i>B. afzelii</i>				
<b>FEM1</b>	> 1	4	2	> 8
<b>G600</b>	1	4	0,5	4
<b>G1039</b>	> 1	8	0,5	8
<i>B. garinii</i>				
<b>PSth</b>	> 1	8	2	> 8
<b>M2094</b>	> 1	16	2	> 8
<b>G1</b>	> 1	16	2	> 8

Für die Antibiotika Penicillin und Cefuroxim war auf Grund der zum Großteil außerhalb des messbaren Bereiches liegenden MBK-Werte eine statistische Analyse dieser Ergebnisse nicht sinnvoll durchführbar.

Bei der 2-Gruppenanalyse (N=54) ergab sich für das Antibiotikum Amoxicillin eine signifikant höhere MBK der *B. spielmanii*-Gruppe gegenüber den Referenzstämmen ( $p < 0,05$ ). Für Ceftriaxon zeigte sich keine Signifikanz.

In der 4-Gruppenanalyse war *B. burgdorferi* s.s. signifikant weniger empfindlich gegen Ceftriaxon als *B. spielmanii* und *B. afzelii*. *B. garinii* zeigte einen Trend ( $p=0,06$ ) zu einer höheren MBK gegenüber *B. afzelii*.

Für die MBK von Amoxicillin hatten *B. garinii* und *B. spielmanii* eine signifikant höhere MBK als *B. afzelii*.

Zusammenfassend betrachtet lassen sich zwar in der Gruppe der  $\beta$ -Lactame Unterschiede in der *in vitro* Empfindlichkeit der einzelnen Genospezies zeigen, es ist jedoch keine generell erhöhte oder erniedrigte Empfindlichkeit einer Genospezies gegen  $\beta$ -Lactame feststellbar.

#### 4.4.3 MBK von Chinolonen

Nachdem bereits die MHK der getesteten Chinolone meist nur knapp unterhalb der höchsten getesteten Konzentration lag, kam erwartungsgemäß die MBK fast in allen Fällen oberhalb von dieser und damit im nicht mehr messbaren Bereich ( $> 4 \mu\text{g/ml}$ ) zu liegen.

Es ließ sich also für die Antibiotika Ciprofloxacin und Levofloxacin keine bakterizide Aktivität nach 72 Stunden Inkubation nachweisen.

Die nachfolgenden Tabellen zeigen die jeweils gemessenen Werte.

**Tabelle 28:** *In vitro* Empfindlichkeit von *B. burgdorferi* s.l. gegenüber Chinolonen (MHK in  $\mu\text{g/ml}$ ). Darstellung der MBK-Spanne, Mediane und MBK<sub>90</sub>-Werte für alle getesteten Isolate.

<i>B. burgdorferi</i> s.l.	Minimum	Maximum	Median	MBK <sub>90</sub>
Substanz				
Ciprofloxacin	4	$> 4$	$> 4$	$> 4$
Levofloxacin	4	$> 4$	$> 4$	$> 4$

**Tabelle 29:** *In vitro* Empfindlichkeit von *B. burgdorferi* s.l. gegenüber Chinolonen (MBK in  $\mu\text{g/ml}$ ). Darstellung von Median und MBK-Spanne der einzelnen Genospezies.

Genospezies		<i>B. spielmanii</i>	<i>B. burgdorferi</i> s.s.	<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii</i>
Substanz					
Ciprofloxacin	Min.	4	$> 4$	$> 4$	4
	Max.	$> 4$	$> 4$	$> 4$	$> 4$
	Median	$> 4$	$> 4$	$> 4$	$> 4$
Levofloxacin	Min.	4	$> 4$	$> 4$	$> 4$
	Max.	$> 4$	$> 4$	$> 4$	$> 4$
	Median	$> 4$	$> 4$	$> 4$	$> 4$

Der Median aus drei Experimenten für die einzelnen Isolate lag bei fast allen Isolaten außerhalb des messbaren Bereichs ( $> 4 \mu\text{g/ml}$ ). Es ergaben sich die in Tabelle 30 dargestellten Werte.

Da der Großteil der Werte oberhalb der maximal messbaren Konzentration lag, wurde eine statistische Analyse der Daten nicht durchgeführt.

**Tabelle 30:** *In vitro* Empfindlichkeit von *B. burgdorferi* s.l. gegenüber Makroliden (MBK in µg/ml). Die antimikrobielle Empfindlichkeit wurde in drei verschiedenen Versuchsansätzen bestimmt, und die MBK-Werte für jeden Stamm sind als Median von drei Experimenten angegeben.

<b>Substanz</b>	<b>Ciprofloxacin</b>	<b>Levofloxacin</b>
<i>Genospezies</i>		
<b>Isolate</b>		
<i>B. spielmanii</i>		
<b>PMew</b>	> 4	> 4
<b>PSigII</b>	> 4	> 4
<b>PCEq</b>	> 4	> 4
<b>PHap</b>	> 4	> 4
<b>PJes</b>	> 4	> 4
<b>PAnz</b>	> 4	> 4
<b>PMai</b>	> 4	> 4
<b>A14S</b>	4	> 4
<b>TIsarII</b>	> 4	> 4
<b>TIsarIII</b>	> 4	> 4
<i>B. burgdorferi sensu strictu</i>		
<b>B31e2</b>	> 4	> 4
<b>LW2</b>	> 4	> 4
<i>B. afzelii</i>		
<b>FEM1</b>	> 4	> 4
<b>G600</b>	> 4	> 4
<b>G1039</b>	> 4	> 4
<i>B. garinii</i>		
<b>PStH</b>	> 4	> 4
<b>M2094</b>	> 4	> 4
<b>G1</b>	> 4	> 4

#### 4.5 Exemplarische Abtötungskinetiken für das *B. spielmanii*-Isolat PC Eq 17

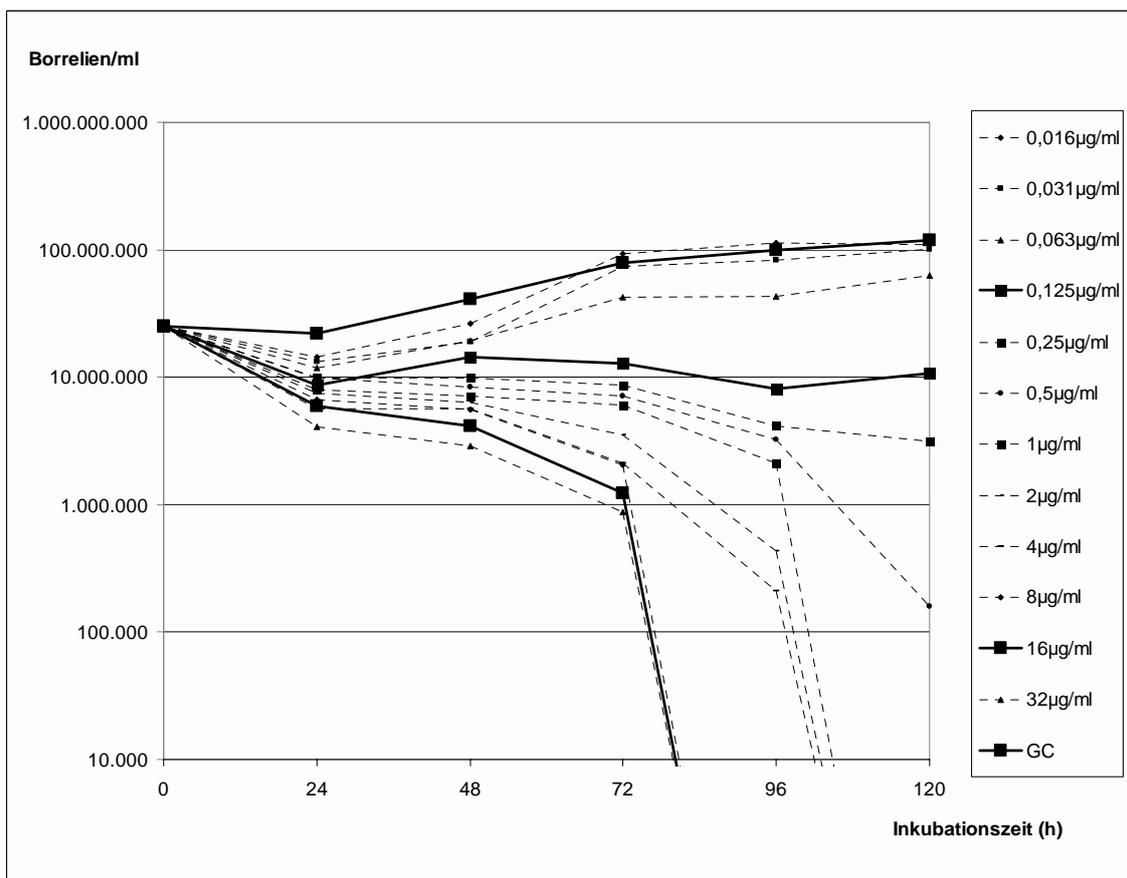
Zur Ergänzung und Bestätigung der photometrisch gemessenen MHK und der mittels Subkultivierung festgestellten MBK wurde eine Abtötungskinetik des *B. spielmanii*-Stammes PC Eq 17 wie in Punkt 3.2.10 beschrieben durchgeführt.

Durch die mikroskopische Zählung der vitalen Zellen über einen Zeitraum von 120 Stunden konnte der zeitliche Verlauf des Absterbeverhaltens dieses Borrelienisolates unter dem Einfluss des bakteriostatischen Antibiotikums Doxycyclin sowie des bakteriziden Antibiotikums Ceftriaxon graphisch dargestellt werden. Auf der y-Achse wurde die Anzahl der jeweils gezählten vitalen Borrelien dargestellt, auf der x-Achse findet sich die Inkubationszeit in Stunden (h).

Anhand dieser Graphik ließ sich ermitteln, ob und in welchem Maße eine bestimmte Konzentration des Antibiotikums zu einer Hemmung bzw. Abtötung dieses Stammes führte. Jede Kurve steht hier für eine bestimmte Antibiotika-Konzentration, wobei die Konzentrationen in der Graphik von oben nach unten zunehmen. Eine steigender Verlauf zeigt Wachstum bzw. Vermehrung des Ausgangsinokulums von  $2,5 \times 10^7$  Borrelien/ml an, eine fallende Kurve spiegelt die Abtötung der Zellen wieder.

Die graphisch dargestellten Ergebnisse dieses Versuchs für das Antibiotikum Doxycyclin zeigt Abbildung 9, die Ergebnisse für das Antibiotikum Ceftriaxon zeigt Abbildung 10.

Zur Verdeutlichung sind als markante Kurven die Wachstumskontrolle sowie die Kurven für den photometrisch gemessenen MHK-Wert bzw. den durch Subkultivierung bestimmten MBK-Wert als fette, durchgezogene Linien dargestellt. Alle übrigen Konzentrationskurven sind gestrichelt gezeichnet.



**Abbildung 9: Time-Kill-Kinetik des *B. spielmanii*-Isolates PC Eq 17 bei Inkubation mit Doxycyclin in verschiedenen Konzentrationen**

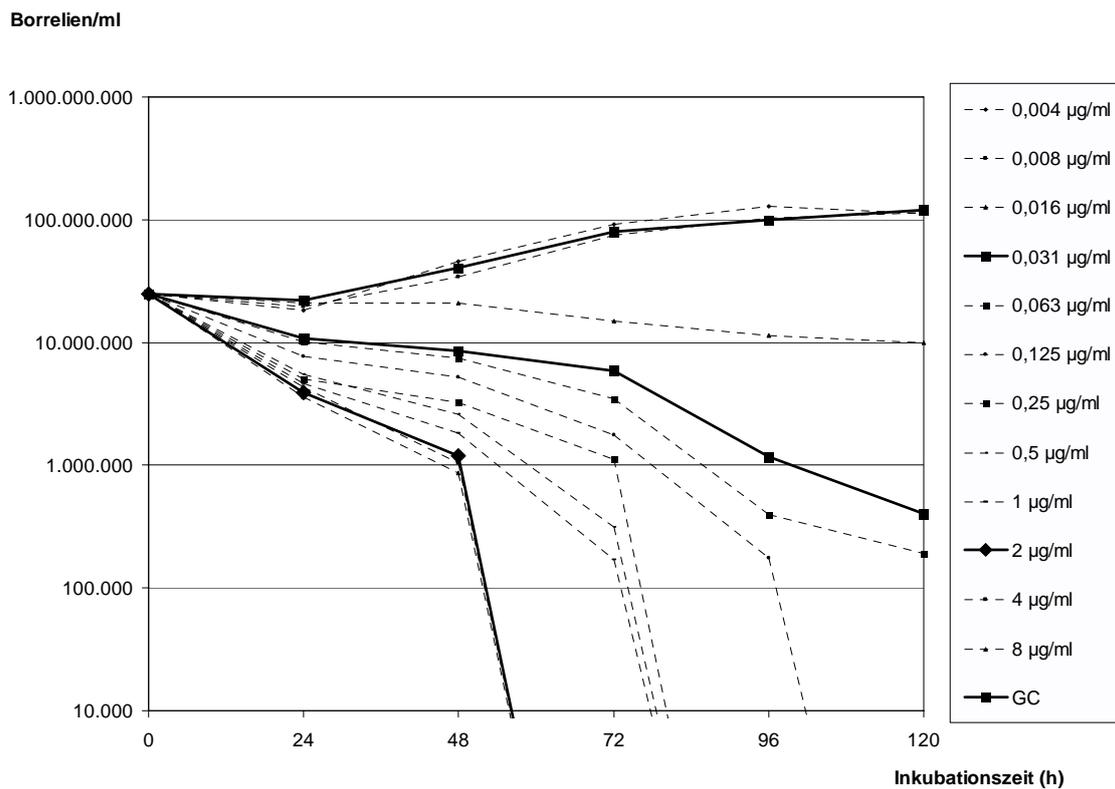
Die Ergebnisse wurden mittels konventioneller Zellzählung im Dunkelfeldmikroskop nach 0, 24, 72, 96 und 120 Stunden in zwei unabhängigen Versuchen ermittelt, und sind als Mittelwert dieser zwei Experimente angegeben. Die fett gedruckten Kurven zeigen die Wachstumskontrolle (GC) sowie den Median der photometrisch gemessenen MHK (0,125 µg/ml) sowie der mittels Subkultivierung bestimmten MBK (16 µg/ml).

---

Der Median der photometrischen Messung der MHK von Doxycyclin lag für den Stamm PC Eq 17 bei 0,125 µg/ml. Dieses Ergebnis deckt sich exakt mit dem in der obigen Graphik dargestellten Verlauf. Bei einer Konzentration von 0,063 µg/ml ist ein Wachstum der Borrelien und damit ein Anstieg der Kurve zu verzeichnen. Die Kurve für die Konzentration 0,125 µg/ml ist die erste Kurve, die sich leicht nach unten absenkt, stellvertretend für eine stärkere Hemmung des Borrelienwachstums. Die folgenden Kurven fallen zunehmend steiler ab und erreichen einen tieferen Wert nach 120 Stunden Inkubation, da es mit zunehmender Konzentration zu einer schnelleren und vollständigeren Abtötung kommt.

Für die Festlegung der MBK verlangt die CLSI eine Reduktion des Ausgangsinokulums um mindestens drei  $\log_{10}$ -Stufen (99,9 %). In diesem Fall dürften also bei einem Ausgangsinokulum von  $2,5 \times 10^7$  Borrelien/ml nur noch maximal 25.000 vitale Borrelien nach 72 Stunden Inkubation verbleiben.

Die mittels konventioneller Subkultivierung im Anschluss an 72 Stunden Inkubation mit Doxycyclin bestimmte MBK lag bei 16 µg/ml (Median aus drei Experimenten). Die Kinetik-Graphik zeigt, dass die dieser Konzentration zugehörige Kurve nach 72 Stunden noch nicht unter 25.000 Zellen/ml gefallen ist, jedoch wenige Stunden später weiter steil bis auf den Nullpunkt abfällt. Bei zunehmender Abtötung der Zellen durch das Antibiotikum kommt es zwangsläufig zu Ungenauigkeiten in der Zählung, da auch Borrelien mitgezählt werden, die kurz vor dem Absterben noch eine geringe Eigenbewegung aufweisen, jedoch bei Subkultivierung nicht mehr die Fähigkeit zur Regeneration und Vermehrung besitzen würden. Daher kann es in diesem Bereich zu einer leicht über der realen Situation liegenden Zellzahl kommen. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache bestätigt die Abtötungskinetik sehr gut den für die MBK festgestellten Wert von 16 µg/ml.



**Abbildung 10: Time-Kill-Kinetik des *B. spielmanii*-Isolates PC Eq 17 bei Inkubation mit Ceftriaxon in verschiedenen Konzentrationen**

Die Ergebnisse wurden mittels konventioneller Zellzählung im Dunkelfeldmikroskop nach 0, 24, 48, 72, 96 und 120 h in zwei unabhängigen Versuchen ermittelt und sind als Mittelwert dieser zwei Experimente angegeben. Die fett gedruckten Kurven zeigen die Wachstumskontrolle (GC) sowie den Median der photometrisch gemessenen MHK (0,031 µg/ml) sowie der mittels Subkultivierung bestimmten MBK (2 µg/ml).

Die photometrisch gemessene MHK für das Antibiotikum Ceftriaxon lag bei 0,031 µg/ml (Median aus drei Experimenten). In der Graphik zeigt die Kurve für diese Konzentration eine deutliche Absenkung und damit eine Hemmung bzw. ein Absterben der Zellen an. Auch die Kurve für die Konzentration von 0,016 µg/ml zeigt bereits eine leichte Absenkung. In diesem Bereich findet keine vollständige Hemmung statt, einige Zellen können sich weiterhin vermehren und Stoffwechsel betreiben und verursachen somit bei der photometrischen Messung eine Senkung der Extinktion.

Die für diesen Stamm mittels Subkultivierung bestimmte MBK lag im Median aus drei Experimenten bei 2 µg/ml. Wie oben ersichtlich wird die verlangte Abtötung um 99,9 % auf schlussendlich weniger als 25.000 Zellen bei der Konzentration von 2 µg/ml schon nach weniger als 72 Stunden erreicht. Wenige Stunden später fallen auch die Kurven für die Konzentration 1 µg/ml und 0,5 µg/ml unter diesen Wert.

Niedrigere Konzentrationen erreichen diese Marke nicht bzw. erst nach deutlich mehr als 72 Stunden.

Auch hier zeigt sich die hohe Konformität mit den in den übrigen Versuchen erhaltenen Daten, wodurch die Zuverlässigkeit dieser Methode weiter untermauert wird.



## 5 Diskussion

### 5.1 Bedeutung von *B. spielmanii* als Erreger der Lyme Borreliose

Die Genospezies *B. spielmanii* wurde 1992 erstmals aus der Haut eines niederländischen Patienten isoliert und erst einige Jahre später als vierte humanpathogene Spezies beschrieben und molekulargenetisch charakterisiert [Richter 2006, Wang 1999a]. Seither wurde *B. spielmanii* bereits beim Menschen in den Niederlanden, in Deutschland, Slowenien und Ungarn sowie bei Zecken aus Deutschland, Frankreich, der Tschechischen Republik und der Ukraine nachgewiesen [Derdáková 2003, Fingerle 2007b, Fingerle 2007a, Földvári 2005, Maraspin 2006, Nefedova 2005, Richter 2004b, Wang 1999a].

Erste Untersuchungen über die Prävalenz dieser Genospezies deuten auf eine fokale geographische Verbreitung hin. Dabei waren in den verschiedenen untersuchten Gebieten zwischen 0 und 18 % der mit Borrelien infizierten Zecken Träger von *B. spielmanii* [Richter 2004b]. Das Auftreten von *B. spielmanii* ist dabei eng an das Vorkommen des Gartenschlänglers gebunden, der als Hauptreservoirwirt für diese Genospezies dient. In endemischen Gebieten scheinen nahezu alle Gartenschlängler mit *B. spielmanii* infiziert zu sein, wohingegen bei anderen Tieren wie etwa dem Igel oder der Haselmaus nur ganz vereinzelt Nachweise dieses Erregers gelangen [Richter 2004b, Skuballa 2007]. Die Adaptation von *B. spielmanii* an das Immunsystem des Reservoirwirts und die damit einhergehende starke Wirtsspezifität lassen vermuten, dass es sich bei anderen Säugetieren wie auch dem Menschen eher um Fehlwirte handelt [Herzberger 2007, Richter 2004b]. Auf Grund der engen Bindung an den nur in bestimmten Habitaten vorkommenden Gartenschlängler ist eine flächendeckende Ausbreitung des Erregers bzw. ein rapider Anstieg der Krankheitsfälle beim Menschen in Zukunft nicht zu erwarten, zumal bereits bewiesen wurde, dass es sich bei *B. spielmanii* nicht um eine evolutionär neue Genospezies handelt [Fingerle 2007a].

Die für die vorliegende Studie verwendeten *B. spielmanii*-Isolate stammen, wie oben dargestellt, aus Zecken und aus humanen Hautbiopsaten am Ort einer EM-Läsion. Ein humanes Isolat aus anderem Material, etwa aus Blut, Liquor oder Synovia konnte bisher noch nicht isoliert werden. Darüber hinaus sind nur wenige Informationen über den klinischen Verlauf der durch *B. spielmanii* verursachten Borreliose erhältlich. Von zwei Patienten ist bekannt, dass nach der Isolation von *B. spielmanii* in den Jahren 1988 bzw. 2000 und der Administration von Ceftriaxon für 5 Tage i.m. bzw. für 8 Wochen p.o. das EM der Haut verschwand, und danach keine weiteren Symptome mehr auftraten

---

[Fingerle 2006b]. Über eine Patientin aus Ungarn wird berichtet, dass ihre Begleitsymptome (Kopfschmerzen, seröser Nasenausfluss) spontan bereits vor der Behandlung verschwanden. Das EM dieser Patientin, aus dem sich *B. spielmanii* isolieren ließ, wurde antibiotisch behandelt, es gibt jedoch keinen Bericht über die weitere Entwicklung dieses Falls [Földvári 2005]. In einem vierten publizierten Fall konnte ein seit mindestens 14 Tagen bestehendes und von Knieschmerzen begleitetes EM mittels Amoxicillin für 15 Tage erfolgreich behandelt werden [Maraspin 2006].

Auf Grund der geringen Anzahl von Fällen und der begrenzten klinischen Information kann man jedoch nicht grundsätzlich davon ausgehen, dass *B. spielmanii* sich ausschließlich in der Haut des Menschen manifestiert, und dass diese Genospezies keine Spätfolgen verursacht. Eher noch ist anzunehmen, dass auch *B. spielmanii* sich in Einzelfällen trotz adäquater Behandlung im Körper auszubreiten vermag. Analog zu den übrigen untersuchten Borrelienisolate kommt als Ursache hierfür unseren Untersuchungen zu Folge jedoch keine grundsätzlich erniedrigte Empfindlichkeit gegen antibiotische Behandlung in Frage.

