

**Aus dem Zentrum der Hygiene
des Fachbereichs Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main**

**Institut für Medizinische Mikrobiologie
und Krankenhaushygiene
Direktor: Prof. Dr. med. V. Brade**

**Untersuchungen zur *in vitro*-Empfindlichkeit
von *Borrelia burgdorferi* gegen
Ciprofloxacin, Sitafloxacin, Gemifloxacin, Cethromycin,
Doxycyclin und Ceftriaxon**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main**

**vorgelegt von
Elena Kekukh
Nowoalexandrowsk, Russland**

**Frankfurt am Main
2007**

Dekan:

Herr Prof. Dr. med. J. Pfeilschifter

Referent:

Herr Priv.-Doz. Dr. med. K.-P. Hunfeld

Korreferent:

Herr Prof. Dr. med. R. Kaufmann

Tag der mündlichen Prüfung:

02. September 2008

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Historischer Ausblick	1
1.2	Erreger der Lyme-Borreliose	2
1.3	Epidemiologie	3
1.4	Pathogenese	4
1.5	Klinische Symptome	5
1.6	Diagnostik	7
1.7	Therapie	9
1.8	Prävention und Prophylaxe	11
1.9	<i>In vitro</i> -Empfindlichkeitsprüfungen von <i>B. burgdorferi</i> gegen etablierte und neue antibiotische Substanzen	11
1.10	Zielsetzung der Arbeit	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Borrelien-Isolate	16
2.1.2	ATCC-Referenzstämme	17
2.1.3	Modifiziertes BSK-Medium zur Borrelienanzucht	17
2.1.4	Antibiotische Substanzen	18
2.2	Methoden	19
2.2.1	Kultivierung von Borrelien	19
2.2.2	Molekularbiologische Charakterisierung der eingesetzten Borrelien- Isolate mittels RFLP-Analyse von Amplifikaten der 5S-23S Region der rDNA	20
2.2.3	Prüfung von möglichen Interaktionen der getesteten Antibiotika mit BSK-Medium	21
2.2.4	Standardisierte <i>in vitro</i> -Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung von <i>B.</i> <i>burgdorferi</i>	22
2.2.5	MHK-Bestimmung	23
2.2.5.1	MHK-Bestimmung mittels kolorimetrischem Mikrodilutionsverfahren	23
2.2.5.2	MHK-Bestimmung mittels konventioneller Zellzählung	24
2.2.6	MBK-Bestimmung mittels konventioneller Subkultivierung in flüssigem BSK-Medium	24
2.2.7	Time-Kill-Kinetiken	25

2.2.8	Ermittlung von Bakterizidie-Indizes	26
2.2.9	Statistische Methoden	27
3	Ergebnisse	28
3.1	Genotypisierung der Borrelien-Isolate mittels RFLP Analyse der 5S-23S-rDNA-Region	28
3.2	MHK-, MBK-Bestimmung des Ketolids Cethromycin bei 17 Borrelien-Isolaten	29
3.3	Untersuchung möglicher Interaktionen von Antibiotika mit dem BSK-Medium	31
3.4	Ergebnisse der MHK-Bestimmungen von sechs Antibiotika bei drei <i>B. burgdorferi</i> Isolaten mittels konventioneller Zählung	33
3.5	Ergebnisse der MBK-Bestimmungen von sechs Antibiotika bei drei <i>B. burgdorferi</i> Isolaten	34
3.5.1	Konventionelle MBK-Bestimmung in Flüssigmedium (BSK)	34
3.5.2	Testung zu möglichen Einflüssen der Antibiotikaexpositionszeit auf die MBK- Ermittlung mittels konventioneller Subkultivierung in flüssigen BSK-Medium nach 72 h, 96 h und nach 120 h	35
3.6	Ergebnisse der Time-Kill-Experimente	36
3.7	Ermittlung von Bakterizidie-Indizes	46
3.8	Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung bei einem niedrigpassagierten Borrelien- Isolat	49
4	Diskussion	50
4.1	Methodische und technische Probleme bei der <i>in vitro</i> -Empfindlichkeitstestung von <i>B. burgdorferi</i> gegen klinisch bewährte und neu entwickelte Antibiotika	50
4.1.1	MHK-Bestimmung bei <i>B. burgdorferi</i>	52
4.1.2	Interaktion zwischen den getesteten Antibiotika und dem BSK-Medium	54
4.1.3	Einfluss des Inokulums auf die <i>in vitro</i> -Empfindlichkeitstestung von <i>B. burgdorferi</i>	55
4.1.4	Einfluss der Inkubationsdauer auf die <i>in vitro</i> -Empfindlichkeitstestung von <i>B. burgdorferi</i>	56
4.1.5	MBK-Bestimmung bei <i>B. burgdorferi</i>	57