Die Bedeutung von *B. spielmanii* für die Veterinärmedizin beschränkt sich nach derzeitigem Wissen darauf, dass es sich bei diesem Spirochäten um den Erreger einer durch Zecken übertragenen Zoonose handelt [Richter 2004b]. Eine direkte klinische Relevanz für Haussäugetiere, die für Lyme Borreliose empfänglich sind, konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden. Allerdings ist es nicht unwahrscheinlich, dass etwa ein Hund auch nach einer Infektion mit *B. spielmanii* Symptome entwickeln kann, zumal alle übrigen humanpathogenen Genospezies bei dieser Tierart bereits als Auslöser der Lyme Borreliose nachgewiesen werden konnten [Hovius 2007]. Eine routinemäßige Speziesdiagnose im Zuge der Lyme Borreliose-Therapie ist beim Hund bzw. beim Tier u.a. aus Kostengründen noch viel weniger denkbar als beim Menschen. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen jedoch, dass die beim Hund zur Bekämpfung der Lyme Borreliose am häufigsten angewendeten Antibiotika Amoxicillin und Doxycyclin gut bis sehr gut wirksam auch gegen *B. spielmanii* sind.

Die Entdeckung von *B. spielmanii* als neue humanpathogene Genospezies gibt jedoch nicht nur Anlass zu Überlegungen über die geeignete Therapie der Lyme Borreliose, sondern hat auch Auswirkungen auf die Bereiche der Diagnostik und Präventionsforschung. Die genetische Heterogenität von Borrelien stellt seit jeher für die mikrobiologische Diagnostik ein erhebliches Problem dar. Bei der Entwicklung und Anwendung von PCR-Primern und Antikörper-Tests muss die hohe Variabilität der

---

Antigene und Gensequenzen mit einbezogen werden. Die Optimierung diagnostischer Tests hinsichtlich Sensitivität und Spezifität unter Einbeziehung aller humanpathogenen Genospezies ist essentiell für die zuverlässige Diagnose einer patenten Lyme Borreliose-Infektion, für die Unterscheidung zwischen Reinfektion und persistierender Infektion und letztendlich auch für die Entwicklung von wirksamen Vakzinen [Wilske 2007]. So wurde z.B. die genetische Information der für die Serodiagnostik wichtigen Proteine Osp17 (DbpA) und OspC durch das Hinzukommen von *B. spielmanii* zu den humanpathogenen Borrelien um 2 bzw. 4 weitere Gen-Cluster ergänzt [Richter 2006]. Auch das OspA hat große Bedeutung für Serodiagnostik und Vakzinenentwicklung, wengleich die genetische Information dieses Proteins stärker konserviert ist, als dies bei OspC und DbpA der Fall ist [Wang 1999b, Wilske 1993].

Wie oben dargestellt kommt der Genospezies *B. spielmanii* eine wichtige Rolle nicht nur bei der Entstehung der humanen Lyme Borreliose, sondern auch bei der Erforschung ihrer Erkennung, Behandlung und Prävention zu. Es bedarf jedoch weiterer Untersuchungen, um eine Aussage über die tatsächliche Prävalenz bzw. Inzidenz von *B. spielmanii* in Europa und speziell in Deutschland machen zu können und um umfassendere Informationen über den klinischen Verlauf der durch diese Genospezies verursachte Erkrankung zu erhalten.

## 5.2 Zur genetischen Charakterisierung der Isolate

Auf Grund des langsamen Wachstums und der speziellen Ansprüche von Borrelien ist die als Goldstandard in der taxonomischen Klassifizierung von Bakterien etablierte Methode der WDDH für Borrelien ungeeignet [Richter 2006].

Es existieren jedoch zahlreiche andere Verfahren zur genetischen Analyse von Borrelien, die mit unterschiedlichem Aufwand durchgeführt werden können und damit eine mehr oder weniger zuverlässige und eindeutige phylogenetische Einordnung von *B. burgdorferi*-Isolaten ermöglichen.

In der vorliegenden Untersuchung wurde als erste Methode zur genetischen Charakterisierung die RFLP-Analyse des 5S-23S Intergenic Spacers gewählt, da diese als sichere, schnelle und zuverlässige Möglichkeit zur Unterscheidung humanpathogener Borrelien gilt [Postic 1994]. Es zeigte sich jedoch, dass das Restriktionsmuster von *B. spielmanii* und *B. afzelii* dargestellt mittels Gelelektrophorese auf einem 2%igen Agarosegel so große Ähnlichkeit aufwies, dass eine verlässliche Unterscheidung nicht möglich war.

---

Bereits Derdakova et al. stellten fest, dass ein von ihnen aus einer Zecke isolierter Borrelien-Stamm, welcher später der Genospezies *B. spielmanii* zugeordnet wurde, mit Hilfe der Mse I-RFLP-Analyse nicht ohne Weiteres von *B. afzelii*-Isolaten zu unterscheiden war. Erst bei einer Abweichung vom Standard-Versuchsprotokoll mit verlängerter Laufzeit des Gels waren kleine Unterschiede erkennbar [Derdákova 2003]. Diese Feststellung wird durch die vorliegende Untersuchung bestätigt, da auch hier die Unterschiede zwischen *B. spielmanii* und *B. afzelii* wesentlich geringer sind, als dies zwischen den anderen Genospezies der Fall ist.

Wang et al. beschrieben für den Stamm A14S ein Restriktionsmuster mit drei Fragmenten, die 106, 68 und 51 bp maßen [Wang 1999a]. Das von Postic et al. beschriebene für die Genospezies *B. afzelii* typische Muster D weist Restriktionsfragmente von 108, 68, 50 und 20 bp auf [Postic 1994]. Da sich kleine Restriktionsfragmente, wie hier das 20 bp-Restriktionsfragment von *B. afzelii*, mit dieser Methode häufig auf dem Gel nicht darstellen lassen, sind die Restriktionsmuster von *B. spielmanii* und *B. afzelii* praktisch nicht unterscheidbar.

Da sich anhand dieser Methode unter Berücksichtigung der Genospezies *B. spielmanii* keine verlässliche Unterscheidung aller humanpathogenen Borrelien vornehmen ließ, wurden zusätzliche molekulargenetische Methoden zur Differenzierung der Isolate herangezogen.

Bei der Sequenzierung des 5S-23S Intergenic Spacers lag die Länge dieses DNA-Fragmentes bei den *B. spielmanii*-Isolaten zwischen 185 und 211 bp, während die Referenzstämme Längen zwischen 214 und 236 bp aufwiesen. Dieses DNA-Teilstück scheint also bei *B. spielmanii* im Allgemeinen deutlich kleiner zu sein, als dies bei den anderen humanpathogenen Genospezies der Fall ist [Wang 1999a]. Diese Beobachtung ist jedoch für eine eindeutige Spezieszuordnung allein nicht ausreichend.

Auf Basis der Sequenz des Intergenic Spacers, welcher mittels PCR amplifiziert worden war, wurden deshalb ein Alignment durchgeführt und eine phylogenetische Analyse erstellt. Hierdurch ließ sich die Heterogenität zwischen den Isolaten deutlicher darstellen und in Kombination mit den Ergebnissen der RFLP-Analyse eine eindeutige Zuordnung zu den Genospezies vornehmen.

Auch die Darstellung des Plasmidprofils von *B. burgdorferi* ist gut geeignet für die genetische Charakterisierung und Typisierung von Borrelien-Isolaten [Barbour 1988a, Xu 1995]. Häufig zeigen Isolate, die sich bezüglich ihres Restriktionsmusters in der RFLP-Analyse ähneln, auch hohe Übereinstimmung in ihrem Plasmidprofil [Zingg

---

1993]. Diese Beobachtungen konnten in der vorliegenden Untersuchung insofern bestätigt werden, als insbesondere innerhalb der Genospezies *B. spielmanii* eine hohe Übereinstimmung des Plasmidmusters zu beobachten war, wobei sich die Isolate in 2 Gruppen mit charakteristischem Plasmidmuster einteilen ließen. Das Plasmidmuster der Genospezies *B. afzelii*, welche verglichen mit *B. spielmanii* ein sehr ähnliches Aussehen in der RFLP-Analyse aufwies, zeigte eine weniger ausgeprägte aber immer noch deutliche Ähnlichkeit mit dem Plasmidmuster von *B. spielmanii*.

Bei der Mehrzahl der Plasmide von *B. burgdorferi* handelt es sich um lineare Plasmide [Casjens 1993]. Für diese Studie wurde die Plasmid-DNA entsprechend der Methode nach Barbour nicht fraktioniert, so dass keine Unterscheidung zwischen linearen Molekülen und zirkulären Molekülen vorgenommen werden konnte. Damit beziehen sich die Größenangaben nicht immer auf die wahre molekulare Größe der extrachromosomalen DNA-Stücke, sondern auf deren Lage im Vergleich zu Referenzpunkten im Gel. Die Aussagekraft der Ergebnisse in Bezug auf die genetische Charakterisierung und Unterscheidung der einzelnen Isolate leidet hierunter nicht [Barbour 1988a].

Die Plasmidprofilanalyse mittels PFGE ist bereits häufig zur genetischen Charakterisierung von Borrelien verwendet worden [Hunfeld 2005, Picken 1995, Zingg 1993]. Ein direkter Vergleich verschiedener Studien zur Plasmidprofilanalyse ist jedoch nur eingeschränkt möglich, da die Größe der Plasmide variieren kann, je nach dem welche Methoden zur Preparation, Separation und Charakterisierung der Plasmide verwendet wurden. Trotzdem ist die Plasmidanalyse mittels PFGE eine nützliche Methode zur Charakterisierung von Borrelien-DNA, zur Unterscheidung einzelner Genospezies und sogar zur Subtypisierung innerhalb einer Genospezies [Hughes 1992, Xu 1995].

Während ihrer *in vitro* Kultivierung können Borrelien Plasmide verlieren und ihre Infektiosität einbüßen. Dieses Phänomen konnte bereits nach 11-15 Passagen bzw. nach ca. 140-200 Generationen nachgewiesen werden [Johnson 1984, Schwan 1988]. Für die vorliegenden Versuche wurden mit Ausnahme des Stammes B31e2 niedrig passagierte Isolate (< 10 Passagen) verwendet, um dieses Phänomen zu vermeiden. Dennoch zeigt das Patientenisolat PSigII das Fehlen des Plasmides, auf dem bekanntermaßen die genetische Information für die Proteine OspA und OspB lokalisiert sind. Diese Proteine werden vor allem im Vektor auf der Oberfläche der Borrelie exprimiert, dienen der Anheftung der Spirochäten an den Zeckendarm und sind damit essentiell für die spätere

Migration in die Speicheldrüse der Zecke [Neelakanta 2007, Pal 2000]. Auf die antimikrobielle Empfindlichkeit hat dieses Phänomen offensichtlich keine besonderen Auswirkungen, wie auch in der vorliegenden Untersuchung deutlich wird.

Weiterhin war zu beobachten, dass das Plasmid, welches die genetische Information für das Protein OspA trägt, bei der Genospezies *B. burgdorferi* s.s. kleiner war als bei den übrigen Genospezies. Diese Beobachtung war bereits von Samuels et al. gemacht worden, die für dieses Plasmid eine Größe von 50 kb bei *B. burgdorferi* s.s. und für die übrigen Genospezies eine Größe von 55-60 kb feststellten [Samuels 1993a].

Insgesamt zeigte sich in den Untersuchungen, dass die Plasmidprofilanalyse allein und auch als Ergänzung zu anderen Methoden, wie etwa der RFLP-Analyse mit Mse I, gut geeignet war, um auch unter Einbeziehung der neu entdeckten Genospezies *B. spielmanii* eine zuverlässige Identifizierung und molekulargenetische Differenzierung humanpathogener Borrelien-Isolate vorzunehmen. Besonders bemerkenswert war bei der Betrachtung der *B. spielmanii*-Isolate die Übereinstimmung der Ergebnisse der Plasmidprofilanalyse und des Sequenzalignments der 5S-23S DNA. Die im phylogenetischen Stammbaum jeweils in eine der beiden Gruppen clusternden Isolate zeigten untereinander in der Plasmidanalyse eine hohe Übereinstimmung des Plasmidprofils. Beide Methoden führten also zur Auftrennung von *B. spielmanii* in zwei Untergruppen, wobei übereinstimmend jeweils die Isolate A14S, PMai, PSigII, PMew und PHap vergleichbare Eigenschaften zeigten, und die Isolate TIsarII, TIsarIII, PAnz, PJes und PC Eq 17 gemeinsam dem 2. Subtyp zuzuordnen waren.

Bei den Isolaten der 1. Gruppe handelt es sich um vier Patientenisolate aus Deutschland und eines aus den Niederlanden, die Isolate der 2. Gruppe stammen von zwei Patienten aus Slowenien sowie von Zecken aus Deutschland und Frankreich (siehe Tabelle 2). Es lassen sich folglich anhand des Plasmidprofils bzw. der Sequenzanalyse keine eindeutigen Rückschlüsse auf die geographische bzw. biologische Herkunft ziehen. Wohl aber ist durch die Kombination der verwendeten Verfahren eine umfassende genetische Charakterisierung der Isolate möglich. Die dargestellten Ergebnisse unterstreichen darüber hinaus die einzigartigen genotypischen und phänotypischen Charakteristika von *B. spielmanii*.

### 5.3 Qualitätskontrolle mit *S. aureus* ATCC 29213 zur Untersuchung von Antibiotika-Medium-Interaktionen

Die Notwendigkeit einer Qualitätskontrolle zur Untersuchung bzw. zum Ausschluss signifikanter Wechselwirkungen zwischen den verwendeten antibiotischen Substanzen und dem für die Wachstumstests mit Borrelien benötigten BSK-Medium war gegeben, da bereits mehrere Autoren von Einflüssen dieses Spezialmediums auf verschiedene Antibiotika berichtet hatten [Boerner 1995, Hunfeld 2006b, Hunfeld 2000b, Reisinger 1995]. Durch die Verwendung eines schnell wachsenden Staphylokokken-Stammes, für den durch das CLSI ermittelte MHK-Referenzwerte vorlagen, konnten Rückschlüsse auf die Stabilität der Antibiotika in BSK-Medium während der 72-stündigen Inkubationszeit gezogen und damit die Validität der für die Borrelienisolate ermittelten Werte unterstrichen werden.

Die in den Experimenten zur Qualitätskontrolle ermittelten MHK-Werte für den Referenzstamm standen im Wesentlichen in guter Übereinstimmung mit den durch die CLSI vorgegebenen Werten. Eine deutliche Abweichung nach oben ergab sich jedoch für das Antibiotikum Amoxicillin. Die MHK der Substanz Clarithromycin kam hingegen eine Verdünnungsstufe unterhalb der zulässigen Untergrenze zu liegen (siehe Tabelle 9).

Durch die Qualitätskontrolle beim Hersteller war sichergestellt, dass die durch das CLSI für den Referenzstamm ermittelten MHK-Werte mit Hilfe der Mikrotiterplatten zuverlässig reproduzierbar sind. Der in diesem Experiment beobachtete Aktivitätsverlust von Amoxicillin, bzw. der Aktivitätszuwachs von Clarithromycin sind folglich zurückzuführen auf Wechselwirkungen zwischen Antibiotikum und BSK-Medium während der 72-stündigen Inkubation der Mikrotiterplatte.

Die verwendeten  $\beta$ -Lactame besitzen, mit Ausnahme von Ceftriaxon, in wässriger Lösung nur eine relativ geringe chemische Stabilität, sodass sie im Verlauf der Zeit zunehmend an Wirkung verlieren [Boerner 1995, Stiernstedt 1996]. Dieses Phänomen zeigte sich besonders deutlich bei Amoxicillin. Hier lag die MHK nach der 48-stündigen Vorinkubation bzw. nach der 72-stündigen Gesamtinkubation der Mikrotiterplatte 2 Verdünnungsstufen oberhalb der durch das CLSI vorgegebenen Obergrenze. Im Falle von Cefuroxim kam die MHK exakt an der Obergrenze zu liegen, für Penicillin lag sie oberhalb des messbaren Bereiches.

Erythromycin und Clarithromycin hingegen zeigten einen geringen Aktivitätszuwachs in BSK-Medium. Hier lag die MHK eine Verdünnungsstufe unterhalb der Untergrenze

---

(Clarithromycin) bzw. genau an der unteren Grenze (Erythromycin). Die erhöhte Aktivität von Makroliden in BSK-Medium wurde bereits mehrfach beschrieben und kann zur Überschätzung der Wirksamkeit dieser Substanzen beim Einsatz in der Lyme Borreliose-Therapie führen [Hunfeld 2006b]. Diese Tatsache muss bei der Beurteilung der in den Experimenten ermittelten hervorragenden Hemmwirkung der Makrolide berücksichtigt werden.

Die Diskrepanz zwischen der guten klinischen Wirksamkeit von Penicillin und den verhältnismäßig hohen *in vitro* MHK- und MBK-Werten ist bereits lange bekannt [Johnson 1984, Preac-Mursic 1986]. Auch Amoxicillin und Cefuroxim zeigen auf Grund ihrer chemischen Instabilität schlechtere Ergebnisse in *in vitro* Experimenten, als die mit diesen Substanzen erzielten klinischen Erfolge erwarten lassen [Hunfeld 2006b]. Die bekannte und hiermit abermals nachgewiesene Instabilität der  $\beta$ -Lactame in wässriger Lösung muss daher insbesondere bei der Interpretation der MBK-Werte für diese Substanzen mit einbezogen werden.

#### **5.4 *In vitro* Testung von *B. burgdorferi* s.l. gegen Antibiotika und Chemotherapeutika**

Die *in vitro* Testung von *B. burgdorferi* gegen Antibiotika und Chemotherapeutika dient als Grundlage zur Erstellung neuer Therapiekonzepte zur Behandlung der Lyme Borreliose [Boerner 1994]. Sie ist unumgänglich, um Erkenntnisse über die Empfindlichkeit oder auch die Resistenzen von Bakterien gegen chemische Substanzen unter definierten Bedingungen zu erhalten. Durch *in vitro* Testungen lassen sich zum Einen grundsätzliche Aussagen über die Wirksamkeit von bekannten oder neu eingeführten Medikamenten treffen. Zum Anderen erhält man Informationen über das Verhalten und die Entwicklung einzelner Isolate oder ganzer Bakterienspezies unter Antibiotikaeinfluss und kann schließlich auch Aussagen über Resistenzmechanismen und Überlebensstrategien dieser Bakterien treffen. Die *in vitro* Testung bietet damit in Kombination mit klinischen Therapiestudien sowohl die Möglichkeit zur Optimierung alter Therapieschemata in Hinsicht auf die Auswahl und Konzentration bekannter Stoffe, als auch die Möglichkeit der Erprobung neuer Substanzen, um schlussendlich individuelle, sichere und zuverlässig wirksame Therapien zu erhalten.

Trotz allem ist die Interpretation und Vergleichbarkeit von Daten zur antibiotischen Empfindlichkeit von Borrelien, welche in *in vitro* Studien gewonnen wurden, ebenso problematisch wie deren Übertragbarkeit auf die Situation *in vivo*. Da Borrelien sehr

---

anspruchsvolle Organismen sind und darüber hinaus sehr lange Generationszeiten aufweisen, wirken sich kleine Veränderungen in den Testbedingungen sehr viel stärker auf die Ergebnisse aus, als dies etwa bei schnell wachsenden, anspruchslosen Organismen der Fall ist [Boerner 1994]. So kann bereits eine Veränderung einzelner Komponenten des Mediums dazu führen, dass ein Stamm bzw. ein Isolat schlechter oder überhaupt nicht mehr wächst [Rodriguez 2007]. Genauso beeinflussen Abweichungen im pH-Wert das Wachstum von Borrelien [Ruzic-Sabljić 2004]. Sogar die Verwendung unterschiedlicher Chargen von bovinem Serum Albumin (BSA) hat Einfluss auf Wachstumskinetiken, antigenetische Charakteristika und die Morphologie der Borrelien [Callister 1990].

Auch in unseren Untersuchungen war zu beobachten, dass minimale Veränderungen in den Kulturbedingungen, wie z.B. kleine Schwankungen in der Zusammensetzung des selbst hergestellten BSK-Mediums, sich teilweise negativ auf Wachstum und Vitalität der Zellen auswirkten. Auch Abweichungen in der Versuchsdurchführung, wie etwa eine Unterbrechung des Versuches durch technische Probleme, wirkten sich deutlich negativ aus. Um dieser Tatsache Rechnung zu tragen wurde genau darauf geachtet, die Versuchsbedingungen so stabil wie möglich zu halten, um die Ergebnisse nicht zu verfälschen. So wurden die Experimente wiederholt, wenn ein einzelner Stamm ein ungewöhnlich starkes oder schwaches Wachstum etwa durch verlängerte Sauerstoff-Exposition während des Versuchsansatzes zeigte. Auch wurden die Isolate nur dann zur Testung verwendet, wenn sie bei der regelmäßig und besonders vor Beginn jedes Versuches durchgeführten mikroskopischen Kontrolle eine gute Dichte und Vitalität aufwiesen. War dies nicht der Fall, wurde der Stamm weiter inkubiert und subkultiviert, bis seine Vitalität und Dichte im Normalbereich lagen. Auf diese Weise konnten sehr zuverlässig reproduzierbare Daten gewonnen werden.

Neben Abweichungen bei der individuellen Durchführung einer einzigen Methode führen selbstverständlich die zwischen verschiedenen Testmethoden bestehenden Unterschiede zu noch größeren Differenzen der Ergebnisse. Die von unterschiedlichen Arbeitsgruppen angewandten Testbedingungen (z.B. bezüglich Inkubationszeit, Dichte des Inokulums, Zusammensetzung des Mediums usw.) sowie die Kriterien für die Interpretation der Test (z.B. Definition von MHK und MBK) unterscheiden sich zum Teil erheblich, und führen damit zur Entstehung stark abweichender Testresultate [Boerner 1995, Hunfeld 2002a].

Aus diesem Grund wurde für die Testung der antibiotischen Empfindlichkeit von *B. spielmanii* eine standardisierte Methode verwendet. Durch die vergleichende Testung von 8 Isolaten der Genospezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii*, für die in vorherigen Studien bereits eine Charakterisierung des Empfindlichkeitsspektrums durchgeführt wurde, konnte ein methodisch vergleichbares Empfindlichkeitsprofil von *B. spielmanii* erstellt werden.

Mit insgesamt 18 getesteten Isolaten handelt es sich in der hier vorliegenden Untersuchung um ein im Vergleich zu anderen Studien zur *in vitro* Empfindlichkeit von Borrelien sehr umfangreiches Stammkollektiv. Auf Grund der aufwändigen Methodik und nicht zuletzt auch wegen der Problematik der Erregerisolation und -anzucht aus Patientenmaterial ist es nicht möglich, eine ähnlich große Anzahl von Stämmen zu testen, wie dies etwa bei der Erstellung eines *in vitro* Empfindlichkeitsprofils von schnell wachsenden Mikroorganismen getan wird. Durch die verhältnismäßig geringe Anzahl von Isolaten hat die Auswahl des Stammkollektivs zwangsläufig einen maßgeblichen Einfluss auf das Ergebnis der statistischen Analyse. Im Besonderen in der 4-Gruppenanalyse kann das Vorhandensein einzelner besonders empfindlicher oder resistenter Isolate, die durch zufällige Auswahl in die Untersuchung einbezogen wurden, zu abweichenden statistischen Ergebnissen im Vergleich zur Testung eines anderen Stammkollektivs führen.

Im Einzelnen ergaben sich in unseren Untersuchungen für die verwendeten Antibiotika die im Folgenden diskutierten Ergebnisse.

#### **5.4.1 *In vitro* Testung von Doxycyclin**

Doxycyclin gilt sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin als Standardtherapeutikum bei der Bekämpfung der Lyme-Borreliose.

In der vorliegenden Untersuchung konnte die hervorragende Wirksamkeit dieser Substanz gegen alle bekannten humanpathogenen Borrelien-Genospezies unterstrichen werden. Die für die getesteten Vergleichsisolate gefundenen MHK- und MBK-Werte stehen in gutem Einklang mit den Ergebnissen anderer Autoren [Hunfeld 2005].

Kleinere Diskrepanzen zwischen den in unterschiedlichen Studien gefundenen MHK- und MBK-Werten kommen u.a. zwangsläufig zu Stande durch die Verwendung unterschiedlicher Stammkollektive. Bei der *in vitro* Testung von Borrelien werden im Vergleich zur Testung schnell wachsender Bakterien verhältnismäßig wenige Isolate verwendet, da Borrelien als anspruchsvolle Mikroorganismen nur mit hohem Zeit- und

Materialaufwand zu kultivieren sind. Daher führen bereits einzelne besonders resistente oder empfindliche Isolate dazu, dass kleinere aber zum Teil sogar statistisch signifikante Unterschiede in den Studienergebnissen entstehen.

Insgesamt konnte jedoch nachgewiesen und bestätigt werden, dass Doxycyclin auf alle humanpathogenen Borrelien inklusive der Genospezies *B. spielmanii* eine sehr gute Hemmwirkung ausübt. Die  $MHK_{90}$  liegt bei  $0,25 \mu\text{g/ml}$ , es werden also mindestens 90 % der Isolate bei dieser Konzentration durch Doxycyclin im Wachstum gehemmt.

Da es sich bei Doxycyclin um ein primär bakteriostatisches Antibiotikum handelt, liegt die  $MBK_{90}$  mit  $32 \mu\text{g/ml}$  relativ hoch.

Beim Menschen wird bei einer Dosis von 100 mg i.v. ein maximaler Serumspiegel von ca.  $3,5 \mu\text{g/ml}$  erreicht. Als Standard in der Borreliose-Therapie werden 100 mg p.o. zweimal täglich verabreicht, so dass bei einer enteralen Resorption von  $> 90 \%$  ähnlich hohe Serumspiegel resultieren. [Forth 2001].

Beim Hund erreicht die Plasmakonzentration von Doxycyclin nach der Gabe von 5 mg/kg i.v. eine Höhe von  $11,56 \pm 1,09 \mu\text{g/ml}$  [Riviere 1995]. Bei der für die Borreliose empfohlenen Standarddosis von 10-20 mg/kg p.o. und einer oralen Bioverfügbarkeit von bis zu 70 % [McEvoy 1992] werden also grundsätzlich beim Hund und beim Menschen ausreichend hohe Wirkspiegel erreicht, um einen bakteriostatischen Effekt gegen alle humanpathogenen Borrelienspezies zu erzielen.

Die aufgeführten Zahlen machen deutlich, dass selbst bei individuell unterschiedlicher Aufnahme und Verstoffwechslung die intra- und interspeziespezifischen Unterschiede bezüglich der Empfindlichkeit gegen Doxycyclin nicht ausreichend sind, um das Versagen einer Therapie auf Grund dieser geringen Unterschiede erklären zu können.

Zwar kann man die Verhältnisse *in vitro* bekanntermaßen nicht problemlos auf die Verhältnisse *in vivo* übertragen, doch ist es in diesem Fall nicht anzunehmen, dass einer hervorragenden *in vitro* Wirksamkeit von Doxycyclin gegenüber *B. spielmanii* eine schlechtere *in vivo* Wirksamkeit entgegensteht, zumal dies auch für die anderen Genospezies nicht der Fall ist. Doxycyclin ist damit als ausgezeichnet wirksames Medikament in der Therapie der Lyme Borreliose anzusehen.

#### **5.4.2 *In vitro* Testung von Penicillin**

Penicillin als Prototyp der  $\beta$ -Lactame kann und wird auf Grund seiner guten Wirksamkeit gegen Borrelien und nicht zuletzt wegen seiner guten Verträglichkeit in allen Stadien der Lyme Borreliose eingesetzt werden. Im Stadium I wird das besser

---

resorbierbare Penicillin V als Oralpräparat eingesetzt, im Stadium II wird Penicillin G (Benzylpenicillin) in hohen Dosen i.v. verabreicht (siehe Tabelle 1). Für die *in vitro* Testung wurde in unserer Studie nur Penicillin G verwendet, welches sich von Penicillin V jedoch im Wesentlichen nur durch seine Pharmakokinetik unterscheidet [Forth 2001].

Mit einer MHK<sub>90</sub> von 0,25 µg/ml war die *in vitro* Wirksamkeit grundsätzlich als gut zu beurteilen. Mit Ausnahme der *B. afzelii*-Isolate lag die MHK oft deutlich niedriger, zum Teil war sie sogar im nicht mehr messbaren Bereich ( $\leq 0,016$  µg/ml) zu finden.

Bekanntermaßen besitzt Penicillin in wässriger Lösung nur eine geringe chemische Stabilität. Studien von Stiernstedt et al. konnten zeigen, dass innerhalb einer dreitägigen Inkubation in BSK-Medium die Konzentration von Penicillin von 9 µg/ml auf lediglich 2 µg/ml sinkt [Stiernstedt 1996]. Damit sinkt die Konzentration dieser Substanz innerhalb der Inkubationszeit in den mit Borreliensuspension gefüllten Wells um annähernd 80 %. Bedingt durch diesen Effekt wurde trotz anfänglich guter und schneller Hemmwirkung keine vollständige Abtötung erreicht, und die MBK kam in fast allen Fällen oberhalb des messbaren Bereiches ( $> 1$  µg/ml) zu liegen. Eine statistische Analyse der MBK ließ sich nicht mehr sinnvoll durchführen.

Auch bei der Bestimmung der MHK von Penicillin mit *S. aureus* ATCC 29213 lag die MHK in allen Fällen oberhalb der auf der Mikrotiterplatte aufgetragenen maximalen Konzentration. Die Verwendung einer weiteren Mikrotiterplatte mit höheren Konzentrationen im Zuge der Experimente hätte dabei keinen nennenswerten Erkenntniszuwachs gebracht, da wie bereits für Amoxicillin beschrieben die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse bezüglich der MBK kaum auf die beim Patienten vorliegende Situation übertragbar sind. *In vivo* wird Penicillin drei- bis viermal täglich verabreicht, um einen ausreichend hohen Wirkstoffspiegel zu erhalten. So liegt z.B. die Serumkonzentration beim Menschen 1-2 Stunden nach Applikation einer Dosis von 1ME Penicillin V p.o. bei 2-3 µg/ml, und fällt innerhalb von 6 Stunden auf 0,25 µg/ml ab [Forth 2001]. Auf Grund der großen therapeutischen Breite können bis zu 10 ME Penicillin drei- bis viermal täglich verabreicht werden, wodurch sich initial noch höhere Wirkspiegel erreichen lassen.

Stiernstedt et al. empfehlen für die Testung der *in vitro*-Wirksamkeit chemisch instabiler Antibiotika eine spezielle Dialyse-Methode, bei der die Konzentrationen der Substanzen stets auf einem gleichmäßig hohen Level gehalten werden. Diese Methode soll im Gegensatz zu konventionellen Methoden ungeachtet des Substanzerfalls eine

exakte Bestimmung der MHK ermöglichen [Stiernstedt 1996]. Zwar liegen die mit Hilfe dieser Methode ermittelten Hemmkonzentrationen deutlich niedriger als bei vergleichbaren herkömmlichen Makrodilutionsmethoden, die Projektion dieser Ergebnisse auf die Verhältnisse *in vivo* ist jedoch ähnlich problematisch. Da die Halbwertszeit von Penicillin G im Blutplasma bei lediglich 30 min liegt [Forth 2001], sinkt auch im Organismus die Konzentration zwischen zwei Applikationen rasch ab. Eine stets gleichbleibende Plasmakonzentration entspricht damit genausowenig den Verhältnissen *in vivo*, wie Makrodilutionsmethoden ohne Substanzausgleich dies tun. Trotz der mäßigen *in vitro* Wirkung von Penicillin insbesondere bei Betrachtung der MBK sind die mit Penicillin zu erzielenden klinischen Erfolge gut. *B. spielmanii* zeigt keine wesentlich abweichende Empfindlichkeit gegen Penicillin verglichen mit den übrigen humanpathogenen Genospezies. Es ist folglich davon auszugehen, dass auch *in vivo* eine zuverlässige Elimination von *B. spielmanii* mittels Penicillin gewährleistet ist.

#### 5.4.3 *In vitro* Testung von Amoxicillin

Amoxicillin zeigte mit einer  $MHK_{90}$  von 2  $\mu\text{g/ml}$  die schlechteste *in vitro* Hemmwirkung unter den  $\beta$ -Lactamen. Trotzdem ist die Wirksamkeit dieser Substanz insgesamt als gut zu beurteilen, zumal zahlreiche Isolate auch bei deutlich niedrigeren Konzentrationen gehemmt wurden.

Der guten *in vitro* Hemmwirkung steht eine mäßige bis schlechte *in vitro* Abtötungswirkung entgegen. Ähnlich wie das Penicillin ist auch Amoxicillin in wässriger Lösung instabil. So übt es initial einen hervorragenden bakteriziden Effekt aus und verhindert damit die Vermehrung der Zellen und den Indikatorumschlag, bei zunehmender Inkubationsdauer zerfällt es jedoch rasch und die bis dahin noch nicht abgetöteten Borrelien können sich regenerieren und wiederum vermehren. Dies wird auch unterstützt von der Beobachtung, dass die MBK von Amoxicillin zum Teil mehr als 7 Verdünnungsstufen über der MHK zu liegen kam. *In vivo* wird dieser Effekt weitgehend abgefangen durch die drei mal tägliche Gabe von Amoxicillin jeweils im Abstand von 8 Stunden, wodurch die Serumspiegel trotz des Zerfalls nicht auf subtherapeutische Werte abfallen. Beim Menschen erreicht Amoxicillin im Serum 4-6 Stunden nach oraler Einnahme von 1 g eine Konzentration von 3-4  $\mu\text{g/ml}$  [Forth 2001]. Mit dieser Konzentration ist der vorliegenden Untersuchung zu Folge eine Hemmwirkung auf alle humanpathogenen Borrelien zuverlässig gewährleistet. Die  $MHK_{90}$  lag bezogen auf alle Isolate bei 2  $\mu\text{g/ml}$ , viele Isolate wurden schon bei

wesentlich niedrigeren Konzentrationen im Wachstum gehemmt. Wenngleich *B. garinii* sich insgesamt empfindlicher gegen Amoxicillin zeigte, war die Hemmwirkung von Amoxicillin auch auf *B. spielmanii*, *B. afzelii* und *B. burgdorferi* s.s. insgesamt als gut zu betrachten.

Die Qualitätskontrollexperimente mit *S. aureus* ATCC 29213 zeigten deutlich den Wirkungsverlust von Amoxicillin in wässriger Lösung (siehe Abschnitt 3.2.7). Die nach vorausgehender 72-stündiger Inkubation der Mikrotiterplatte mit in BSK-Medium gelöstem Amoxicillin gemessene MHK für den Referenzstamm lag mit 2 µg/ml deutlich oberhalb der vom CLSI für diesen Stamm veröffentlichten Grenzen (0,12-0,5 µg/ml). Die gemessenen MBK-Werte sind damit auf Grund des schnellen Zerfalls von Amoxicillin nicht aussagekräftig. Es ist jedoch nicht möglich, in der *in vitro* Testung von Borrelien der chemischen Instabilität der β-Lactame entgegenzuwirken, da niedrigere Temperaturen während des Versuches oder verkürzte Inkubationszeiten das Wachstum der Borrelien beeinträchtigen würden. Auch eine Methode zur MHK-Bestimmung mit gleichbleibenden Substanzkonzentrationen, wie sie für Penicillin bereits durchgeführt wurde, imitiert nicht die natürlichen *in vivo* Verhältnisse (siehe Abschnitt 5.4.2.) [Stiernstedt 1996].

Da Amoxicillin jedoch zur Therapie der Lyme Borreliose dreimal täglich verabreicht wird, kommt es *in vivo* nicht zu einem derartigen Konzentrations- und Wirkungsverlust dieser Substanz wie in den vorliegenden Experimenten. Die klinischen Erfolge von Amoxicillin sind überzeugend, weshalb diese Substanz sehr häufig eingesetzt und zur Therapie der Lyme Borreliose empfohlen wird [Fingerle 2006a, Wormser 2000].

Abgesehen von der insgesamt schlechten Abtötungswirkung zeigte Amoxicillin in den vorliegenden Untersuchungen eine gute Wirksamkeit auch gegen *B. spielmanii*.

Die im Gegensatz zu den Vergleichsisolaten signifikant höhere MBK der *B. spielmanii*-Isolate sollte vor dem Hintergrund der oben diskutierten pharmakokinetischen Instabilität von Amoxicillin nicht überbewertet werden.

#### **5.4.4 *In vitro* Testung von Cefuroxim**

Das Cephalosporin Cefuroxim wird vor allem zur Therapie des Stadium I der Lyme Borreliose eingesetzt. Daher ist es in der Praxis wenig relevant für die Veterinärmedizin, da hier die Patienten zumeist nicht in Frühphasen der Erkrankung auffällig werden. In der vorliegenden Untersuchung war Cefuroxim mit einer MHK<sub>90</sub> von 0,25 µg/ml gut wirksam gegen alle getesteten Isolate. Die MBK hingegen lag

---

zumeist im nicht mehr messbaren Bereich ( $> 8 \mu\text{g/ml}$ ), da Cefuroxim in wässriger Lösung und unter Einfluss von UV-Licht rasch zerfällt. Die Plasma-Halbwertszeit liegt beim Menschen bei nur 1,2 Stunden, weshalb hier als Standarddosis die zweimal tägliche Applikation von 500 mg nötig ist, um ausreichende Wirkstoffspiegel zu erzielen. Bei diesem Therapieschema wird beim Menschen eine Konzentration von  $8 \mu\text{g/ml}$  im Plasma erreicht, wodurch eine sehr gute Hemmwirkung auf Borrelien garantiert ist [Forth 2001]. Wie auch für Amoxicillin und Penicillin sind die *in vitro* gemessenen MBK-Werte auf Grund der bekannten chemischen Instabilität dieser Wirkstoffe mit Vorsicht zu interpretieren [Boerner 1994, Boerner 1995].

Bei den Qualitätskontrollexperimenten mit *S. aureus* ATCC 29213 zeigte sich ein deutlicher Einfluss der 48-stündigen Vorinkubation des Antibiotikums in BSK-Medium vor Beeimpfung der Mikrotiterplatten auf das Ergebnis der Empfindlichkeitstestung (siehe Abschnitt 3.2.7). Mit einem Wert von  $2 \mu\text{g/ml}$  lag der Median der MHK aus drei Experimenten am oberen Grenzwert der durch die CLSI veröffentlichten zulässigen Spanne. In einem von drei durchgeführten Experimenten lag die MHK jedoch bei  $4 \mu\text{g/ml}$  und damit oberhalb dieser Grenze. Dieses Ergebnis unterstreicht den negativen Einfluss der Inkubationszeit auf die Stabilität von Cefuroxim und erklärt die bei der Testung gefundenen hohen MBK-Werte.

Der schnelle Zerfall von Cefuroxim in wässriger Lösung kann bei den unvermeidlich immer vorhandenen minimalen Abweichungen der Versuchsbedingungen (z.B. Temperaturschwankungen während des Versuchsansatzes) bereits dazu führen, dass fälschlicher Weise zu hohe Werte gemessen werden. Da Borrelien jedoch eine lange Inkubationszeit in Spezialmedium benötigen, müssen die negativen Auswirkungen auf die Stabilität des Antibiotikums in Kauf genommen werden. Die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf die Situation *in vivo* ist stark eingeschränkt, zumal der Borreliose-Patient zweimal täglich Cefuroxim erhält, und damit dem Abfall des Plasmaspiegels entgegengewirkt wird.

Bezüglich der gemessenen MHK-Werte zeigte sich Cefuroxim in hohem Maße stabil. Bei 14 der 18 getesteten Isolate lag der Median aus drei Experimenten bei  $0,125 \mu\text{g/ml}$ , nur 2 Isolate zeigten jeweils eine Abweichung um 1 bzw. 2 Verdünnungsstufen auf  $0,25$  bzw.  $0,5 \mu\text{g/ml}$ . Cefuroxim ist folglich gegen alle hier getesteten humanpathogenen Borrelien gut und verlässlich wirksam.

#### 5.4.5 *In vitro* Testung von Ceftriaxon

Ceftriaxon zeigte unter den getesteten  $\beta$ -Lactamen mit einer  $MHK_{90}$  von 0,063  $\mu\text{g/ml}$  die beste *in vitro* Aktivität gegen *B. burgdorferi* s.l. Die gemessenen  $MHK$ -Werte schwankten bei den Isolaten zwischen 0,016  $\mu\text{g/ml}$  und 0,125  $\mu\text{g/ml}$ . Die  $MBK_{90}$  lag bei 4  $\mu\text{g/ml}$ . Die für die Vergleichsisolate gemessenen  $MHK$ - und  $MBK$ -Werte stehen im Wesentlichen in Einklang mit den durch Hunfeld et al. und weiteren Arbeitsgruppen bei der Testung der *in vitro* Empfindlichkeit von *B. burgdorferi* s.l. gegen  $\beta$ -Lactame erhaltenen Daten [Henneberg 2002, Hunfeld 2000b, Janovska 2001, Preac Mursic 1996, Sicklinger 2003].

Beim Menschen erreicht die Plasmakonzentration von Ceftriaxon initial nach der Verabreichung der Standarddosis von 2 g i.v. Werte im Bereich von durchschnittlich 200  $\mu\text{g/ml}$ . Diese Konzentration fällt im Laufe von 6 Stunden auf einen Wert von 50  $\mu\text{g/ml}$  ab. Nach 24 Stunden liegt die Konzentration bei gesunden Patienten noch immer bei durchschnittlich 8,8  $\mu\text{g/ml}$ , und damit mehr als doppelt so hoch als der maximal gemessene  $MBK$ -Wert von 4  $\mu\text{g/ml}$  [Forth 2001, Joynt 2001].

Beim Hund erreicht Ceftriaxon nach der Applikation von 50 mg/kg i.m. eine Plasmakonzentration von 115,1  $\mu\text{g/ml}$ , nach Gabe der selben Menge s.c. jedoch nur eine Konzentration von 69,3  $\mu\text{g/ml}$ . Die Konzentration in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) nach Gabe von 50-100 mg/kg i.v. liegt lediglich bei 1,22  $\mu\text{g/ml}$  [Rebuelto 2002]. Die Plasmakonzentrationen liegen folglich beim Hund unabhängig von der Applikationsroute mehr als 10-fach höher als nötig, um auf alle getesteten Isolate einen bakteriziden Effekt auszuüben. Im Liquor ist die Konzentration zwar ausreichend, um einen hemmenden Effekt zu erzielen, eine zuverlässige Abtötung ist jedoch nicht zwangsläufig von vorneherein gewährleistet. Andererseits führt die Einwirkung hemmender Substanzen über einen Zeitraum von 14 Tagen, über den Ceftriaxon bei Neuroborreliose eingesetzt wird, zu einer deutlichen Herabsetzung der  $MBK$ , womit wiederum ein ausreichender bakterizider Effekt erzielt werden kann.

Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen, dass Ceftriaxon hervorragend wirksam gegen alle humanpathogenen Borrelien ist. Die zum Teil gefundenen statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der  $MBK$  zwischen den Genospezies fallen klinisch praktisch nicht ins Gewicht, da die erreichten Plasmakonzentrationen ohnehin einem Vielfachen des maximal gemessenen  $MBK$ -Wertes von 4  $\mu\text{g/ml}$  entsprechen.

#### 5.4.6 *In vitro* Testung von Erythromycin und Clarithromycin

Makrolide sind *in vitro* hervorragend wirksam gegen *B. burgdorferi* s.l. [Hunfeld 2003]. In unseren Untersuchungen konnten wir die ausgezeichnete *in vitro* Hemmwirkung von Clarithromycin (MHK<sub>90</sub> 0,008 µg/ml) und Erythromycin (MHK<sub>90</sub> 0,031 µg/ml) bestätigen. Dabei ließ sich durch die Verwendung einer speziellen Mikrotiterplatte mit extrem niedrigen Konzentrationen (bis 0,0003 µg/ml) eine sehr detaillierte Untersuchung durchführen. Zur Abdeckung der hohen Konzentrationen kam eine zweite Mikrotiterplatte zur Anwendung, um auch den Endpunkt der MBK exakt bestimmen zu können. Die MBK<sub>90</sub> lag für Erythromycin bei 4 µg/ml und für Clarithromycin bei 1 µg/ml. Somit war neben der hervorragenden *in vitro* Hemmwirkung auch eine gute Abtötungswirkung durch die Makrolide zu beobachten. Darüber hinaus zeigten sich signifikant niedrigere MHK- und MBK-Werte der *B. spielmanii*-Isolate für beide Substanzen in Vergleich mit der Gruppe der übrigen humanpathogenen Isolate.

Damit ist eine Makrolid-Therapie gegen *B. spielmanii* ebenso, wenn nicht sogar besser, wirksam als gegen die anderen Genospezies. Trotzdem muss natürlich auch hier die besonders bei den Makroliden augenfällige Diskrepanz zwischen der *in vitro* Wirksamkeit und der *in vivo* Wirksamkeit auf Grund von Faktoren wie Plasmabindung und Serum-Halbwertszeit bedacht werden [Hansen 1992].

Die speziellen pharmakokinetischen Eigenschaften der Makrolide führen zu einer deutlich schlechteren Performance dieser Substanzen *in vivo*, als die hervorragenden Ergebnisse der *in vitro* MHK-Testung es erwarten lassen. Häufig kommt es sogar zu einer Aktivitätssteigerung von Makrolid-Antibiotika unter dem Einfluss von BSK-Medium [Hunfeld 2004]. Diese Beobachtung konnte auch in dem hier durchgeführten Qualitätskontrollexperiment bestätigt werden, in dem der Median der gemessenen MHK von Clarithromycin für den verwendeten Referenzstamm niedriger zu liegen kam, als die durch das CLSI vorgegebene Untergrenze (siehe 3.2.7).

Aus den oben dargestellten Gründen sind in der klinischen Anwendung Substanzen mit schlechterer *in vitro* Hemm- und Abtötungswirkung, wie etwa Tetracycline und β-Lactame, oft deutlich überlegen.