4.1.6	Charakterisierung des Abtötungseffektes von Antibiotika auf <i>B. burgdorferi</i> mittels Time-Kill-Kinetik	59
4.1.7	Bakterizidie-Indizes bei <i>B. burgdorferi</i>	65
4.2	Standardisierte <i>in vitro</i> -Empfindlichkeitstestung von <i>B. burgdorferi</i> gegen klinisch bewährte und neu entwickelte Antibiotika – möglicher Wegweiser für neue therapeutische Optionen bei der Therapie der Lyme-Borreliose	67
4.2.1	<i>In vitro</i> -Empfindlichkeitstestung von <i>B. burgdorferi</i> gegen Cethromycin	68
4.2.2	<i>In vitro</i> -Empfindlichkeitstestung von <i>B. burgdorferi</i> gegen Fluorochinolone (Ciprofloxacin, Sitafoxacin, Gemifloxacin)	71
4.2.3	<i>In vitro</i> -Empfindlichkeitstestung von <i>B. burgdorferi</i> gegen Ceftriaxon	74
4.2.4	<i>In vitro</i> -Empfindlichkeitstestung von <i>B. burgdorferi</i> gegen Doxycyclin	76
4.2.5	Unterschiede in der Antibiotikaempfindlichkeit zwischen hoch- und niedrigpassagierten Borrelien-Isolaten	78
5	Zusammenfassung	80
6	Literaturverzeichnis	84
7	Anhang	92
8	Danksagung	95
9	Abkürzungsverzeichnis	96
10	Ehrenwörtliche Erklärung	98
11	Lebenslauf	99
12	Veröffentlichungen	100

1 Einleitung

1.1 Historischer Ausblick

Die Geschichte der Lyme-Borreliose ist durch die über die Jahre gewachsene Erkenntnis um die medizinische Vielgestaltigkeit der Krankheit geprägt. Vor der Erregeridentifikation wurde jedes Krankheitsbild als neue klinische Entität bezeichnet. Die ersten Fälle einer Borreliose mit diffuser Hautatrophie, der so genannten *Acrodermatitis chronica atrophicans* (ACA), wurden bereits 1883 von *Buchwald* und 1902 von *Herxheimer* publiziert. Das *Erythema migrans* (EM) nach Zeckenstich wurde 1909 von *Afzelius* und die *Lymphadenosis benigna cutis* 1943 von *Bäferstedt* beschrieben (Rahn, 2000). Über eine schmerzhafte Meningopolyneuritis und ein EM nach einem Zeckenstich wurde 1922 von *Garin und Bujadoux* sowie 1962 systematisch von *Schaltenbrand* berichtet. Die ausführlichste Beschreibung der Erkrankung erfolgte 1973 durch *Hörstrup und Ackermann*, die auch die Bezeichnung *Meningopolyneuritis Garin-Bujadoux-Bannwarth* propagierten. Auf die häufige Assoziation der ACA mit einer Polyneuropathie wurde 1966 und 1975 von *Hopf* hingewiesen (Kaiser, 1997; Satz, 2002). Die endgültige Aufklärung und Beschreibung der Lyme Borreliose als eigenständige klinische Entität erfolgte jedoch erst Anfang der 80er Jahre in den USA. Bei epidemiologischen Recherchen von Steere im Jahre 1975 in der Gemeinde Lyme (Connecticut, USA) war eine Häufung von Arthritiden nach Zeckenstich und EM aufgefallen (Steere et. al., 1983). Ergebnisse von epidemiologischen Studien über das Vorkommen von Schildzecken in den Regionen mit Lyme-Krankheit stärkten die Hypothese, dass Zecken als Vektoren dienen. Antibiotische Studien demonstrierten eine schnellere Ausheilung eines EM unter der Therapie mit Penicillin oder Tetracyclin. Diese Zusammenhänge stützten die Vermutung, dass ein durch Zecken übertragenes bakterielles Agens der Auslöser der Lyme-Borreliose sein könnte (Satz, 2002).

Die gemeinsame infektiöse Ätiologie zwischen der durch Zecken übertragenen amerikanischen Lyme-Erkrankung und den europäischen Krankheitsbildern konnte schließlich 1983 durch die Isolierung von *Borrelia (B.) burgdorferi* aus *Ixodes (I.) dammini* (alte Name: *I. scapularis*) (USA) und aus *I. ricinus* (Europa) aus Haut- und Gelenkbiopsaten, Blut und Liquor cerebrospinalis von amerikanischen und europäischen Patienten sowie durch die molekularbiologische Charakterisierung des Erregers geklärt werden (Burgdorfer et al., 1982; Pfister et al., 1984; Steere et al., 1983; Ackermann, 1983; Asbrink et al., 1984; Schmid et al., 1984). In der internationalen Literatur setzte sich bei dieser weltweit vorkommenden Infektionserkrankung mit multisystemischer Manifestation die Bezeichnung „Lyme-Borreliose“ durch (Satz, 2002).