Trotzdem können Makrolide als Reservesubstanzen in der Lyme Borreliose-Therapie zur Anwendung kommen, wenn etwa Allergien gegen β-Lactame vorliegen, oder das Vorliegen einer Schwangerschaft die Anwendung von Tetracyclinen verbietet [Hunfeld 2004].

Entsprechend der in dieser Untersuchung gewonnenen Ergebnisse sind Erythromycin und Clarithromycin *in vitro* auch gegen die Genospezies *B. spielmanii* hochwirksam. Sie können damit als Reservesubstanzen gegen diese Genospezies verwendet werden, sofern andere Antibiotika auf Grund von Kontraindikationen nicht einsetzbar sind.

#### **5.4.7 *In vitro* Testung von Fluorchinolonen**

Fluorchinolone zeigen sich zumeist als wenig wirksam gegen Borrelien, obwohl sie klassischer Weise eine hervorragende Wirksamkeit gegen gramnegative Bakterien besitzen und gegen eine Vielzahl von durch diese Erreger ausgelöste Erkrankungen angewendet werden [Moellering 1996].

In den vorliegenden Untersuchungen wurden die Substanzen Ciprofloxacin und Levofloxacin als Kontrollsubstanzen mit bekanntermaßen geringer Wirksamkeit gegen Borrelien mitgeführt [Kraiczky 2001]. Die *in vitro* erzielten Hemm- und Abtötungseffekte der Fluorchinolone in verschiedenen Studien sind schlecht bis mäßig, obgleich Borrelien die als Zielstruktur für die Wirkung von Chinolonen dienende DNA-Gyrase besitzen, und diese wie bei anderen gramnegativen Erregern auch für das Wachstum von *B. burgdorferi* essentiell ist [Johnson 1989, Lakos 1999, Samuels 1993b]. Nur für wenige Fluorchinolone, wie etwa für die Substanz Gemifloxacin, konnte bisher eine adäquate Wirksamkeit gegen Borrelien nachgewiesen werden, sodass der Einsatz dieser Antibiotikaklasse gegen die Lyme Borreliose im Allgemeinen nicht sinnvoll erscheint [Kraiczky 2001].

Die den Chinolonen zugehörigen Substanzen Ciprofloxacin und Levofloxacin zeigten auch in der vorliegenden Untersuchung wie zu erwarten eine schlechte Wirksamkeit gegen sämtliche getesteten Isolate. Die  $MHK_{90}$  bezogen auf alle Isolate kam bereits oberhalb des messbaren Bereiches bei  $> 4 \mu\text{g/ml}$  zu liegen. In Folge dessen lag auch die  $MBK_{90} > 4 \mu\text{g/ml}$ . Diesen Ergebnissen entsprechend ließ sich keine sinnvolle statistische Analyse der Daten durchführen.

Auch gab es mit Ausnahme des Isolates TisarII keinen Stamm, der gut auf Chinolone ansprach. Dieses Isolat zeigte im Verlauf der Untersuchungen insgesamt ein zögerliches Wachstum und eine erhöhte Empfindlichkeit gegen alle antibiotischen Substanzen. Dem entsprechend lag bei TisarII die  $MHK$  bei  $0,25 \mu\text{g/ml}$  für Ciprofloxacin und bei  $0,5 \mu\text{g/ml}$  für Levofloxacin. Alle anderen Isolate wiesen eine  $MHK \geq 1$  (Ciprofloxacin) bzw.  $\geq 2$  (Levofloxacin) und für beide Substanzen eine  $MBK$  von  $\geq 4$  auf.

Diese Ergebnisse bestätigen die mittels der selben Methode gewonnenen Daten aus vorhergehenden Studien [Kraiczy 2001].

Beim Menschen werden nach einer Standarddosis von 500 mg p.o. Serumkonzentrationen von 2,5 µg/ml für Ciprofloxacin und von 5,2 µg/ml für Levofloxacin erreicht [Forth 2001]. Beim Hund beträgt die Plasmakonzentration von Ciprofloxacin nach 5 mg/kg i.v.  $0,205 \pm 0,076$  µg/ml und nach 5 mg/kg p.o.  $0,291 \pm 0,188$  µg/ml [Kung 1994]. In jedem Fall sind die Konzentrationen nicht ausreichend, um einen bakteriostatischen oder bakteriziden Effekt zu erzielen. Abgesehen von der nicht ausreichenden Serumkonzentration sind Chinolone im Allgemeinen aller Wahrscheinlichkeit nach auch deshalb wenig wirksam gegen Borrelien, da diese im Vergleich zu anderen gramnegativen Bakterien eine strukturell andersartige Topoisomerase besitzen und damit möglicherweise keinen Angriffspunkt für Chinolone der Klasse I und II bieten [Knight 1999, Kraiczy 2001].

Für die Chinolone Ciprofloxacin und Levofloxacin ist daher keine therapeutische Wirksamkeit gegen eine durch *B. spielmanii* oder eine andere Genospezies verursachte Lyme Borreliose zu erwarten.

### **5.5 Vergleichende Betrachtung des *in vitro* Empfindlichkeitsspektrums von *B. spielmanii***

Neben der Testmethode und den Untersuchungsbedingungen nehmen sowohl die Größe des Stammkollektivs als auch die Auswahl der einzelnen Isolate Einfluss auf die Ergebnisse der MHK- und MBK-Testung und damit auch auf die Resultate der statistischen Analyse. So können bei einer vergleichsweise geringen Anzahl von Isolaten bereits kleine Schwankungen in der Methodik oder auch der individuellen Durchführung der Tests dazu führen, dass durch Abweichungen der Resultate um wenige Verdünnungsstufen zum Teil statistisch signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Studien entstehen. Dennoch sind durch die in Abschnitt 5.4 beschriebenen Probleme der Anzahl der Stichproben bzw. Experimente bei der *in vitro* Testung von Borrelien enge Grenzen gesetzt. Zumeist liegt der Stichprobenumfang bei Untersuchungen zur antibiotischen Empfindlichkeit von Borrelien im Bereich zwischen 5 und 25 Isolaten [Henneberg 2002, Hunfeld 2000b, Janovska 2001, Kraiczy 2001, Rödel 2007, Ruzic-Sabljić 2005]. Dies ist von maßgeblicher Bedeutung, da bekanntermaßen die individuelle Antibiotika-Empfindlichkeit einzelner Isolate selbst innerhalb einer Genospezies stark variieren kann [Hunfeld 2004].

Mit den 18 hier getesteten Isolaten handelt es sich also um eine im Vergleich zu anderen Untersuchungen relativ große Stichprobe. Dennoch sollten auf Grund der geringen Zahl der Isolate bei Betrachtung der einzelnen Genospezies die Ergebnisse der 4-Gruppenanalyse auch in Hinsicht auf mögliche therapeutische Konsequenzen nicht überbewertet werden. Die 2-Gruppenanalyse liefert hier deutlich weniger störanfällige Ergebnisse, da sich in jeder Gruppe eine verhältnismäßig große Anzahl von Isolaten befindet.

Die statistische Analyse der mittels standardisierter kolorimetrischer Mikrodilution und anschließender Subkultivierung gewonnenen Daten zur MHK und MBK von therapierelevanten Antibiotika gegen *B. burgdorferi* s.l. ergab für verschiedene antibiotische Substanzen kleine aber signifikante Unterschiede hinsichtlich der Empfindlichkeit der getesteten Genospezies.

Für das Antibiotikum Doxycyclin zeigten die *B. spielmanii*-Isolate eine signifikant niedrigere MHK als die Gruppe der Vergleichsisolate, was für eine erhöhte Empfindlichkeit von *B. spielmanii* gegen dieses Antibiotikum spricht. Bei der statistischen Analyse der MBK von Doxycyclin waren im 2-Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Da es sich bei Doxycyclin um ein primär bakteriostatisches Antibiotikum handelt, kommt jedoch ohnehin bei der *in vitro* Testung dieser Substanz in Hinsicht auf die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Situation *in vivo* der Betrachtung der MHK die größere Bedeutung zu.

Für die  $\beta$ -Lactame Penicillin, Cefuroxim und Ceftriaxon ergaben sich im 2-Gruppenvergleich weder für die MHK noch für die MBK signifikante Unterschiede.

Bei dem der selben Substanzklasse zugehörigen Antibiotikum Amoxicillin fanden sich bezüglich der MHK keine Signifikanzen, die MBK lag jedoch für die Isolate der Genospezies *B. spielmanii* signifikant höher. Dieses Ergebnis sollte jedoch mit Hinsicht auf die in Abschnitt 5.3 diskutierte chemische Instabilität von Amoxicillin in wässriger Lösung bzw. in BSK-Medium nicht überbewertet werden. Wie bereits angesprochen kommt es durch die Wechselwirkungen zwischen Antibiotikum und Medium während der 72-stündigen Inkubation zu einem raschen Wirkungsverlust dieser Substanz. Dadurch sind die hier gefundenen MBK-Werte nicht realistisch auf die Verhältnisse *in vivo* übertragbar, zumal hier die Applikation von Amoxicillin zur Aufrechterhaltung eines adäquaten Wirkspiegels drei mal täglich erfolgt (siehe Tabelle 1). Man kann folglich vor diesem Hintergrund nicht von einer niedrigeren Empfindlichkeit von *B.*

---

*spielmanii* gegen Amoxicillin sprechen, zumal sich bei der MHK keine signifikanten Unterschiede feststellen ließen.

Bei der MHK der Fluorchinolone ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Eine statistische Analyse der MBK war für beide Substanzen nicht sinnvoll, da die MBK in fast allen Fällen außerhalb des messbaren Bereiches ( $>4 \mu\text{g/ml}$ ) zu liegen kam.

Interessante statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich bei der Testung der Substanzen Erythromycin und Clarithromycin. Die MHK und MBK beider Makrolide lag für die Isolate der Genospezies *B. spielmanii* signifikant niedriger, als dies für die Vergleichsisolate der Fall war. Dieses Ergebniss spricht für eine höhere Empfindlichkeit von *B. spielmanii* gegen Makrolide.

In anderen Studien mit ähnlichen Testmethoden und Versuchsbedingungen wurde die Beobachtung gemacht, dass *B. garinii* empfindlicher gegen verschiedene Antibiotika, besonders aber gegen  $\beta$ -Lactame, zu sein schien [Hunfeld 2000b, Preac Mursic 1996]. Diese Beobachtung konnte nicht für alle Antibiotika nachvollzogen werden, tatsächlich lag jedoch die MHK der Substanzen Penicillin und Amoxicillin für die *B. garinii* Isolate jeweils signifikant niedriger als die MHK der übrigen Genospezies.

In den Untersuchungen von Baradaran-Dilmaghani et al. waren im Gegensatz zu unseren Ergebnissen keine signifikanten Unterschiede in der MHK und MBK für die Substanzen Doxycyclin, Penicillin G, Amoxicillin und Ceftriaxon feststellbar. Allerdings waren in dieser Studie die Gruppengrößen so stark unterschiedlich (zwischen  $n=1$  und  $n=13$ ), dass die Aussagekraft der statistischen Analyse fraglich erscheint [Baradaran-Dilmaghani 1996]. Sicklinger et al. verglichen jeweils 8 Isolate der bis dahin bekannten humanpathogenen Genospezies und fanden keine Unterschiede für Doxycyclin, eine signifikant niedrigere MBK von *B. burgdorferi* s.s. für Amoxicillin sowie für Ceftriaxon eine signifikant höhere MBK von *B. burgdorferi* s.s und *B. garinii* gegenüber *B. afzelii* [Sicklinger 2003]. Bei dieser Betrachtung wird deutlich, wie stark die unterschiedlichen Voraussetzungen der einzelnen Studien, insbesondere die Anzahl und Auswahl der Isolate verschiedener Genospezies, Einfluss auf das Ergebnis der statistischen Analyse nehmen. Dieser Problematik kann allein durch die Verwendung standardisierter Testmethoden, durch die Testung einer möglichst großen Anzahl von Isolaten unter gleichen Bedingungen sowie durch die statistische Analyse annähernd einheitlicher Gruppen entgegengewirkt werden.

Da die Identifikation und molekulargenetische Ausgliederung von *B. spielmanii* in eine eigene Genospezies erst vor wenigen Jahren gelang, und darüber hinaus in der

---

Routinediagnostik keine Analyse der Genospezies durchgeführt wird, gibt es bisher weltweit nur wenige von Lyme Borreliose-Patienten stammende *B. spielmanii*-Isolate. Auch die Anzahl der aus Zecken isolierten *B. spielmanii*-Isolate ist begrenzt, da die geographische Verbreitung dieser Genospezies regional bzw. zum Teil lokal beschränkt ist, und das Sammeln von Zecken mit anschließender Isolation bzw. Anzucht von Borrelien aufwändig und teuer ist [Richter 2004b].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein repräsentatives Kollektiv von 10 Isolaten der Genospezies *B. spielmanii* verwendet, die sowohl aus Zecken als auch aus Patientenmaterial isoliert wurden und aus verschiedenen geographischen Gebieten bzw. Ländern stammten (siehe Tabelle 2). Dabei lag der Schwerpunkt auf humanen Isolaten (vor allem aus Hautbiopsien), da der Testung von Isolaten, die bereits tatsächlich eine Lyme Borreliose beim Menschen ausgelöst haben, besonders große Bedeutung zukommt.

Die getesteten Isolate zeigten im Wesentlichen ein sehr einheitliches Bild bei der MHK- und MBK-Bestimmung. Einzige Ausnahme war der Stamm TIsarII, welcher trotz wiederholter Testung eine deutlich erhöhte Empfindlichkeit gegen alle verwendeten Antibiotika zeigte. Dieser Stamm war jedoch auch im Wachstum in reinem Kulturmedium den anderen Isolaten deutlich unterlegen und brauchte häufig doppelt so lange wie diese, um eine ausreichend hohe Dichte für eine Subkultivierung bzw. für den Einsatz in den *in vitro* Experimenten zu erreichen. Da es sich bei diesem Stamm um ein neu erworbenes Isolat handelte, wurden das anfänglich schlechte Wachstum auf Anpassungsschwierigkeiten an das Medium zurückgeführt. Borrelien sind derart anspruchsvoll, dass sie sich erst nach mehrmaliger Subkultur an ein neues Medium adaptieren können [Stoenner 1974]. Deshalb wurde das Isolat zuerst über mehrere Wochen subkultiviert, um eine Anpassung an das Medium zu ermöglichen. Trotzdem blieb es im Wachstum deutlich hinter den übrigen Isolaten zurück. Da dieser Stamm durch sein langsames Wachstum ungeeignet für die kolorimetrische Messung des Indikatorumschlags auf Basis von sauren Stoffwechselprodukten der Borrelien schien, wurden die Ergebnisse des Standardversuchs in einem gesonderten Experiment unter Verdopplung der Inkubationszeit überprüft und bestätigt. Wäre allein langsames Wachstum für den fehlenden Abfall der Extinktion nach 72 Stunden verantwortlich gewesen, so hätten nach 6 Tagen Inkubation deutlich abweichende Ergebnisse bzw. eine erhöhte MHK entstehen müssen. Dies war nicht der Fall, so dass von einer generell höheren Empfindlichkeit dieses Stammes auszugehen ist.

---

Eine gegenteilige Situation ergab sich für den *B. garinii*-Stamm FEM1, der eine vergleichsweise niedrigere Empfindlichkeit gegen die Substanzen Penicillin und Amoxicillin aufwies. In diesem Fall lag die gemessene MHK durch eine Abweichung um 2-3 Verdünnungsstufen nach oben im Vergleich mit den übrigen Isolaten an der Grenze der im Normalfall erreichbaren Plasmakonzentration. Ein solches Phänomen könnte natürlich beim Zusammentreffen mehrerer ungünstiger Faktoren, wie etwa einer individuell ungünstigen Pharmakokinetik bei einem Patienten (z.B. eine geringere Absorption durch veränderte pH-Werte im Magen-Darm-Trakt) oder einer Unterdosierung durch mangelnde Compliance dazu führen, dass einzelne Borrelien im Patienten überleben und zu einem Rezidiv bzw. zu einer persistenten Infektion führen [Hunfeld 2006b].

Grundsätzlich können Isolate mit deutlich erniedrigter oder erhöhter Empfindlichkeit gegen bestimmte antibiotischen Substanzen in jeder Genospezies vorkommen. Die hier ermittelten Daten geben jedoch keinen Anlass zu der Vermutung, dass dies bei der im Focus der Untersuchungen stehenden Genospezies *B. spielmanii* überdurchschnittlich häufig der Fall ist.

Unseren Untersuchungen zu Folge entspricht das *in vitro* Empfindlichkeitsspektrum von *B. spielmanii* im Wesentlichen dem der bereits länger als humanpathogen bekannten Genospezies. Es wurden gezielt solche Antibiotika ausgewählt, die in der Therapie der Lyme Borreliose häufig und erfahrungsgemäß mit gutem Erfolg eingesetzt werden. Dabei wurden mit Doxycylin und Amoxicillin auch die in der Veterinärmedizin mit Abstand am häufigsten gegen Borrelien eingesetzten Substanzen einbezogen. Zusätzlich zu den *in vitro* wie *in vivo* wirksamen Wirkstoffklassen der  $\beta$ -Lactame, Tetracycline und Makrolide wurden zwei Vertreter aus den Gruppen II und III der Chinolone untersucht, die bekanntermaßen eine schlechte Wirksamkeit gegen Borrelien besitzen [Kraiczy 2001]. Hierdurch wurden die Untersuchungen zum Empfindlichkeitsprofil von *B. spielmanii* abgerundet. Es konnte gezeigt werden, dass diese Genospezies empfindlicher auf die verwendeten Makrolid-Antibiotika reagierte, was sich in signifikant niedrigeren MHK- und MBK-Werten von *B. spielmanii* im Vergleich mit den Isolaten der anderen humanpathogenen Genospezies darstellte. Insgesamt betrachtet reagierte *B. spielmanii* jedoch nicht generell empfindlicher gegen antibiotische Substanzen.

Bei der Interpretation der Studienergebnisse und dem Vergleich mit vorhergehenden Studien müssen vor allem die Unterschiede in der Testmethode sowie auch die Auswahl

und Größe des Stammkollektivs berücksichtigt werden. Trotz aller im Zusammenhang mit der *in vitro* Testung langsam wachsenden Mikroorganismen stehenden Probleme lässt sich jedoch auf Grund der vorliegenden Untersuchung weitgehend ausschließen, dass eine generell erniedrigte Empfindlichkeit der neuerlich als humanpathogen identifizierten Genospezies *B. spielmanii* gegen therapierelevante Antibiotika zum Auftreten von Therapieversagen bei Lyme Borreliose-Patienten führt.

### 5.6 Abtötungskinetiken

Die verwendete Methode zur kolorimetrischen Messung bot die Möglichkeit zur standardisierten Prüfung der *in vitro* Empfindlichkeit von *B. spielmanii* gegen therapierelevante Antibiotika. Diese Methode wurde bisher in mehreren Studien etabliert und liefert zuverlässige und vergleichbare Ergebnisse [Hunfeld 2000a]. Zur Vervollständigung der Untersuchungen und zur Bestätigung der mittels kolorimetrischer Messung und anschließender Subkultivierung gemessenen MHK- und MBK Werte wurden exemplarisch Abtötungskinetiken des *B. spielmanii*-Isolates PC Eq 17 unter Ceftriaxon- und Doxycyclinexposition durchgeführt. Die durch konventionelle Zellzählung erhaltene MHK für das Antibiotikum Doxycyclin deckte sich exakt mit den photometrisch gemessenen Werten, im Falle von Ceftriaxon lag die photometrisch gemessene MHK eine Verdünnungsstufe höher.

Ein Unterschied um eine Verdünnungsstufe zwischen konventioneller Zählung und photometrischer Messung ist jedoch bei Titrationsverfahren mit logarithmischen Verdünnungen zur Basis 2 als im Rahmen der zufälligen methodischen Schwankungsbreite anzusehen, und darf als gute Übereinstimmung interpretiert werden. Beim Vergleich der konventionelle Subkultivierung mit den Ergebnissen der Time-Kill-Kinetik zeigte sich, dass bei einer Konzentration von 16 µg/ml (konventionell bestimmte MBK für Doxycyclin) nach 72 Stunden Inkubation die vom CLSI geforderte Reduktion des Ausgangsinokulums um mindestens drei log<sub>10</sub>-Stufen (99,9 %) nicht ganz erreicht wurde [CLSI 1999]. Dies war jedoch wenige Stunden später der Fall. Für das Antibiotikum Ceftriaxon zeigte sich ein Erreichen der geforderten Reduktion um 99,9 % bei einer Konzentration von 2 µg/ml (durch Subkultivierung bestimmte MBK) bereits nach ca. 50 Stunden. Gleiches gilt für die beiden höheren Verdünnungsstufen 4 und 8 µg/ml.

Die niedrigere MBK in der Zellzählung im Vergleich mit der konventionellen Subkultivierung erklärt sich durch die Tatsache, dass der mittels Subkultivierung

ermittelten MBK eine Reduktion des Ausgangsinokulums von 100 % zu Grunde liegt, während in der Zellzählung dem Standard entsprechend lediglich eine 99,9 %ige Abtötung zur MBK-Bestimmung herangezogen wird [Dever 1993, Hunfeld 2000b]. Bei einem Ausgangsinokulum von 5 Millionen Borrelien pro Well verbleiben bei einer derartigen Abtötungsrate noch immer 5000 lebendige Zellen. Nach der Subkultivierung vermehren diese Zellen sich in frischem Medium erneut, so dass eine höhere MBK bei dieser Methode verglichen mit der Zellzählung zu Stande kommt.

Darüber hinaus wird die mikroskopische Beurteilung der MBK bei steigenden Konzentrationen des Antibiotikums erschwert durch ein dichtes Konzentrat aus Zellen, Mediumbestandteilen und Zelltrümmern. Die Entscheidung zwischen vital und tot wird im Bereich der MBK des Antibiotikums zunehmend schwieriger, so dass es zu kleineren Unterschieden im Vergleich mit der objektiveren Subkultivierungsmethode kommen kann.

Im Wesentlichen zeigt jedoch die erstellte Kinetik eine gute Übereinstimmung mit den für diese Arbeit verwendeten Methoden. Sie macht ebenfalls deutlich, dass mit steigender Konzentration die Geschwindigkeit der Abtötung zunimmt. Auch ließ sich zeigen, dass es bei Konzentrationen im Bereich zwischen MHK und MBK auch bei einer Inkubationszeit von 120 Stunden nicht zu vollständiger Abtötung kam. Analog dazu könnte es auch beim Patienten zu persistierenden Infektionen kommen, wenn die erreichte Konzentration des Antibiotikums im Gewebe oder im Blut nur knapp oberhalb der MHK liegt.

## **5.7 Mögliche Mechanismen von Erregerpersistenz und klinischem Therapieversagen**

Die vorliegenden Untersuchungen konnten zeigen, dass das Phänomen der Erregerpersistenz bzw. des Therapieversagens nicht auf einer genospeziesspezifisch erniedrigten Empfindlichkeit gegen Antibiotika beruht. Damit rücken andere Erklärungsversuche wieder näher in den Focus. Ein temporärer intrazellulärer Rückzug, eine phänotypische Persistenz etwa durch Veränderung der Morphologie, das Vorkommen von unbemerkten Reinfektionen, die Auslösung autoimmuner Prozesse im Körper durch Spirochäten oder auch eine Kombination aus diesen und anderen Faktoren sind denkbare Erklärungen für die Problematik in der Behandlung der Lyme Borreliose [Brorson 1997, Girschick 1996, Hunfeld 2006b, Steere 2001].

Dabei besteht nach wie vor Unklarheit darüber, in wie vielen Fällen das mit fortbestehenden Beschwerden einhergehende klinische Versagen einer Therapie tatsächlich auf die Unwirksamkeit der verwendeten Antibiotika zurückzuführen ist. Zahlreiche Erkrankungen anderer Genese, wie etwa die rheumatoide Arthritis, führen zu ähnlichen bzw. klinisch nicht unterscheidbaren Symptomen und werden daher vermutlich häufig als Spätformen der Lyme Borreliose fehldiagnostiziert [Seidel 2007]. Trotzdem gibt es Fälle, in denen nach initial erfolgreicher antibiotischer Therapie erneut Borrelien aus Hautbioptaten anzüchtbar sind [Hunfeld 2005].

Borrelien breiten sich anfangs überwiegend durch Migration im Gewebe und weniger durch den Blutstrom aus [Straubinger 1997a]. Auch ist die Konzentration eines Antibiotikums im Blutplasma häufig eine andere als im Gewebe. Daher ist es durchaus denkbar, dass die Konzentration des Antibiotikums trotz eines ausreichend hohen Plasmaspiegels im Bereich des Erregers nur subtherapeutisch ist. Dies könnte zur Persistenz der Erreger und sogar zur Ausbildung von Resistenzen bei Borrelien führen. So konnte bereits gezeigt werden, dass Isolate, die unterhalb der MHK liegenden Konzentrationen von Erythromycin, Cefoxitim und Tetracyclin ausgesetzt waren, anschließend eine erhöhte MHK gegen diese Substanzen und alle Substanzen dieser Klasse zeigten [Santino 2006].

Über die Mechanismen, die zur Ausbildung von Resistenzen bei Borrelien führen, ist dabei bisher noch wenig bekannt. Kürzlich konnte jedoch ein Protein in der äußeren Borrelien-Membran identifiziert werden, welches Poren in der Lipiddoppelmembran formen kann, und damit maßgeblich Anteil an der Bildung eines aktiven Efflux-Systems hat. Mutierte Stämme, die das Gen für dieses Protein nicht besaßen, waren deutlich empfindlicher gegen eine Reihe therapierelevanter antibiotischer Substanzen als die Wildstämme ohne Mutation [Bunikis 2008]. Solche Mechanismen und Strukturen sind wichtige Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer therapeutischer Konzepte. Gelingt die Identifikation der für Resistenzen verantwortlichen Strukturen, lassen sich diese unter Umständen in einem weiteren Schritt auch blockieren. Hierdurch ließe sich die Effektivität von antibiotischen Substanzen erhöhen und möglicherweise auch ein Versagen der Therapie verhindern.

Ein weiterer wichtiger Aspekt auf der Suche nach den Überlebensstrategien von Borrelien im Organismus des Warmblüters ist die Interaktion der Bakterien mit dem Immunsystem des Wirtes. Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass *B. spielmanii* wie auch *B. afzelii* durch Bindung der dem Komplementsystem zugehörigen

---

Komponenten FHL-1 und Faktor H in der Lage ist, der komplementvermittelten Lyse des Immunsystems zu entgehen [Herzberger 2007]. Dadurch wird ein Eindringen in den Körper und die Etablierung einer persistenten Infektion erleichtert. An das Immunsystem des Reservoirwirtes Gartenschläfer ist *B. spielmanii* sogar so gut adaptiert, dass diese Genospezies sich nach Auswanderung aus der Zecke im Gartenschläfer verglichen mit *B. afzelii* leichter etablieren bzw. länger in diesem persistieren kann [Richter 2004b].

In der vorliegenden Studie wurde die gute bis sehr gute *in vitro* Wirksamkeit der in der Humanmedizin wichtigsten therapierelevanten Antibiotika gegen die Genospezies *B. spielmanii* nachgewiesen. Auch die in der Veterinärmedizin zur Bekämpfung der Lyme Borreliose überwiegend eingesetzten Substanzen Doxycyclin und Amoxicillin wurden getestet und zeigten eine gute bis sehr gute Wirksamkeit gegen alle verwendeten Borrelienisolate.

Insgesamt gibt es abgesehen von diesen beiden Substanzen nur sehr wenige Antibiotika, die klinisch umfassend an Tieren auf ihre Wirksamkeit gegen Lyme Borreliose getestet wurden [Straubinger 2000a]. Daher gibt es wenige Therapiealternativen zu diesen Stoffen. Das beim Rind zur Behandlung der Enzootischen Bronchopneumonie zugelassene Makrolid Tilmycosin (Micotil®, Fa. Boeringer Ingelheim GmbH) zeigte sich hoch wirksam gegen von Hunden und Pferden isolierte Borrelien-Isolate. Es kann jedoch sehr toxisch sein, und ist daher in der aktuell erhältlichen Formulierung nicht geeignet zu Therapie der caninen oder equinen Lyme Borreliose [Kim 2006]. Die Forschung auf dem Gebiet der Lyme Borreliose bei Tieren sowie die Entwicklung spezieller Therapien für Tiere werden sich vermutlich auch künftig nur verhalten weiterentwickeln. Zum Einen existieren derzeit nur wenige von Hunden oder gar Pferden und Rindern stammende Isolate, und zum Anderen gibt es mit Doxycyclin und Amoxicillin bereits zwei gut wirksame, verträgliche und für das Tier zugelassene Präparate auf dem Markt. Damit fehlt die wirtschaftlich treibende Kraft für die teure und aufwändige *in vitro* Testung genauso wie für umfassende klinische Studien über Behandlungserfolge und Spätfolgen beim Tier.

Da unter den Haussäugtieren vorwiegend der Hund von der Lyme Borreliose betroffen ist, und dieser in Europa und den USA im Wesentlichen nicht als Nutztier gehalten wird, verursacht die Lyme Borreliose der Tiere im Gegensatz zur humanen Erkrankung keine derart großen wirtschaftlichen Schäden.

Dennoch sind weitergehende Untersuchungen zur Epidemiologie, Pathogenese und Bekämpfung dieser Zoonose sowohl auf dem Gebiet der Veterinärmedizin als auch in der Humanmedizin wichtig, um der durch die Erderwärmung geförderten Ausbreitung dieser Vektor-übertragener Erkrankungen Einhalt zu gebieten [Higgins 2004].

Mittels der vorliegenden Untersuchung konnte eine im Vergleich zu den anderen humanpathogenen Borrelien erniedrigte antibiotische Empfindlichkeit der Genospezies *B. spielmanii* ausgeschlossen werden. Folglich sollte die Suche nach der Ursache für Therapieversagen und Spätfolgen vermehrt auf das Immunsystem der Wirte bzw. die Immunevasionsstrategien der Erreger konzentriert werden. Als komplementresistente Genospezies mit humanpathogenem Potential und einem für Borrelien ungewöhnlichen Zyklus und Wirtsspektrum bleibt *B. spielmanii* dabei auch in der Zukunft ein interessantes Studienobjekt.

## 6 Zusammenfassung

Die durch Spirochäten der Gattung *Borrelia* verursachte Lyme Borreliose ist die häufigste und wichtigste von Vektoren übertragene Krankheit der nördlichen Hemisphäre. Neben den Genospezies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii* und *B. garinii* besitzt dabei auch die neu beschriebene Genospezies *B. spielmanii* humanpathogenes Potential. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das antibiotische Empfindlichkeitsspektrum von *B. spielmanii* näher zu charakterisieren, da bisher keine Daten zur Empfänglichkeit dieser Genospezies gegen Antibiotika und Chemotherapeutika vorlagen.

Der Empfindlichkeitstestung vorausgehend wurden alle Isolate molekulargenetisch analysiert. Hierzu wurden eine Plasmidprofilanalyse mittels PFGE, eine RFLP-Analyse der 5S-23S Intergenic Spacer DNA sowie eine Sequenzanalyse dieses Genabschnittes durchgeführt. Auf Basis der Sequenzanalyse wurde anschließend ein phylogenetischer Stammbaum der getesteten Isolate erstellt. Wenngleich die zur Differenzierung humanpathogener Genospezies häufig verwendete RFLP-Analyse des 5S-23S Intergenic Spacers keine eindeutige Unterscheidung von *B. afzelii* und *B. spielmanii* zuließ, konnten durch eine Kombination der oben genannten Verfahren alle Isolate molekulargenetisch eindeutig charakterisiert und zuverlässig subtypisiert werden.

Zur Testung der antibiotischen Empfindlichkeit von *B. spielmanii* kam eine standardisierte kolorimetrische Mikrodilutionsmethode zur MHK-Bestimmung mit anschließender konventioneller Subkultivierung zur MBK-Bestimmung zum Einsatz. Getestet wurden therapierelevante Antibiotika aus den Klassen der Tetracycline, der  $\beta$ -Lactame und der Makrolide sowie zwei Substanzen aus der Klasse der Fluorchinolone mit bekanntermaßen schlechter Wirksamkeit gegen Borrelien.

Vorausgehende Qualitätskontrollexperimente mit *S. aureus* dienten der Untersuchung signifikanter Medium-Antibiotika-Interaktionen. Die hier festgestellte Aktivitätssteigerung der Makrolide sowie der Aktivitätsverlust einiger  $\beta$ -Lactame in BSK-Medium wurden bei der Interpretation der Resultate berücksichtigt. Es zeigte sich in den Untersuchungen, dass die Wirksamkeit therapierelevanter Antibiotika gegen die getesteten *B. spielmanii*-Isolate im Wesentlichen der Wirksamkeit dieser Substanzen gegen die übrigen humanpathogenen Borrelien entsprach. Zwar waren die verwendeten *B. spielmanii*-Isolate statistisch signifikant empfindlicher gegen Erythromycin, Clarithromycin und Doxycyclin und zeigten eine signifikant höhere MBK für Amoxicillin, diese Unterschiede sind jedoch insgesamt als zu gering anzusehen, um für die medizinische Praxis als therapeutisch relevant eingestuft zu werden.

Eine generell erniedrigte antibiotische Empfindlichkeit von *B. spielmanii* ist damit als möglicher Grund für ein Therapieversagen oder die Entstehung persistenter Borrelien-Infektionen weitgehend ausgeschlossen. Die getesteten therapierlevanten Antibiotika zeigten eine gute und zuverlässige bakteriostatische bzw. bakterizide Wirkung gegen alle humanpathogenen Genospezies. Die Heterogenität der Erreger bezogen auf ihre Empfindlichkeit gegen gängige antibiotisch wirksame Substanzen ist folglich auch unter Einbeziehung von *B. spielmanii* keine Erklärung für die gelegentlich beobachtete Erregerpersistenz oder das Fortbestehen klinischer Symptome der Lyme Borreliose nach adäquater antibiotischer Therapie.

## 7 Summary

Lyme disease is caused by the spirochete *B. burgdorferi* and today is regarded as the most frequent and most important vector-borne illness in the northern hemisphere. The genospecies *B. burgdorferi* s. s., *B. afzelii* and *B. garinii* have long been known as causative agents of Lyme borreliosis, whereas *B. spielmanii* has only recently been delineated and described as the fourth human pathogenic species.

The objective of this study was to further characterize the antibiotic susceptibility pattern of *B. spielmanii*, since so far nothing is known about the effects of antibiotic substances against this particular genospecies. First of all, the strains were genotyped applying PFGE for plasmid profile analysis in combination with RFLP analysis and sequencing of the 5S-23S intergenic spacer region. Subsequently, a phylogenetic tree based on the sequences of this region was generated. RFLP analysis of the 5S-23S intergenic spacer has often been used to discriminate human pathogenic borreliae, but couldn't reliably differentiate between *B. spielmanii* and *B. afzelii*. Nevertheless, a combination of the methods mentioned above enabled clear and reliable genetic characterization of all isolates.

The antibiotic susceptibility pattern of *B. spielmanii* was investigated using a standardized colorimetric microdilution method followed by conventional subculture. MICs and MBCs of all isolates were determined for 7 antibiotic substances belonging to the groups of tetracyclines,  $\beta$ -lactams and macrolides as well as for two fluorquinolones with known low activity against borreliae. Quality control experiments with *S. aureus* for investigation of antibiotic-medium interactions revealed a loss of activity for some  $\beta$ -lactams as well as enhanced activity of macrolides in BSK-medium.

As demonstrated in our study, the efficacy of relevant antibiotic substances against *B. spielmanii* parallels that against the other currently known human pathogenic species. Statistical analysis revealed indeed significantly higher susceptibility of *B. spielmanii* for erythromycin, clarithromycin and doxycycline and significantly lower MBCs for amoxicillin compared with other human pathogenic isolates. However, the differences seem too subtle to be of significant clinical relevance.

We disapproved the assumption that *B. spielmanii* is less susceptible against antibiotic substances relevant for the therapy of Lyme borreliosis thus leading to clinical treatment failure or persistent infections. All tested substances except for the quinolones showed good to excellent *in vitro* activity against *B. spielmanii* and the other three *Borrelia* species pathogenic for humans. The heterogeneity of the causative agent of Lyme

disease including the recently delineated species *B. spielmanii* explains neither the persistence of spirochetes nor the development of chronic symptoms after appropriate antimicrobial treatment.

---

## 8 Literaturverzeichnis

1. **Aberer, E., A. Kersten, H. Klade, C. Poitschek, and W. Jurecka.** 1996. Heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* in the skin. *Am J Dermatopathol* **18**:571-9.
2. **Aguero-Rosenfeld, M. E., G. Wang, I. Schwartz, and G. P. Wormser.** 2005. Diagnosis of lyme borreliosis. *Clin Microbiol Rev* **18**:484-509.
3. **Anderson, J. F.** 1989. Epizootiology of *Borrelia* in Ixodes tick vectors and reservoir hosts. *Rev Infect Dis* **11 Suppl 6**:S1451-9.
4. **Appel, M. J., S. Allan, R. H. Jacobson, T. L. Lauderdale, Y. F. Chang, S. J. Shin, J. W. Thomford, R. J. Todhunter, and B. A. Summers.** 1993. Experimental Lyme disease in dogs produces arthritis and persistent infection. *J Infect Dis* **167**:651-64.
5. **Auwaerter, P. G.** 2007. Point: antibiotic therapy is not the answer for patients with persisting symptoms attributable to lyme disease. *Clin Infect Dis* **45**:143-8.
6. **Azuma, Y., E. Isogai, H. Isogai, and K. Kawamura.** 1994. Canine Lyme disease: clinical and serological evaluations in 21 dogs in Japan. *Vet Rec* **134**:369-72.
7. **Baradaran-Dilmaghani, R., and G. Stanek.** 1996. In vitro susceptibility of thirty *Borrelia* strains from various sources against eight antimicrobial chemotherapeutics. *Infection* **24**:60-3.
8. **Barbour, A. G.** 1988a. Plasmid analysis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *J Clin Microbiol* **26**:475-8.
9. **Barbour, A. G., and C. F. Garon.** 1988b. The genes encoding major surface proteins of *Borrelia burgdorferi* are located on a plasmid. *Ann N Y Acad Sci* **539**:144-53.
10. **Barbour, A. G., and S. F. Hayes.** 1986. Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev* **50**:381-400.
11. **Berger, B. W., M. H. Kaplan, I. R. Rothenberg, and A. G. Barbour.** 1985. Isolation and characterization of the Lyme disease spirochete from the skin of patients with erythema chronicum migrans. *J Am Acad Dermatol* **13**:444-9.
12. **Boerner, J.** 1994. Empfindlichkeitsprüfung von *Borrelia burgdorferi* gegen Antibiotika und Chemotherapeutika *in vitro*. Inaugural-Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
13. **Boerner, J., K. Failing, and M. M. Wittenbrink.** 1995. In vitro antimicrobial susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi*: influence of test conditions on minimal inhibitory concentration (MIC) values. *Zentralbl Bakteriol* **283**:49-60.
14. **Brorson, O., and S. H. Brorson.** 1998a. In vitro conversion of *Borrelia burgdorferi* to cystic forms in spinal fluid, and transformation to mobile spirochetes by incubation in BSK-H medium. *Infection* **26**:144-50.
15. **Brorson, O., and S. H. Brorson.** 1998b. A rapid method for generating cystic forms of *Borrelia burgdorferi*, and their reversal to mobile spirochetes. *Apmis* **106**:1131-41.
16. **Brorson, O., and S. H. Brorson.** 1997. Transformation of cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to normal, mobile spirochetes. *Infection* **25**:240-6.
17. **Bujak, D. I., A. Weinstein, and R. L. Dornbush.** 1996. Clinical and neurocognitive features of the post Lyme syndrome. *J Rheumatol* **23**:1392-7.
18. **Bunikis, I., K. Denker, Y. Ostberg, C. Andersen, R. Benz, and S. Bergstrom.** 2008. An RND-type efflux system in *Borrelia burgdorferi* is involved in virulence and resistance to antimicrobial compounds. *PLoS Pathog* **4**:e1000009.

19. **Burgdorfer, W., A. G. Barbour, S. F. Hayes, J. L. Benach, E. Grunwaldt, and J. P. Davis.** 1982. Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? *Science* **216**:1317-9.
20. **Burgdorfer, W., R. S. Lane, A. G. Barbour, R. A. Gresbrink, and J. R. Anderson.** 1985. The western black-legged tick, *Ixodes pacificus*: a vector of *Borrelia burgdorferi*. *Am J Trop Med Hyg* **34**:925-30.
21. **Burgess, E. C.** 1992. Experimentally induced infection of cats with *Borrelia burgdorferi*. *Am J Vet Res* **53**:1507-11.
22. **Butler, C. M., D. J. Houwers, F. Jongejan, and J. H. van der Kolk.** 2005. *Borrelia burgdorferi* infections with special reference to horses. A review. *Vet Q* **27**:146-56.
23. **Callister, S. M., K. L. Case, W. A. Agger, R. F. Schell, R. C. Johnson, and J. L. Ellingson.** 1990. Effects of bovine serum albumin on the ability of Barbour-Stoener-Kelly medium to detect *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* **28**:363-5.
24. **Cameron, D. J.** 2006. Generalizability in two clinical trials of Lyme disease. *Epidemiol Perspect Innov* **3**:12.
25. **Casjens, S., and W. M. Huang.** 1993. Linear chromosomal physical and genetic map of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *Mol Microbiol* **8**:967-80.
26. **CDC.** 2007. Lyme disease--United States, 2003-2005, p. 573-6, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, vol. 56.
27. **Chang, Y. F., Y. W. Ku, C. F. Chang, C. D. Chang, S. P. McDonough, T. Divers, M. Pough, and A. Torres.** 2005. Antibiotic treatment of experimentally *Borrelia burgdorferi*-infected ponies. *Vet Microbiol* **107**:285-94.
28. **Chang, Y. F., V. Novosel, C. F. Chang, B. A. Summers, D. P. Ma, Y. W. Chiang, W. M. Acree, H. J. Chu, S. Shin, and D. H. Lein.** 2001. Experimental induction of chronic borreliosis in adult dogs exposed to *Borrelia burgdorferi*-infected ticks and treated with dexamethasone. *Am J Vet Res* **62**:1104-12.
29. **Chang, Y. F., V. Novosol, S. P. McDonough, C. F. Chang, R. H. Jacobson, T. Divers, F. W. Quimby, S. Shin, and D. H. Lein.** 2000. Experimental infection of ponies with *Borrelia burgdorferi* by exposure to Ixodid ticks. *Vet Pathol* **37**:68-76.
30. **Chao, L. L., and C. M. Shih.** 2002. Molecular characterization of Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi* sensu lato) isolated in Taiwan by restriction fragment length polymorphism analysis of 5S(rrf)-23S(rrl) intergenic spacer amplicons. *Am J Trop Med Hyg* **67**:504-10.
31. **Chary-Valckenaere, I., B. Jaulhac, J. Champigneulle, Y. Piemont, D. Mainard, and J. Pourel.** 1998. Ultrastructural demonstration of intracellular localization of *Borrelia burgdorferi* in Lyme arthritis. *Br J Rheumatol* **37**:468-70.
32. **CLSI.** 1999. Bactericidal activity of antimicrobial agents. M26-A. CLSI, Wayne, PA
33. **CLSI.** 2006. Dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. M7-A7. CLSI, Wayne, PA
34. **Collares-Pereira, M., S. Couceiro, I. Franca, K. Kurtenbach, S. M. Schafer, L. Vitorino, L. Goncalves, S. Baptista, M. L. Vieira, and C. Cunha.** 2004. First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *J Clin Microbiol* **42**:1316-8.
35. **Comstock, L. E., and D. D. Thomas.** 1991. Characterization of *Borrelia burgdorferi* invasion of cultured endothelial cells. *Microb Pathog* **10**:137-48.

36. **Cypionka, H.** 2005. Grundlagen der Mikrobiologie, 3rd ed. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
37. **Dambach, D. M., C. A. Smith, R. M. Lewis, and T. J. Van Winkle.** 1997. Morphologic, immunohistochemical, and ultrastructural characterization of a distinctive renal lesion in dogs putatively associated with *Borrelia burgdorferi* infection: 49 cases (1987-1992). *Vet Pathol* **34**:85-96.
38. **Dattwyler, R. J., B. J. Luft, M. J. Kunkel, M. F. Finkel, G. P. Wormser, T. J. Rush, E. Grunwaldt, W. A. Agger, M. Franklin, D. Oswald, L. Cockey, and D. Maladorno.** 1997. Ceftriaxone compared with doxycycline for the treatment of acute disseminated Lyme disease. *N Engl J Med* **337**:289-94.
39. **de Silva, A. M., and E. Fikrig.** 1995. Growth and migration of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes* ticks during blood feeding. *Am J Trop Med Hyg* **53**:397-404.
40. **de Silva, A. M., D. Fish, T. R. Burkot, Y. Zhang, and E. Fikrig.** 1997. OspA antibodies inhibit the acquisition of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes* ticks. *Infect Immun* **65**:3146-50.
41. **Derdáková, M., L. Beati, B. Pet'ko, M. Stanko, and D. Fish.** 2003. Genetic variability within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies established by PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the rrfA-rrlB intergenic spacer in *Ixodes ricinus* ticks from the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol* **69**:509-16.
42. **Dever, L. L., J. H. Jorgensen, and A. G. Barbour.** 1993. Comparative in vitro activities of clarithromycin, azithromycin, and erythromycin against *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:1704-6.
43. **Dever, L. L., J. H. Jorgensen, and A. G. Barbour.** 1992. In vitro antimicrobial susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi*: a microdilution MIC method and time-kill studies. *J Clin Microbiol* **30**:2692-7.
44. **Diza, E., A. Papa, E. Vezyri, S. Tsounis, I. Milonas, and A. Antoniadis.** 2004. *Borrelia valaisiana* in cerebrospinal fluid. *Emerg Infect Dis* **10**:1692-3.
45. **Dowling, P. M., R. C. Wilson, J. W. Tyler, and S. H. Duran.** 1995. Pharmacokinetics of ciprofloxacin in ponies. *J Vet Pharmacol Ther* **18**:7-12.
46. **Drozdowski, W.** 2006. [Multifocal central nervous system lesions --multiple sclerosis or neuroborreliosis?]. *Przegl Epidemiol* **60 Suppl 1**:39-45.
47. **Dunn, O. J.** 1946. Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics* **6**:241-252.
48. **Fingerle, V., U. Schulte-Spechtel, E. Ruzic-Sabljić, S. Leonhard, K. Pfister, and B. Wilske.** 2007b. Epidemiological aspects, molecular characterisation and confirmation of the human pathogenic potential of *Borrelia spielmanii*. Case reports Ludwig-Maximilians-Universität, München
49. **Fingerle, V., U. Schulte-Spechtel, E. Ruzic-Sabljić, S. Leonhard, K. Pfister, and B. Wilske.** 2006b. Epidemiological aspects, molecular characterization and confirmation of the human pathogenic potential of *Borrelia spielmanii*. *Int J Med Microbiol* **296**:152.
50. **Fingerle, V., U. C. Schulte-Spechtel, E. Ruzic-Sabljić, S. Leonhard, H. Hofmann, K. Weber, K. Pfister, F. Strle, and B. Wilske.** 2007a. Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int J Med Microbiol*.
51. **Fingerle, V., U. C. Schulte-Spechtel, E. Ruzic-Sabljić, S. Leonhard, H. Hofmann, K. Weber, K. Pfister, F. Strle, and B. Wilske.** 2008. Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi*

- s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. Int J Med Microbiol **298**:279-90.
52. **Fingerle, V., and B. Wilske.** 2006a. [Stage-oriented treatment of Lyme borreliosis]. MMW Fortschr Med **148**:39-41.
  53. **Fleming, R. V., A. R. Marques, M. S. Klempner, C. H. Schmid, L. G. Dally, D. S. Martin, and M. T. Philipp.** 2004. Pre-treatment and post-treatment assessment of the C(6) test in patients with persistent symptoms and a history of Lyme borreliosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **23**:615-8.
  54. **Földvári, G., R. Farkas, and A. Lakos.** 2005. *Borrelia spielmanii* erythema migrans, Hungary. Emerg Infect Dis **11**:1794-5.
  55. **Forth, W., D. Henschler, W. Rummel, U. Förstermann, and K. Starke (ed.).** 2001. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 8 ed. Urban & Fischer Verlag, München, Jena.
  56. **Franke, J., S. Kipp, C. Flugel, and W. Dorn.** 2008. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s.l. in ticks feeding on humans in Thuringia/Germany. Int J Med Microbiol.
  57. **Gabitzsch, E. S., J. Piesman, M. C. Dolan, C. M. Sykes, and N. S. Zeidner.** 2006. Transfer of *Borrelia burgdorferi* s.s. infection via blood transfusion in a murine model. J Parasitol **92**:869-70.
  58. **Gall, Y., and K. Pfister.** 2006. Survey on the subject of equine Lyme borreliosis. Int J Med Microbiol **296 Suppl 40**:274-9.
  59. **Gerber, B., S. Eichenberger, M. M. Wittenbrink, and C. E. Reusch.** 2007. Increased prevalence of *Borrelia burgdorferi* infections in Bernese Mountain Dogs: a possible breed predisposition. BMC Vet Res **3**:15.
  60. **Gerber, M. A., E. D. Shapiro, G. S. Burke, V. J. Parcels, and G. L. Bell.** 1996. Lyme disease in children in southeastern Connecticut. Pediatric Lyme Disease Study Group. N Engl J Med **335**:1270-4.
  61. **Gern, L., A. Estrada-Pena, F. Frandsen, J. S. Gray, T. G. Jaenson, F. Jongejan, O. Kahl, E. Korenberg, R. Mehl, and P. A. Nuttall.** 1998. European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Zentralbl Bakteriell **287**:196-204.
  62. **Gibson, M. D., M. T. Omran, and C. R. Young.** 1995. Experimental feline Lyme borreliosis as a model for testing *Borrelia burgdorferi* vaccines. Adv Exp Med Biol **383**:73-82.
  63. **Girschick, H. J., H. I. Huppertz, H. Russmann, V. Krenn, and H. Karch.** 1996. Intracellular persistence of *Borrelia burgdorferi* in human synovial cells. Rheumatol Int **16**:125-32.
  64. **Goossens, H. A., A. E. van den Bogaard, and M. K. Nohlmans.** 2001. Dogs as sentinels for human Lyme borreliosis in The Netherlands. J Clin Microbiol **39**:844-8.
  65. **Gray, J., O. Kahl, R. Lane, and k. G. Stane (ed.).** 2002a. Lyme borreliosis: Biology, Epidemiology and Control. . CABI Publishing, Wallingford.
  66. **Gray, J. S.** 2002b. Biology of *Ixodes* species ticks in relation to tick-borne zoonoses. Wien Klin Wochenschr **114**:473-8.
  67. **Hansen, K., A. Hovmark, A. M. Lebech, K. Lebech, I. Olsson, L. Halkier-Sorensen, E. Olsson, and E. Asbrink.** 1992. Roxithromycin in Lyme borreliosis: discrepant results of an in vitro and in vivo animal susceptibility study and a clinical trial in patients with erythema migrans. Acta Derm Venereol **72**:297-300.
  68. **Hansmann, Y.** 2007. [Treatment of Lyme borreliosis secondary and tertiary stages]. Med Mal Infect **37**:479-86.

- 
69. **Hassler, D., L. Zoller, M. Haude, H. D. Hufnagel, F. Heinrich, and H. G. Sonntag.** 1990. Cefotaxime versus penicillin in the late stage of Lyme disease--prospective, randomized therapeutic study. *Infection* **18**:16-20.
  70. **Hayashi, K., K. Takada, and M. Hirasawa.** 1998. Clinical and microbiological effects of controlled-release local delivery of minocycline on periodontitis in dogs. *Am J Vet Res* **59**:464-7.
  71. **Henneberg, J. P., and U. Neubert.** 2002. [*Borrelia burgdorferi* Group: in-vitro antibiotic sensitivity]. *Orv Hetil* **143**:1195-8.
  72. **Heroldova, M., M. Nemeč, and Z. Hubalek.** 1998. Growth parameters of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto at various temperatures. *Zentralbl Bakteriologie* **288**:451-5.
  73. **Herzberger, P., C. Siegel, C. Skerka, V. Fingerle, U. Schulte-Spechtel, A. van Dam, B. Wilske, V. Brade, P. F. Zipfel, R. Wallich, and P. Kraiczy.** 2007. Human pathogenic *Borrelia spielmanii* sp. nov. resists complement-mediated killing by direct binding of immune regulators factor H and factor H-like protein 1. *Infect Immun* **75**:4817-25.
  74. **Higgins, R.** 2004. Emerging or re-emerging bacterial zoonotic diseases: bartonellosis, leptospirosis, Lyme borreliosis, plague. *Rev Sci Tech* **23**:569-81.
  75. **Hovius, K. E., and D. J. Houwers.** 2007. [Diagnostic aspects of *Borrelia*-infections in dogs]. *Tijdschr Diergeneesk* **132**:612-6.
  76. **Hughes, C. A., C. B. Kodner, and R. C. Johnson.** 1992. DNA analysis of *Borrelia burgdorferi* NCH-1, the first northcentral U.S. human Lyme disease isolate. *J Clin Microbiol* **30**:698-703.
  77. **Hunfeld, K. P., and V. Brade.** 2006b. Antimicrobial susceptibility of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: what we know, what we don't know, and what we need to know. *Wien Klin Wochenschr* **118**:659-68.
  78. **Hunfeld, K. P., P. Kraiczy, E. Kekoukh, V. Schafer, and V. Brade.** 2002a. Standardised *in vitro* susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi* against well-known and newly developed antimicrobial agents--possible implications for new therapeutic approaches to Lyme disease. *Int J Med Microbiol* **291 Suppl 33**:125-37.
  79. **Hunfeld, K. P., P. Kraiczy, T. A. Wichelhaus, V. Schafer, and V. Brade.** 2000b. Colorimetric *in vitro* susceptibility testing of penicillins, cephalosporins, macrolides, streptogramins, tetracyclines, and aminoglycosides against *Borrelia burgdorferi* isolates. *Int J Antimicrob Agents* **15**:11-7.
  80. **Hunfeld, K. P., P. Kraiczy, T. A. Wichelhaus, V. Schafer, and V. Brade.** 2000a. New colorimetric microdilution method for *in vitro* susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi* against antimicrobial substances. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**:27-32.
  81. **Hunfeld, K. P., R. Rodel, and T. A. Wichelhaus.** 2003. *In vitro* activity of eight oral cephalosporins against *Borrelia burgdorferi*. *Int J Antimicrob Agents* **21**:313-8.
  82. **Hunfeld, K. P., E. Ruzic-Sabljić, D. E. Norris, P. Kraiczy, and F. Strle.** 2005. *In vitro* susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates cultured from patients with erythema migrans before and after antimicrobial chemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1294-301.
  83. **Hunfeld, K. P., J. Weigand, T. A. Wichelhaus, E. Kekoukh, P. Kraiczy, and V. Brade.** 2001a. *In vitro* activity of mezlocillin, meropenem, aztreonam, vancomycin, teicoplanin, ribostamycin and fusidic acid against *Borrelia burgdorferi*. *Int J Antimicrob Agents* **17**:203-8.

84. **Hunfeld, K. P., T. A. Wichelhaus, R. Rodel, G. Acker, V. Brade, and P. Kraiczy.** 2004. Comparison of *in vitro* activities of ketolides, macrolides, and an azalide against the spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:344-7.
85. **Hutton, T. A., R. E. Goldstein, B. L. Njaa, D. Z. Atwater, Y. F. Chang, and K. W. Simpson.** 2008. Search for *Borrelia burgdorferi* in kidneys of dogs with suspected "Lyme nephritis". *J Vet Intern Med* **22**:860-5.
86. **Jackson, C. R., J. A. Boylan, J. G. Frye, and F. C. Gherardini.** 2007. Evidence of a conjugal erythromycin resistance element in the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Int J Antimicrob Agents* **30**:496-504.
87. **Janovska, D., D. Hulinska, and T. Godova.** 2001. Sensitivity of *Borrelia burgdorferi* strains isolated in the Czech Republic. *Cent Eur J Public Health* **9**:38-40.
88. **Johnson, R. C.** 1989. Isolation techniques for spirochetes and their sensitivity to antibiotics *in vitro* and *in vivo*. *Rev Infect Dis* **11 Suppl 6**:S1505-10.
89. **Johnson, R. C., C. Kodner, and M. Russell.** 1987. *In vitro* and *in vivo* susceptibility of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, to four antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* **31**:164-7.
90. **Johnson, R. C., N. Marek, and C. Kodner.** 1984. Infection of Syrian hamsters with Lyme disease spirochetes. *J Clin Microbiol* **20**:1099-101.
91. **Johnson, S. E., G. C. Klein, G. P. Schmid, and J. C. Feeley.** 1984. Susceptibility of the Lyme disease spirochete to seven antimicrobial agents. *Yale J Biol Med* **57**:549-53.
92. **Joynt, G. M., J. Lipman, C. D. Gomersall, R. J. Young, E. L. Wong, and T. Gin.** 2001. The pharmacokinetics of once-daily dosing of ceftriaxone in critically ill patients. *J Antimicrob Chemother* **47**:421-9.
93. **Kahn, C. M., and S. Line (ed.).** 2005. *The Merck Veterinary Manual*, 9th ed. Merck & Co., Inc., Whitehouse Station (NJ).
94. **Kashohrer, A., and A. Schonberg.** 1990. [Serologic studies of the occurrence of *Borrelia burgdorferi* in domestic animals in Berlin (West)]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **103**:374-8.
95. **Kim, D., D. Kordick, T. Divers, and Y. F. Chang.** 2006. *In vitro* susceptibilities of *Leptospira* spp. and *Borrelia burgdorferi* isolates to amoxicillin, tilmicosin, and enrofloxacin. *J Vet Sci* **7**:355-9.
96. **Klempner, M. S., L. T. Hu, J. Evans, C. H. Schmid, G. M. Johnson, R. P. Trevino, D. Norton, L. Levy, D. Wall, J. McCall, M. Kosinski, and A. Weinstein.** 2001. Two controlled trials of antibiotic treatment in patients with persistent symptoms and a history of Lyme disease. *N Engl J Med* **345**:85-92.
97. **Klempner, M. S., R. Noring, and R. A. Rogers.** 1993. Invasion of human skin fibroblasts by the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J Infect Dis* **167**:1074-81.
98. **Knight, S. W., and D. S. Samuels.** 1999. Natural synthesis of a DNA-binding protein from the C-terminal domain of DNA gyrase A in *Borrelia burgdorferi*. *Embo J* **18**:4875-81.
99. **Korenberg, E. I., V. N. Kriuchechnikov, V. Kovalevskii Iu, S. V. Shcherbakov, and R. I. Kuznetsova.** 1987. [The tick *Ixodes persulcatus* Schulze--a new vector of *Borrelia burgdorferi*]. *Dokl Akad Nauk SSSR* **297**:1268-70.
100. **Kornblatt, A. N., P. H. Urband, and A. C. Steere.** 1985. Arthritis caused by *Borrelia burgdorferi* in dogs. *J Am Vet Med Assoc* **186**:960-4.

101. **Kraiczy, P., K. P. Hunfeld, S. Breitner-Ruddock, R. Wurzner, G. Acker, and V. Brade.** 2000a. Comparison of two laboratory methods for the determination of serum resistance in *Borrelia burgdorferi* isolates. *Immunobiology* **201**:406-19.
102. **Kraiczy, P., J. Weigand, T. A. Wichelhaus, P. Heisig, H. Backes, V. Schafer, G. Acker, V. Brade, and K. P. Hunfeld.** 2001. *In vitro* activities of fluoroquinolones against the spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:2486-94.
103. **Kroker, R.** 1999. *Pharmaka zur Behandlung und Verhütung bakterieller Infektionen.* Parey Verlag, Berlin.
104. **Kruskal, W. H., and W. A. Wallis.** 1953. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J.Amer. Stat. Ass.* **48**:907-911.
105. **Kruskal, W. H., and W. A. Wallis.** 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J.Amer. Stat. Ass* **47**:583-621.
106. **Kung, K., and M. Wanner.** 1994. [Pharmacokinetics of baytril (enrofloxacin) in dogs]. *Schweiz Arch Tierheilkd* **136**:329-34.
107. **Lakos, A., and G. Nagy.** 1999. [Effect of an antibiotic combination on the propagation of *Borrelia burgdorferi*, causative agent of Lyme disease]. *Orv Hetil* **140**:1529-32.
108. **Lawrenz, M. B., J. M. Hardham, R. T. Owens, J. Nowakowski, A. C. Steere, G. P. Wormser, and S. J. Norris.** 1999. Human antibody responses to VlsE antigenic variation protein of *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* **37**:3997-4004.
109. **Lee, S. H., K. D. Jung, J. H. Lee, S. C. Kim, J. H. Kim, W. J. Jang, and K. H. Park.** 2002. Characterization of *Borrelia afzelii* isolated from *Ixodes nipponensis* and *Apodemus agrarius* in Chungju, Korea, by PCR-rFLP analyses of ospC gene and rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer. *Microbiol Immunol* **46**:677-83.
110. **Lengauer, H., F. T. Just, R. Edelhofer, and K. Pfister.** 2006. [Tick infestation and the prevalence of *Borrelia burgdorferi* and *Babesia divergens* in cattle in Bavaria]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **119**:335-41.
111. **Levy, S. A., and P. H. Duray.** 1988. Complete heart block in a dog seropositive for *Borrelia burgdorferi*. Similarity to human Lyme carditis. *J Vet Intern Med* **2**:138-44.
112. **Levy, S. A., B. A. Lissman, and C. M. Ficke.** 1993. Performance of a *Borrelia burgdorferi* bacterin in borreliosis-endemic areas. *J Am Vet Med Assoc* **202**:1834-8.
113. **Levy, S. A., T. P. O'Connor, J. L. Hanscom, P. Shields, L. Lorentzen, and A. A. Dimarco.** 2008. Quantitative measurement of C6 antibody following antibiotic treatment of *Borrelia burgdorferi* antibody-positive nonclinical dogs. *Clin Vaccine Immunol* **15**:115-9.
114. **Liang, F. T., R. H. Jacobson, R. K. Straubinger, A. Grooters, and M. T. Philipp.** 2000. Characterization of a *Borrelia burgdorferi* VlsE invariable region useful in canine Lyme disease serodiagnosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* **38**:4160-6.
115. **Lischer, C. J., C. M. Leutenegger, U. Braun, and H. Lutz.** 2000. Diagnosis of Lyme disease in two cows by the detection of *Borrelia burgdorferi* DNA. *Vet Rec* **146**:497-9.
116. **Littman, M. P., R. E. Goldstein, M. A. Labato, M. R. Lappin, and G. E. Moore.** 2006. ACVIM small animal consensus statement on Lyme disease in dogs: diagnosis, treatment, and prevention. *J Vet Intern Med* **20**:422-34.

117. **Livengood, J. A., and R. D. Gilmore, Jr.** 2006. Invasion of human neuronal and glial cells by an infectious strain of *Borrelia burgdorferi*. *Microbes Infect* **8**:2832-40.
118. **Ljostad, U., E. Skogvoll, R. Eikeland, R. Midgard, T. Skarpaas, A. Berg, and A. Mygland.** 2008. Oral doxycycline versus intravenous ceftriaxone for European Lyme neuroborreliosis: a multicentre, non-inferiority, double-blind, randomised trial. *Lancet Neurol* **7**:690-5.
119. **Logar, M., S. Lotric-Furlan, V. Maraspin, J. Cimperman, T. Jurca, E. Ruzic-Sabljić, and F. Strle.** 1999. Has the presence or absence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato as detected by skin culture any influence on the course of erythema migrans? *Wien Klin Wochenschr* **111**:945-50.
120. **Lomholt, H., A. M. Lebech, K. Hansen, F. Brandrup, and L. Halkier-Sorensen.** 2000. Long-term serological follow-up of patients treated for chronic cutaneous borreliosis or culture-positive erythema migrans. *Acta Derm Venereol* **80**:362-6.
121. **Lunemann, J. D., S. Zarmas, S. Priem, J. Franz, R. Zschenderlein, E. Aberer, R. Klein, L. Schouls, G. R. Burmester, and A. Krause.** 2001. Rapid typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in specimens from patients with different manifestations of Lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* **39**:1130-3.
122. **Ma, Y., A. Sturrock, and J. J. Weis.** 1991. Intracellular localization of *Borrelia burgdorferi* within human endothelial cells. *Infect Immun* **59**:671-8.
123. **Maes, E., P. Lecomte, and N. Ray.** 1998. A cost-of-illness study of Lyme disease in the United States. *Clin Ther* **20**:993-1008; discussion 992.
124. **Maetzel, D., W. A. Maier, and H. Kampen.** 2005. *Borrelia burgdorferi* infection prevalences in questing *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) in urban and suburban Bonn, western Germany. *Parasitol Res* **95**:5-12.
125. **Magnarelli, L. A., S. L. Bushmich, I. J. JW, and E. Fikrig.** 2005. Seroprevalence of antibodies against *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in cats. *Am J Vet Res* **66**:1895-9.
126. **Maraspin, V., E. Ruzic-Sabljić, and F. Strle.** 2006. Lyme borreliosis and *Borrelia spielmanii*. *Emerg Infect Dis* **12**:1177.
127. **Marti Ras, N., D. Postic, M. Foretz, and G. Baranton.** 1997. *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, a bacterial species "made in the U.S.A."? *Int J Syst Bacteriol* **47**:1112-7.
128. **Masuzawa, T., T. Komikado, A. Iwaki, H. Suzuki, K. Kaneda, and Y. Yanagihara.** 1996. Characterization of *Borrelia* sp. isolated from *Ixodes tanuki*, *I. turdus*, and *I. columnae* in Japan by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. *FEMS Microbiol Lett* **142**:77-83.
129. **Matuschka, F. R., R. Allgower, A. Spielman, and D. Richter.** 1999. Characteristics of garden dormice that contribute to their capacity as reservoirs for lyme disease spirochetes. *Appl Environ Microbiol* **65**:707-11.
130. **Matuschka, F. R., H. Eiffert, A. Ohlenbusch, and A. Spielman.** 1994. Amplifying role of edible dormice in Lyme disease transmission in central Europe. *J Infect Dis* **170**:122-7.
131. **Matuschka, F. R., P. Fischer, M. Heiler, D. Richter, and A. Spielman.** 1992. Capacity of European animals as reservoir hosts for the Lyme disease spirochete. *J Infect Dis* **165**:479-83.
132. **McEvoy, G. K.** 1992. AHFS Drug Information. American Society of Hospital Pharmacists Inc., Bethesda (MD).

133. **Moellering, R. C., Jr.** 1996. The place of quinolones in everyday clinical practice. *Chemotherapy* **42 Suppl 1**:54-61.
134. **Müller, I., G. Khanakah, M. Kundi, and G. Stanek.** 2002. Horses and *Borrelia*: immunoblot patterns with five *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains and sera from horses of various stud farms in Austria and from the Spanish Riding School in Vienna. *Int J Med Microbiol* **291 Suppl 33**:80-7.
135. **Nadelman, R. B., J. Nowakowski, G. Forseter, S. Bittker, D. Cooper, N. Goldberg, D. McKenna, and G. P. Wormser.** 1993. Failure to isolate *Borrelia burgdorferi* after antimicrobial therapy in culture-documented Lyme borreliosis associated with erythema migrans: report of a prospective study. *Am J Med* **94**:583-8.
136. **Neelakanta, G., X. Li, U. Pal, X. Liu, D. S. Beck, K. DePonte, D. Fish, F. S. Kantor, and E. Fikrig.** 2007. Outer surface protein B is critical for *Borrelia burgdorferi* adherence and survival within *Ixodes* ticks. *PLoS Pathog* **3**:e33.
137. **Nefedova, V. V., E. I. Korenberg, V. Andreichuk Iu, N. B. Gorelova, A. V. Markov, I. A. Fadeeva, and I. L. Evstaf'ev.** 2005. [Genetic characterization of pathogenic *Borrelia*, group A14S, isolated in Ukraine]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*:23-7.
138. **Nefedova, V. V., E. I. Korenberg, N. B. Gorelova, and Y. V. Kovalevskii.** 2004. Studies on the transovarial transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the taiga tick *Ixodes persulcatus*. *Folia Parasitol (Praha)* **51**:67-71.
139. **Niethammer, J., and F. Krapp (ed.).** 1987. *Handbuch der Säugetiere Europas*, vol. 1. Akademische Verlagsgesellschaft, Wiesbaden.
140. **O'Connell, S.** 1996. European Concerted Action on Lyme Borreliosis (EUCALB). *Euro Surveill* **1**:23-24.
141. **O'Connell, S., M. Granström, J. S. Gray, and G. Stanek.** 1998. Epidemiology of European Lyme borreliosis. *Zentralbl Bakteriol* **287**:229-240.
142. **Ohnishi, J., J. Piesman, and A. M. de Silva.** 2001. Antigenic and genetic heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* populations transmitted by ticks. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:670-5.
143. **Pachner, A. R., J. Basta, E. Delaney, and D. Hulinska.** 1995. Localization of *Borrelia burgdorferi* in murine Lyme borreliosis by electron microscopy. *Am J Trop Med Hyg* **52**:128-33.
144. **Pal, U., A. M. de Silva, R. R. Montgomery, D. Fish, J. Anguita, J. F. Anderson, Y. Lobet, and E. Fikrig.** 2000. Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A. *J Clin Invest* **106**:561-9.
145. **Picken, R. N., Y. Cheng, D. Han, J. A. Nelson, A. G. Reddy, M. K. Hayden, M. M. Picken, F. Strle, J. K. Bouseman, and G. M. Trenholme.** 1995. Genotypic and phenotypic characterization of *Borrelia burgdorferi* isolated from ticks and small animals in Illinois. *J Clin Microbiol* **33**:2304-15.
146. **Picken, R. N., Y. Cheng, F. Strle, and M. M. Picken.** 1996. Patient isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities of strain 25015. *J Infect Dis* **174**:1112-5.
147. **Picken, R. N., F. Strle, M. M. Picken, E. Ruzic-Sabljić, V. Maraspin, S. Lotric-Furlan, and J. Cimperman.** 1998. Identification of three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, and *B. afzelii*) among isolates from acrodermatitis chronica atrophicans lesions. *J Invest Dermatol* **110**:211-4.
148. **Plumb, D.** 2002. *Veterinary Drug Handbook*, 4th ed. PharmaVet Publishing, White Bear Lake (MI).

149. **Pollack, R. J., S. R. Telford, 3rd, and A. Spielman.** 1993. Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. *J Clin Microbiol* **31**:1251-5.
150. **Postic, D., M. V. Assous, P. A. Grimont, and G. Baranton.** 1994. Diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato evidenced by restriction fragment length polymorphism of rrf (5S)-rrl (23S) intergenic spacer amplicons. *Int J Syst Bacteriol* **44**:743-52.
151. **Postic, D., M. Garnier, and G. Baranton.** 2007. Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates--description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. *Int J Med Microbiol* **297**:263-71.
152. **Preac-Mursic, V., K. Weber, H. W. Pfister, B. Wilske, B. Gross, A. Baumann, and J. Prokop.** 1989. Survival of *Borrelia burgdorferi* in antibioticly treated patients with Lyme borreliosis. *Infection* **17**:355-9.
153. **Preac-Mursic, V., B. Wilske, and G. Schierz.** 1986. European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks culture conditions and antibiotic susceptibility. *Zentralbl Bakteriolog Mikrobiolog Hyg [A]* **263**:112-8.
154. **Preac Mursic, V., W. Marget, U. Busch, D. Pleterski Rigler, and S. Hagl.** 1996. Kill kinetics of *Borrelia burgdorferi* and bacterial findings in relation to the treatment of Lyme borreliosis. *Infection* **24**:9-16.
155. **Raveche, E. S., S. E. Schutzer, H. Fernandes, H. Bateman, B. A. McCarthy, S. P. Nickell, and M. W. Cunningham.** 2005. Evidence of *Borrelia* autoimmunity-induced component of Lyme carditis and arthritis. *J Clin Microbiol* **43**:850-6.
156. **Rebuelto, M., G. Albarells, L. Ambros, V. Kreil, L. Montoya, R. Bonafine, P. Otero, and R. Hallu.** 2002. Pharmacokinetics of ceftriaxone administered by the intravenous, intramuscular or subcutaneous routes to dogs. *J Vet Pharmacol Ther* **25**:73-6.
157. **Reisinger, E., I. Wendelin, R. Gasser, G. Halwachs, M. Wilders-Truschnig, and G. Krejs.** 1996. Antibiotics and increased temperature against *Borrelia burgdorferi* *in vitro*. *Scand J Infect Dis* **28**:155-7.
158. **Reisinger, E. C., I. Wendelin, and R. Gasser.** 1995. Inactivation of diaminopyrimidines and sulfonamides in Barbour-Stoenner-Kelly medium for isolation of *Borrelia burgdorferi*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **14**:732-3.
159. **Richter, D., B. Klug, A. Spielman, and F. R. Matuschka.** 2004a. Adaptation of diverse lyme disease spirochetes in a natural rodent reservoir host. *Infect Immun* **72**:2442-4.
160. **Richter, D., D. Postic, N. Sertour, I. Livey, F. R. Matuschka, and G. Baranton.** 2006. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**:873-81.
161. **Richter, D., D. B. Schlee, R. Allgower, and F. R. Matuschka.** 2004b. Relationships of a novel Lyme disease spirochete, *Borrelia spielmani* sp. nov., with its hosts in Central Europe. *Appl Environ Microbiol* **70**:6414-9.
162. **Rijpkema, S. G., M. J. Molkenboer, L. M. Schouls, F. Jongejan, and J. F. Schellekens.** 1995. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. *J Clin Microbiol* **33**:3091-5.
163. **Rijpkema, S. G., D. J. Tazelaar, M. J. Molkenboer, G. T. Noordhoek, G. Plantinga, L. M. Schouls, and J. F. Schellekens.** 1997. Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and group VS116 by

- PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. *Clin Microbiol Infect* **3**:109-116.
164. **Riviere, J., and J. Spoo.** 1995. *Tetracycline Antibiotics*, 7th ed. Iowa State University Press, Ames (IA).
165. **RKI.** 2007. Lyme-Borreliose: Zur Situation in den östlichen Bundesländern, *Epidemiologisches Bulletin*, vol. 38.
166. **Rödel, R., A. Freyer, T. Bittner, V. Schafer, and K. P. Hunfeld.** 2007. *In vitro* activities of faropenem, ertapenem, imipenem and meropenem against *Borrelia burgdorferi* s.l. *Int J Antimicrob Agents* **30**:83-6.
167. **Rodriguez, I., R. Lienhard, L. Gern, M. C. Veuve, F. Jouda, H. H. Siegrist, C. Fernandez, and J. E. Rodriguez.** 2007. Evaluation of a modified culture medium for *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **102**:999-1002.
168. **Rolle, M., and A. Mayr (ed.).** 2002. *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 7th ed. Enke Verlag, Stuttgart.
169. **Rossi, M.** 2005. [Late manifestations of Lyme borreliosis]. *Ther Umsch* **62**:745-9.
170. **Ruzic-Sabljić, E., T. Podreka, V. Maraspin, and F. Strle.** 2005. Susceptibility of *Borrelia afzelii* strains to antimicrobial agents. *Int J Antimicrob Agents* **25**:474-8.
171. **Ruzic-Sabljić, E., and F. Strle.** 2004. Comparison of growth of *Borrelia afzelii*, *B. garinii*, and *B. burgdorferi* sensu stricto in MKP and BSK-II medium. *Int J Med Microbiol* **294**:407-12.
172. **Saint Girons, I., L. Gern, J. S. Gray, E. C. Guy, E. Korenberg, P. A. Nuttall, S. G. Rijpkema, A. Schonberg, G. Stanek, and D. Postic.** 1998. Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in Europe. *Zentralbl Bakteriell* **287**:190-5.
173. **Samuels, D. S., and C. F. Garon.** 1993b. Coumermycin A1 inhibits growth and induces relaxation of supercoiled plasmids in *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:46-50.
174. **Samuels, D. S., R. T. Marconi, and C. F. Garon.** 1993a. Variation in the size of the ospA-containing linear plasmid, but not the linear chromosome, among the three *Borrelia* species associated with Lyme disease. *J Gen Microbiol* **139**:2445-9.
175. **Santino, I., F. Scazzocchio, L. Ciceroni, S. Ciarrocchi, R. Sessa, and M. Del Piano.** 2006. *In vitro* susceptibility of isolates of *Borrelia burgdorferi* s.l. to antimicrobial agents. *Int J Immunopathol Pharmacol* **19**:545-9.
176. **Schaarschmidt, D., R. Oehme, P. Kimmig, R. D. Hesch, and S. Englisch.** 2001. Detection and molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks and in different patient samples from southwest Germany. *Eur J Epidemiol* **17**:1067-74.
177. **Schmid, G. P., A. G. Steigerwalt, S. E. Johnson, A. G. Barbour, A. C. Steere, I. M. Robinson, and D. J. Brenner.** 1984. DNA characterization of the spirochete that causes Lyme disease. *J Clin Microbiol* **20**:155-8.
178. **Schwan, T. G., W. Burgdorfer, and C. F. Garon.** 1988. Changes in infectivity and plasmid profile of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, as a result of *in vitro* cultivation. *Infect Immun* **56**:1831-6.
179. **Schwartz, I., G. P. Wormser, J. J. Schwartz, D. Cooper, P. Weissensee, A. Gazumyan, E. Zimmermann, N. S. Goldberg, S. Bittker, G. L. Campbell, and C. S. Pavia.** 1992b. Diagnosis of early Lyme disease by polymerase chain reaction amplification and culture of skin biopsies from erythema migrans lesions. *J Clin Microbiol* **30**:3082-8.

180. **Seidel, M. F., A. B. Domene, and H. Vetter.** 2007. Differential diagnoses of suspected Lyme borreliosis or post-Lyme-disease syndrome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **26**:611-7.
181. **Seltzer, E. G., M. A. Gerber, M. L. Cartter, K. Freudigman, and E. D. Shapiro.** 2000. Long-term outcomes of persons with Lyme disease. *Jama* **283**:609-16.
182. **Sicklinger, M., R. Wienecke, and U. Neubert.** 2003. *In vitro* susceptibility testing of four antibiotics against *Borrelia burgdorferi*: a comparison of results for the three genospecies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, and *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *J Clin Microbiol* **41**:1791-3.
183. **Skotarczak, B.** 2002. Canine borreliosis--epidemiology and diagnostics. *Ann Agric Environ Med* **9**:137-40.
184. **Skuballa, J., R. Oehme, K. Hartelt, T. Petney, T. Bucher, P. Kimmig, and H. Taraschewski.** 2007. European Hedgehogs as Hosts for *Borrelia* spp., Germany. *Emerg Infect Dis* **13**:952-3.
185. **Smith, R. P., R. T. Schoen, D. W. Rahn, V. K. Sikand, J. Nowakowski, D. L. Parenti, M. S. Holman, D. H. Persing, and A. C. Steere.** 2002. Clinical characteristics and treatment outcome of early Lyme disease in patients with microbiologically confirmed erythema migrans. *Ann Intern Med* **136**:421-8.
186. **Stackebrandt, E., W. Frederiksen, G. M. Garrity, P. A. Grimont, P. Kampfner, M. C. Maiden, X. Nesme, R. Rossello-Mora, J. Swings, H. G. Truper, L. Vauterin, A. C. Ward, and W. B. Whitman.** 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:1043-7.
187. **Stanek, G., S. O'Connell, M. Cimmino, E. Aberer, W. Kristoferitsch, M. Granstrom, E. Guy, and J. Gray.** 1996. European Union Concerted Action on Risk Assessment in Lyme Borreliosis: clinical case definitions for Lyme borreliosis. *Wien Klin Wochenschr* **108**:741-7.
188. **Steere, A. C., E. Dwyer, and R. Winchester.** 1990. Association of chronic Lyme arthritis with HLA-DR4 and HLA-DR2 alleles. *N Engl J Med* **323**:219-23.
189. **Steere, A. C., D. Gross, A. L. Meyer, and B. T. Huber.** 2001. Autoimmune mechanisms in antibiotic treatment-resistant Lyme arthritis. *J Autoimmun* **16**:263-8.
190. **Steere, A. C., S. E. Malawista, N. H. Bartenhagen, P. N. Spieler, J. H. Newman, D. W. Rahn, G. J. Hutchinson, J. Green, D. R. Snyderman, and E. Taylor.** 1984. The clinical spectrum and treatment of Lyme disease. *Yale J Biol Med* **57**:453-64.
191. **Steere, A. C., S. E. Malawista, J. A. Hardin, S. Ruddy, W. Askenase, and W. A. Andiman.** 1977a. Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis. The enlarging clinical spectrum. *Ann Intern Med* **86**:685-98.
192. **Steere, A. C., S. E. Malawista, J. H. Newman, P. N. Spieler, and N. H. Bartenhagen.** 1980. Antibiotic therapy in Lyme disease. *Ann Intern Med* **93**:1-8.
193. **Steere, A. C., S. E. Malawista, D. R. Snyderman, R. E. Shope, W. A. Andiman, M. R. Ross, and F. M. Steele.** 1977b. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis Rheum* **20**:7-17.
194. **Stefancikova, A., M. Derdakova, G. Stepanova, B. Pet'ko, E. Szesakova, I. Skardova, and L. Cislakova.** 2005. Heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and their reflection on immune response. *Ann Agric Environ Med* **12**:211-6.

195. **Stefancikova, A., G. Stepanova, M. Derdakova, B. Pet'ko, J. Kysel'ova, J. Ciganek, L. Strojny, L. Cislakova, and M. Travnicek.** 2002. Serological evidence for *Borrelia burgdorferi* infection associated with clinical signs in dairy cattle in Slovakia. *Vet Res Commun* **26**:601-11.
196. **Stiernstedt, S. H., and B. Wretlind.** 1996. Dialysis culture enables more accurate determination of MIC of benzylpenicillin for *Borrelia burgdorferi* than does conventional procedure. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:2882-3.
197. **Stoebel, K., A. Schoenberg, and W. J. Streich.** 2003. The seroepidemiology of Lyme borreliosis in zoo animals in Germany. *Epidemiol Infect* **131**:975-83.
198. **Stoenner, H. G.** 1974. Biology of *Borrelia hermsii* in Kelly medium. *Appl Microbiol* **28**:540-3.
199. **Straubinger, R. K.** 2000a. Lyme Borreliosis in Dogs. In L. E. Carmichael (ed.), *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*. International Veterinary Information Service.
200. **Straubinger, R. K.** 2000b. PCR-Based quantification of *Borrelia burgdorferi* organisms in canine tissues over a 500-Day postinfection period. *J Clin Microbiol* **38**:2191-9.
201. **Straubinger, R. K., Y. F. Chang, R. H. Jacobson, and M. J. Appel.** 1995. Sera from OspA-vaccinated dogs, but not those from tick-infected dogs, inhibit in vitro growth of *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol* **33**:2745-51.
202. **Straubinger, R. K., A. F. Straubinger, L. Harter, R. H. Jacobson, Y. F. Chang, B. A. Summers, H. N. Erb, and M. J. Appel.** 1997a. *Borrelia burgdorferi* migrates into joint capsules and causes an up-regulation of interleukin-8 in synovial membranes of dogs experimentally infected with ticks. *Infect Immun* **65**:1273-85.
203. **Straubinger, R. K., A. F. Straubinger, B. A. Summers, H. N. Erb, L. Harter, and M. J. Appel.** 1998. *Borrelia burgdorferi* induces the production and release of proinflammatory cytokines in canine synovial explant cultures. *Infect Immun* **66**:247-58.
204. **Straubinger, R. K., B. A. Summers, Y. F. Chang, and M. J. Appel.** 1997b. Persistence of *Borrelia burgdorferi* in experimentally infected dogs after antibiotic treatment. *J Clin Microbiol* **35**:111-6.
205. **Stricker, R. B.** 2007. Counterpoint: long-term antibiotic therapy improves persistent symptoms associated with lyme disease. *Clin Infect Dis* **45**:149-57.
206. **Strle, F., R. N. Picken, Y. Cheng, J. Cimperman, V. Maraspin, S. Lotric-Furlan, E. Ruzic-Sabljić, and M. M. Picken.** 1997. Clinical findings for patients with Lyme borreliosis caused by *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities to strain 25015. *Clin Infect Dis* **25**:273-80.
207. **Strle, F., V. Preac-Mursic, J. Cimperman, E. Ruzic, V. Maraspin, and M. Jereb.** 1993. Azithromycin versus doxycycline for treatment of erythema migrans: clinical and microbiological findings. *Infection* **21**:83-8.
208. **Summers, B. A., A. F. Straubinger, R. H. Jacobson, Y. F. Chang, M. J. Appel, and R. K. Straubinger.** 2005. Histopathological studies of experimental lyme disease in the dog. *J Comp Pathol* **133**:1-13.
209. **Sung, S. Y., J. V. McDowell, J. A. Carlyon, and R. T. Marconi.** 2000. Mutation and recombination in the upstream homology box-flanked ospE-related genes of the Lyme disease spirochetes result in the development of new antigenic variants during infection. *Infect Immun* **68**:1319-27.
210. **Swanson, S. J., D. Neitzel, K. D. Reed, and E. A. Belongia.** 2006. Coinfections acquired from *Ixodes* ticks. *Clin Microbiol Rev* **19**:708-27.

211. **Tanyildizi, S., and G. Turk.** 2004. The effects of diminazene aceturate and ceftriaxone on ram sperm. *Theriogenology* **61**:529-35.
212. **Tilley, L. P., and F. W. K. Smith (ed.).** 2003. *The 5-Minute Veterinary Consult*, 3rd ed. Blackwell Publishing Professional, Ames (IA).
213. **Töpfer, K. H., and R. K. Straubinger.** 2007. Characterization of the humoral immune response in dogs after vaccination against the Lyme borreliosis agent A study with five commercial vaccines using two different vaccination schedules. *Vaccine* **25**:314-26.
214. **Travnicek, M., A. Stefancikova, D. Nadzamova, M. Stanko, L. Cislakova, B. Pet'ko, S. Mardzinova, and M. R. Bhide.** 2002. Seroprevalence of anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies in sheep and goats from mountainous areas of Slovakia. *Ann Agric Environ Med* **9**:153-5.
215. **van Dam, A. P., H. Kuiper, K. Vos, A. Widjojokusumo, B. M. de Jongh, L. Spanjaard, A. C. Ramselaar, M. D. Kramer, and J. Dankert.** 1993. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin Infect Dis* **17**:708-17.
216. **Vaterlaus, C.** 1998. *Der Gartenschläfer - Ökologie, Populationsstruktur, Populationsdynamik und die Verbreitung in der Schweiz*. Ph.D. thesis. Universität Basel, Basel, Switzerland.
217. **Wang, G., A. P. van Dam, and J. Dankert.** 1999a. Phenotypic and genetic characterization of a novel *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate from a patient with lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* **37**:3025-8.
218. **Wang, G., A. P. van Dam, I. Schwartz, and J. Dankert.** 1999b. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* **12**:633-53.
219. **Wayne, L. G.** 1988. International Committee on Systematic Bacteriology: announcement of the report of the ad hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* **268**:433-4.
220. **Weigand, J.** 2006. *Zur in-vitro-Empfindlichkeit von Borrelia burgdorferi gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, Aminoglycoside, Ansamycine, Glycopeptidantibiotika, Fusidinsäure, Mupirocin und Fluorchinolone*. Inaugural-Dissertation. Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
221. **WHO/CDS/VPH.** 1995. Estimated Lyme borreliosis annual incidence in selected European countries, Report of WHO workshop on Lyme Borreliosis Diagnosis and Surveillance 141-1, Warschau, Polen
222. **Wilske, B.** 2005. Epidemiology and diagnosis of Lyme borreliosis. *Ann Med* **37**:568-79.
223. **Wilske, B., U. Busch, H. Eiffert, V. Fingerle, H. W. Pfister, D. Rossler, and V. Preac-Mursic.** 1996. Diversity of OspA and OspC among cerebrospinal fluid isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from patients with neuroborreliosis in Germany. *Med Microbiol Immunol* **184**:195-201.
224. **Wilske, B., V. Fingerle, and U. Schulte-Spechtel.** 2007. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **49**:13-21.
225. **Wilske, B., V. Preac-Mursic, U. B. Gobel, B. Graf, S. Jauris, E. Soutschek, E. Schwab, and G. Zumstein.** 1993. An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *J Clin Microbiol* **31**:340-50.

- 
226. **Wilske, B., L. Zöller, V. Brade, M. Eiffert, U. B. Göbel, G. Stanek, and P. H. W.** 2000. MiQ 12 Lyme Borreliose - Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik. Urban & Fischer Verlag, München, Jena
  227. **Wodecka, B.** 2007. [Significance of red deer (*Cervus elaphus*) in the ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato]. Wlad Parazytol **53**:231-7.
  228. **Wormser, G. P., R. J. Dattwyler, E. D. Shapiro, J. J. Halperin, A. C. Steere, M. S. Klempner, P. J. Krause, J. S. Bakken, F. Strle, G. Stanek, L. Bockenstedt, D. Fish, J. S. Dumler, and R. B. Nadelman.** 2006. The clinical assessment, treatment, and prevention of lyme disease, human granulocytic anaplasmosis, and babesiosis: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis **43**:1089-134.
  229. **Wormser, G. P., R. B. Nadelman, R. J. Dattwyler, D. T. Dennis, E. D. Shapiro, A. C. Steere, T. J. Rush, D. W. Rahn, P. K. Coyle, D. H. Persing, D. Fish, and B. J. Luft.** 2000. Practice guidelines for the treatment of Lyme disease. The Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis **31 Suppl 1**:1-14.
  230. **Wormser, G. P., R. Ramanathan, J. Nowakowski, D. McKenna, D. Holmgren, P. Visintainer, R. Dornbush, B. Singh, and R. B. Nadelman.** 2003. Duration of antibiotic therapy for early Lyme disease. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Ann Intern Med **138**:697-704.
  231. **Xu, Y., and R. C. Johnson.** 1995. Analysis and comparison of plasmid profiles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains. J Clin Microbiol **33**:2679-85.
  232. **Yang, L., J. H. Weis, E. Eichwald, C. P. Kolbert, D. H. Persing, and J. J. Weis.** 1994. Heritable susceptibility to severe *Borrelia burgdorferi*-induced arthritis is dominant and is associated with persistence of large numbers of spirochetes in tissues. Infect Immun **62**:492-500.
  233. **Zhang, J. R., J. M. Hardham, A. G. Barbour, and S. J. Norris.** 1997. Antigenic variation in Lyme disease borreliae by promiscuous recombination of VMP-like sequence cassettes. Cell **89**:275-85.
  234. **Zhang, X., M. I. Meltzer, C. A. Pena, A. B. Hopkins, L. Wroth, and A. D. Fix.** 2006. Economic impact of Lyme disease. Emerg Infect Dis **12**:653-60.
  235. **Zingg, B. C., J. F. Anderson, R. C. Johnson, and R. B. LeFebvre.** 1993. Comparative analysis of genetic variability among *Borrelia burgdorferi* isolates from Europe and the United States by restriction enzyme analysis, gene restriction fragment length polymorphism, and pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol **31**:3115-22.
  236. **Zore, A., E. Ruzic-Sabljić, V. Maraspin, J. Cimperman, S. Lotric-Furlan, A. Pikelj, T. Jurca, M. Logar, and F. Strle.** 2002. Sensitivity of culture and polymerase chain reaction for the etiologic diagnosis of erythema migrans. Wien Klin Wochenschr **114**:606-9.

## 9 Anhang

**Tabelle 31:** Testspanne aller verwendeten Substanzen in µg/ml

Substanzklasse		Substanz	Testspanne in µg/ml
Tetracycline		Doxycyclin	0,016 - 32
β-Lactame	Penicilline	Penicillin	0,016 - 1
	Cephalosporine	Amoxicillin	0,125 - 16
		Ceftriaxon	0,004 - 8
		Cefuroxim	0,063 - 8
Chinolone/ Gyrasehemmer		Ciprofloxacin	0,031 - 4
		Levofloxacin	0,031 - 4
Makrolide		Erythromycin	0,0002441 - 4
		Clarithromycin	0,0002441 - 4

**Tabelle 32:** Endkonzentrationen der Antibiotika Doxycyclin, Ceftriaxon, Erythromycin und Clarithromycin in den einzelnen Wells nach Zugabe von 200µl

Inokulumssuspension

	Doxycyclin	Ceftriaxon	Erythromycin	Clarithromycin
1	0,016	0,004	0,0002441	0,0002441
2	0,031	0,008	0,0004882	0,0004882
3	0,063	0,016	0,000976	0,000976
4	0,125	0,031	0,0019531	0,0019531
5	0,25	0,063	0,003906	0,003906
6	0,5	0,125	0,0078125	0,0078125
7	1	0,25	0,015625	0,015625
8	2	0,5	0,03125	0,03125
9	4	1	0,0625	0,0625
10	8	2	0,125	0,125
11	16	4	0,25	0,25
12	32	8	0,5	0,5
13	n. g. *	n. g. *	1	1
14	n. g. *	n. g. *	2	2
15	n. g. *	n. g. *	4	4

\* höhere Konzentrationen methodebedingt nicht getestet

**Tabelle 33:** Endkonzentrationen der Antibiotika Amoxicillin, Penicillin, Cefuroxim, Ciprofloxacin und Levofloxacin in den einzelnen Wells nach Zugabe von 200µl

Inokulumssuspension

	Amoxicillin	Penicillin	Cefuroxim	Ciprofloxacin	Levofloxacin
1	0,125	0,016	0,063	0,031	0,031
2	0,25	0,031	0,125	0,063	0,063
3	0,5	0,063	0,25	0,125	0,125
4	1	0,125	0,5	0,25	0,25
5	2	0,25	1	0,5	0,5
6	4	0,5	2	1	1
7	8	1	4	2	2
8	16	n. g. *	8	4	4

\* höhere Konzentrationen methodebedingt nicht getestet

**Tabelle 34:** Bestimmung der MHK von *S. aureus* ATCC 29213 entsprechend des Richtlinie M7-A7 des CLSI. Beimpfung der Mikrotiterplatten nach Lösung der lyophilisierten Antibiotika mit BSK-Medium und 48h Inkubation bei 33 °C.

Antibiotikum	Range CLSI in µg/ml	MHK in µg/ml	Median MHK in µg/ml
Doxycyclin	0,12-0,5	0,25	0,25
		0,125	
		0,25	
Penicillin	0,25-2	>1	>1
		>1	
		>1	
Amoxicillin	0,12-0,5	4	2
		2	
		2	
Ceftriaxon	1-8	4	4
		4	
		4	
Cefuroxim	0,5-2	2	2
		2	
		4	
Ciprofloxacin	0,12-0,5	0,125	0,125
		0,125	
		0,25	
Levofloxacin	0,06-0,5	0,125	0,125
		0,125	
		0,125	
Erythromycin	0,25-1	0,25	0,25
		0,25	
		0,125	
Clarithromycin	0,12-0,5	0,063	0,063
		0,125	
		0,063	

**Tabelle 35:** MHK und MBK der Antibiotika Doxycyclin, Erythromycin und Clarithromycin für alle Isolate der Genospezies *B. spielmanii*, Auflistung aller gemessenen Werte aus 3 Versuchen in µg/ml.

<i>Genospezies</i> <b>Stamm</b>	<b>Konzentration des Antibiotikums in µg/ml*</b>					
	Doxycyclin		Erythromycin		Clarithromycin	
	MHK	MBK	MHK	MBK	MHK	MBK
<i>B. spielmanii</i>						
<b>PMew</b>	0,5	16	0,031	4	0,004	1
	0,5	16	0,031	2	0,008	1
	0,5	16	0,063	2	0,008	1
<b>PSigII</b>	0,125	8	0,008	2	0,002	1
	0,125	8	0,008	2	0,002	0,5
	0,125	16	0,016	4	0,004	2
<b>PCEq</b>	0,125	16	0,008	2	0,002	1
	0,25	16	0,016	4	0,004	1
	0,125	16	0,016	4	0,002	1
<b>PHap</b>	0,063	16	0,008	2	0,002	0,5
	0,063	16	0,008	2	0,001	0,25
	0,125	16	0,008	1	0,002	0,5
<b>Jese</b>	0,25	8	0,016	1	0,004	0,5
	0,125	4	0,016	1	0,004	0,5
	0,125	8	0,016	2	0,004	0,5
<b>Anzic</b>	0,063	8	0,008	2	0,002	1
	0,063	8	0,008	2	0,002	0,5
	0,125	8	0,008	2	0,002	1
<b>PMai</b>	0,125	8	0,008	1	0,002	0,5
	0,125	8	0,008	1	0,002	0,5
	0,125	8	0,008	1	0,002	0,5
<b>A14S</b>	0,125	16	0,016	2	0,002	1
	0,125	16	0,016	2	0,004	1
	0,125	16	0,031	2	0,004	1
<b>TIsarII</b>	0,25	16	0,031	1	0,004	0,5
	0,25	16	0,031	2	0,008	0,5
	0,25	16	0,031	1	0,008	0,25
<b>TIsarIII</b>	0,125	8	0,031	2	0,008	1
	0,25	8	0,063	2	0,008	1
	0,125	8	0,031	2	0,008	2

\* Werte gerundet auf 3. Stelle hinter dem Komma

**Tabelle 36:** MHK und MBK der Antibiotika Doxycyclin, Erythromycin und Clarithromycin für alle Isolate der Genospezies *B. burgdorferi s.s.*, *B. garinii* und *B. afzelii*, Auflistung aller gemessenen Werte aus 3 Versuchen in µg/ml.

Genospezies Stamm	Konzentration des Antibiotikums in µg/ml*					
	Doxycyclin		Erythromycin		Clarithromycin	
	MHK	MBK	MHK	MBK	MHK	MBK
<i>B. burgdorferi</i> <i>sensu strictu</i>						
<b>B31e2</b>	0,5	32	0,063	4	0,008	2
	0,25	16	0,031	4	0,008	2
	0,25	16	0,031	4	0,008	2
<b>LW2</b>	0,125	32	0,031	4	0,004	4
	0,125	32	0,031	4	0,004	2
	0,25	32	0,063	> 4	0,016	4
<i>B. afzelii</i>						
<b>FEM1</b>	0,125	4	0,031	2	0,004	1
	0,125	4	0,031	2	0,004	0,5
	0,125	4	0,031	2	0,008	2
<b>G600</b>	0,25	2	0,031	2	0,008	1
	0,25	2	0,031	2	0,008	0,5
	0,25	4	0,031	2	0,008	0,5
<b>G1039</b>	0,063	4	0,016	2	0,002	1
	0,125	4	0,031	2	0,008	0,5
	0,125	4	0,016	2	0,004	1
<i>B. garinii</i>						
<b>PSth</b>	0,25	16	0,031	4	0,008	2
	0,25	32	0,031	4	0,008	2
	0,5	32	0,063	4	0,008	2
<b>M2094</b>	0,25	16	0,016	4	0,004	1
	0,5	8	0,031	4	0,004	2
	0,25	16	0,031	2	0,004	1
<b>G1</b>	0,25	16	0,016	2	0,004	1
	0,125	16	0,016	4	0,002	1
	0,125	16	0,031	4	0,002	1

\* Werte gerundet auf 3. Stelle hinter dem Komma

**Tabelle 37:** MHK und MBK der Antibiotika Ceftriaxon, Amoxicillin und Penicillin für alle Isolate der Genospezies *B. spielmanii*, Auflistung aller gemessenen Werte aus 3 Versuchen in µg/ml.

Genospezies Stamm	Konzentration des Antibiotikums in µg/ml					
	Ceftriaxon		Amoxicillin		Penicillin	
	MHK	MBK	MHK	MBK	MHK	MBK
<i>B. spielmanii</i>						
<b>PMew</b>	0,063	4	1	> 16	0,25	> 1
	0,125	4	1	> 16	0,125	> 1
	0,125	4	2	> 16	0,25	> 1
<b>PSigII</b>	0,031	0,5	0,5	16	0,063	1
	0,031	1	0,5	8	0,063	> 1
	0,031	1	1	16	0,125	> 1
<b>PCEq</b>	0,031	2	1	> 16	0,125	> 1
	0,031	2	0,5	> 16	0,063	> 1
	0,031	2	0,25	> 16	0,063	1
<b>PHap</b>	0,063	2	2	16	0,25	> 1
	0,063	2	2	> 16	0,25	> 1
	0,125	2	0,5	> 16	0,125	> 1
<b>Jese</b>	0,031	1	0,25	8	0,031	> 1
	0,031	2	0,25	16	0,031	> 1
	0,031	2	0,25	16	0,031	> 1
<b>Anzic</b>	0,016	1	0,25	16	0,031	> 1
	0,016	1	≤ 0,125	16	≤ 0,016	> 1
	0,016	1	0,25	16	0,031	> 1
<b>PMai</b>	0,063	4	2	8	0,25	> 1
	0,063	4	2	8	0,25	> 1
	0,063	2	1	16	0,125	> 1
<b>A14S</b>	0,031	0,5	1	8	0,125	> 1
	0,031	0,5	0,25	16	0,031	> 1
	0,031	1	0,25	16	0,031	> 1
<b>TI sarII</b>	0,016	1	≤ 0,125	16	0,031	> 1
	0,016	0,5	≤ 0,125	16	0,031	1
	0,016	0,5	≤ 0,125	8	≤ 0,016	1
<b>TI sarIII</b>	0,063	0,5	2	2	0,25	0,5
	0,125	1	2	4	0,25	1
	0,063	0,5	2	4	0,25	0,5

**Tabelle 38:** MHK und MBK der Antibiotika Ceftriaxon, Amoxicillin und Penicillin für alle Isolate der Genospezies *B. burgdorferi s.s.*, *B. garinii* und *B. afzelii*, Auflistung aller gemessenen Werte aus 3 Versuchen in µg/ml.

Genospezies Stamm	Konzentration des Antibiotikums in µg/ml					
	Ceftriaxon		Amoxicillin		Penicillin	
	MHK	MBK	MHK	MBK	MHK	MBK
<i>B. burgdorferi sensu strictu</i>						
<b>B31e2</b>	0,063	2	1	16	0,125	> 1
	0,031	2	0,25	16	0,031	> 1
	0,031	2	0,5	16	0,063	> 1
<b>LW2</b>	0,031	4	1	4	0,125	> 1
	0,031	4	1	4	0,125	> 1
	0,063	4	2	8	0,25	> 1
<i>B. afzelii</i>						
<b>FEM1</b>	0,063	2	4	4	1	> 1
	0,063	4	4	8	> 1	> 1
	0,125	2	2	4	> 1	> 1
<b>G600</b>	0,063	0,5	1	2	0,25	1
	0,063	0,5	1	4	0,25	1
	0,031	0,5	1	4	0,5	1
<b>G1039</b>	0,031	0,25	1	4	0,25	> 1
	0,031	0,5	0,5	8	0,25	> 1
	0,031	0,5	0,5	8	0,25	1
<i>B. garinii</i>						
<b>PSth</b>	0,031	1	≤ 0,125	8	≤ 0,016	> 1
	0,031	2	0,125	16	≤ 0,016	> 1
	0,031	2	0,125	8	≤ 0,016	> 1
<b>M2094</b>	0,031	2	0,25	16	0,031	> 1
	0,031	1	0,25	16	0,031	> 1
	0,031	2	0,5	16	0,031	> 1
<b>G1</b>	0,031	2	0,5	> 16	≤ 0,016	> 1
	0,031	2	≤ 0,125	16	0,031	> 1
	0,031	2	≤ 0,125	16	≤ 0,016	> 1

**Tabelle 39:** MHK und MBK der Antibiotika Cefuroxim, Ciprofloxacin, Levofloxacin für alle Isolate der Genospezies *B. spielmanii*, Auflistung aller gemessenen Werte aus 3 Versuchen in µg/ml.

Genospezies Stamm	Konzentration des Antibiotikums in µg/ml					
	Cefuroxim		Ciprofloxacin		Levofloxacin	
	MHK	MBK	MHK	MBK	MHK	MBK
<i>B. spielmanii</i>						
<b>PMew</b>	0,125	> 8	> 4	> 4	4	> 4
	0,125	> 8	> 4	> 4	> 4	> 4
	0,25	> 8	> 4	> 4	> 4	> 4
<b>PSigII</b>	0,125	4	1	4	2	4
	0,125	8	1	> 4	2	> 4
	0,125	8	2	> 4	4	> 4
<b>PCEq</b>	0,125	> 8	1	> 4	2	> 4
	0,125	> 8	0,5	> 4	2	> 4
	0,125	> 8	1	> 4	2	> 4
<b>PHap</b>	0,25	> 8	4	> 4	4	> 4
	0,25	> 8	2	> 4	4	> 4
	0,5	> 8	4	> 4	> 4	> 4
<b>Jese</b>	0,125	> 8	4	> 4	> 4	> 4
	0,125	4	4	> 4	> 4	> 4
	0,125	8	4	> 4	> 4	> 4
<b>Anzic</b>	0,125	> 8	1	> 4	2	> 4
	0,125	> 8	1	> 4	2	> 4
	0,125	> 8	1	> 4	4	> 4
<b>PMai</b>	0,125	8	4	> 4	> 4	> 4
	0,125	> 8	4	> 4	> 4	> 4
	0,25	8	2	> 4	> 4	> 4
<b>A14S</b>	0,125	4	1	4	2	4
	0,125	> 8	1	4	2	> 4
	0,125	8	1	4	2	> 4
<b>TI sarII</b>	0,125	2	0,5	> 4	0,5	> 4
	0,125	2	0,25	4	0,5	> 4
	≤ 0,063	1	0,25	> 4	0,25	> 4
<b>TI sarIII</b>	0,5	4	2	4	4	> 4
	0,5	4	2	> 4	4	> 4
	0,25	4	2	> 4	4	> 4

**Tabelle 40:** MHK und MBK der Antibiotika Cefuroxim, Ciprofloxacin und Levofloxacin für alle Isolate der Genospezies *B. burgdorferi s.s.*, *B. garinii* und *B. afzelii*, Auflistung aller gemessenen Werte aus 3 Versuchen in µg/ml.

Genospezies Stamm	Konzentration des Antibiotikums in µg/ml					
	Cefuroxim		Ciprofloxacin		Levofloxacin	
	MHK	MBK	MHK	MBK	MHK	MBK
<i>B. burgdorferi</i> <i>sensu strictu</i>						
<b>B31e2</b>	0,125	> 8	> 4	> 4	4	> 4
	0,125	> 8	2	> 4	4	> 4
	0,125	8	4	> 4	4	> 4
<b>LW2</b>	0,25	> 8	2	> 4	4	> 4
	0,25	8	2	> 4	4	> 4
	0,125	8	4	> 4	4	> 4
<i>B. afzelii</i>						
<b>FEM1</b>	0,5	> 8	> 4	> 4	4	> 4
	0,5	> 8	> 4	> 4	4	> 4
	0,5	> 8	4	> 4	4	> 4
<b>G600</b>	0,25	4	> 4	> 4	> 4	> 4
	0,25	4	2	> 4	4	> 4
	0,25	4	> 4	> 4	4	> 4
<b>G1039</b>	0,125	8	1	> 4	2	> 4
	0,125	8	1	> 4	2	> 4
	0,125	> 8	1	> 4	2	> 4
<i>B. garinii</i>						
<b>PSth</b>	0,125	> 8	1	> 4	2	> 4
	0,125	> 8	1	> 4	2	> 4
	0,125	> 8	2	> 4	2	> 4
<b>M2094</b>	0,125	> 8	> 4	> 4	> 4	> 4
	0,25	> 8	> 4	> 4	> 4	> 4
	0,125	> 8	> 4	> 4	> 4	> 4
<b>G1</b>	0,125	> 8	1	4	2	> 4
	0,125	> 8	1	> 4	2	> 4
	0,125	> 8	1	> 4	2	> 4

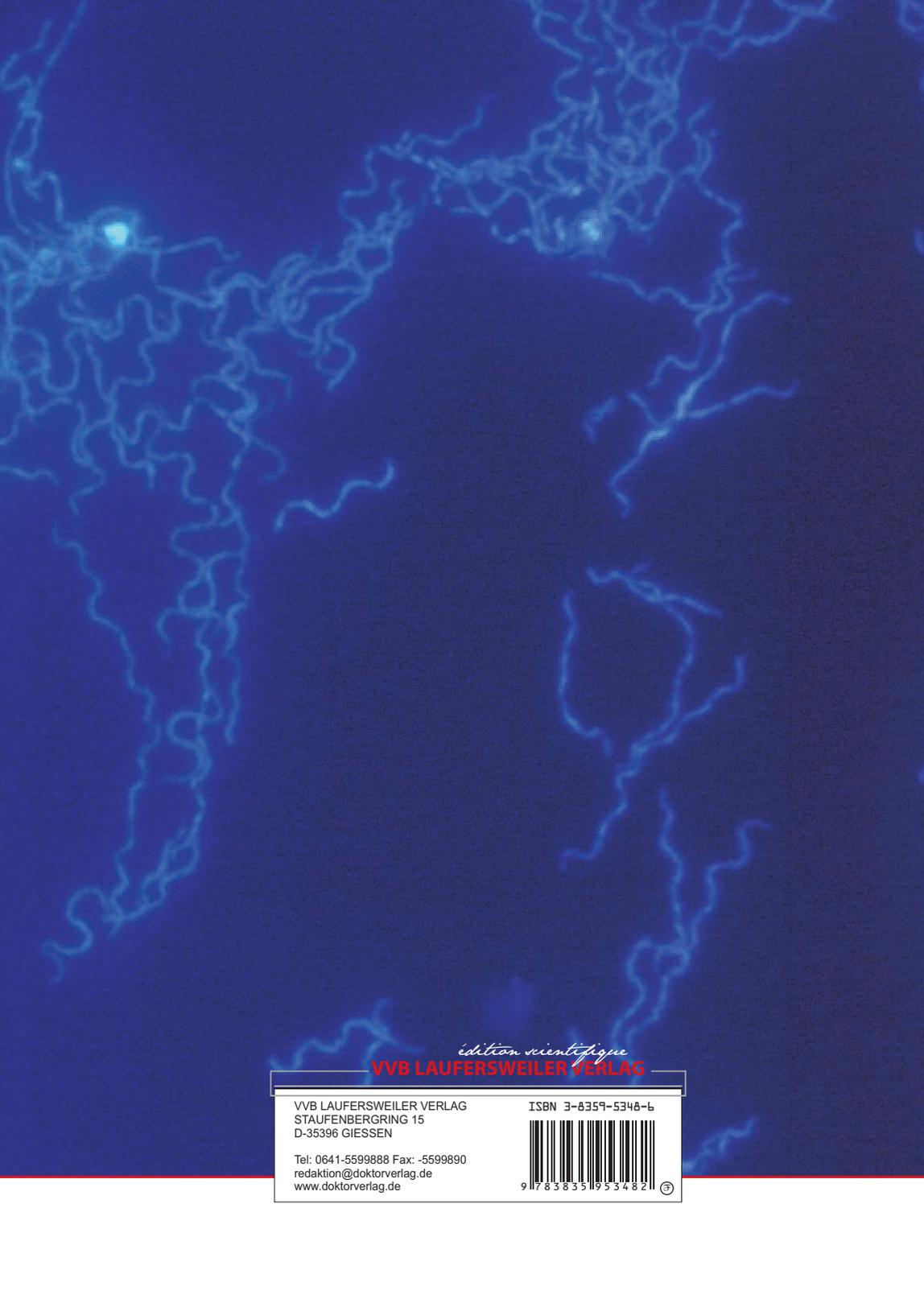
**Tabelle 41:** Abtötungskinetik des Stammes PC Eq 17 unter Einfluss von Doxycyclin, Anzahl der lebendigen Zellen pro Well zu einem bestimmten Zeitpunkt, Zahlen errechnet aus mittels konventioneller Zellzählung erhaltenen Werten.

Inkubation (h)	0	24	48	72	96	120
	Inokulum ( $10^6$ Zellen/Well)					
Doxycyclin $\mu\text{g/ml}$						
0,016	5,0	2,89	5,24	18,48	22,72	22,0
0,031	5,0	2,65	3,83	14,72	16,64	20,24
0,063	5,0	2,38	3,89	8,44	8,64	12,48
0,125	5,0	1,72	2,88	2,57	1,62	2,16
0,25	5,0	1,98	1,99	1,74	0,83	0,63
0,5	5,0	1,98	1,68	1,42	0,65	0,03
1	5,0	1,59	1,43	1,21	0,42	0
2	5,0	1,5	1,26	0,7	0,09	0
4	5,0	1,13	1,14	0,43	0,04	0
8	5,0	1,33	1,11	0,41	0	0
16	5,0	1,18	0,84	0,25	0	0
32	5,0	0,82	0,58	0,18	0	0
Wachstumskontrolle	5,0	4,4	8,18	15,92	20,0	23,84

**Tabelle 42:** Abtötungskinetik des Stammes PC Eq 17 unter Einfluss von Ceftriaxon, Anzahl der lebendigen Zellen pro Well zu einem bestimmten Zeitpunkt, Zahlen errechnet aus mittels konventioneller Zellzählung erhaltenen Werten.

Inkubation (h)	0	24	48	72	96	120
	Inokulum ( $10^6$ Zellen/Well)					
Ceftriaxon $\mu\text{g/ml}$						
0,004	5,0	3,63	9,18	18,32	25,52	22,32
0,008	5,0	3,92	6,82	14,92	20,64	22,72
0,016	5,0	4,2	4,16	2,98	2,29	1,98
0,031	5,0	2,17	1,71	1,18	0,24	0,08
0,063	5,0	2,01	1,48	0,7	0,08	0,04
0,125	5,0	1,54	1,05	0,36	0,04	0
0,25	5,0	1,01	0,65	0,22	0	0
0,5	5,0	1,1	0,52	0,06	0	0
1	5,0	0,92	0,37	0,03	0	0
2	5,0	0,79	0,24	0	0	0
4	5,0	0,86	0,21	0	0	0
8	5,0	0,72	0,17	0	0	0
Wachstumskontrolle	5,0	4,4	8,18	15,92	20,0	23,84

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



*édition scientifique*

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFBENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5348-6



9 783835 195348 2