1.2 Erreger der Lyme-Borreliose

B. burgdorferi sensu lato (s. l.) (Gattung: *Borrelia*, Familie: *Spirochaetaceae*) ist 10 - 30 µm lang und durchmisst 0,2 bis 0,3 µm. Bei den gramnegativen, spiralförmig gewundenen Bakterien lassen sich im Phasenkontrast- oder Dunkelfeldmikroskop 4 bis 12 helikale irreguläre Windungen darstellen. Die Zellwand besteht aus einer äußeren (2 bis 10 nm dicke, amorphe mukoide Schicht: S-Layer) und einer flexiblen, trilaminären inneren Membran, welche den Protoplasmazyylinder umgibt. Die für die rotierende Fortbewegung verantwortlichen 3 bis 18 Endoflagellen liegen im periplasmatischen Raum zwischen der äußeren und mittleren trilaminären Membran (Satz, 2002). Der Protoplasmazyylinder, umgeben von der inneren trilaminären Membran, enthält ein 910 kb großes lineares Chromosom. Die vorhandenen bis zu 20 linearen und zirkulären Plasmiden, die meistens nur in ein- bis zweifacher Kopienanzahl pro Zelle vorliegen und von denen einige als Mini-Chromosomen fungieren, kodieren wichtige Wirtsadaptations- und Virulenzfaktoren, Lipoproteine (Osp A-F, VlsE), Dekorin- und Fibronektin-bindende Proteine (Fraser et al., 1997).

Essenziell für das Borrelienwachstum sind langkettige Fettsäuren, Aminosäuren und Nukleotide. Borrelien lassen sich *in vitro* am besten in flüssigem, mit Aminosäuren und Vitaminen angereichertem, serumsupplementiertem Barbour-Stoenner-Kelly- (BSK) Medium bei einem Temperaturoptimum von 30-34°C unter mikroaerophilen Bedingungen kultivieren (Kraiczy et al., 1999). Auf Festnährböden benötigen Borrelien eine Bebrütungszeit von 2 bis 5 Wochen. Die kulturelle Anzucht ist nicht bei allen Borrelien-Isolaten erfolgreich (Hunfeld et al., 2002). Die wichtigste Energiequelle ist Glukose, die durch anaerobe Glykolyse hauptsächlich zu Laktat abgebaut wird. Die Generationszeit beträgt *in vitro* zwischen 7 und 20 Stunden (Kraiczy et al., 1999).

Mit dem auf OspA und OspC basierenden Serotypisierungssystem können die drei humanpathogenen Genospezies in 7 OspA- und 13 OspC- Serotypen unterteilt werden. Die Serotypen OspA 1 und OspC 1-4 entsprechen der Genospezies *B. burgdorferi* sensu stricto (s. s.), die Serotypen OspA 2 und OspC 5-8 entsprechen der Genospezies *B. afzelii* und die Serotypen OspA 3-7 und OspC 8-13 gehören der Genospezies *B. garinii* an (Wilske et al., 1993, 1995). Vor kurzem wurde eine neue humanpathogene Genospezies *B. spielmanii* beschrieben (Foldvari et al., 2005). Das humanpathogene Potenzial der anderen Borreliengenospezies (*B. andersonii*, *B. japonica*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. turdi*, *B. tanukii*, *B. bissettii*, *B. sinica*, *B. californiensis*) ist noch unklar (Wang et al., 1999; da Franca et al., 2005).

1.3 Epidemiologie

Die Verbreitung der Lyme-Borreliose korreliert gut mit dem Vorkommen der Hauptvektoren, den Schildzecken (Familie: *Ixodidae*) und erstreckt sich von der gemäßigten Klimazone der nördlichen Hemisphäre Nordamerikas über Europa bis nach Asien. In Deutschland kommt es jährlich schätzungsweise zu ca. 30.000-60.000 Neuerkrankungen (Schäfer et al., 1999). In Mitteleuropa fungiert *I. ricinus* als häufigster Vektor. *B. burgdorferi* wird in den Vereinigten Staaten durch *I. scapularis (dammini)* und *I. pacificus* und in Osteuropa und Asien durch *I. persulcatus* übertragen (Satz, 2002).

Für ihre Entwicklung sind Biotope mit gemäßigten Temperaturen und hoher Luftfeuchtigkeit ideal, womit die jahreszeitliche Häufung der Lyme-Borreliose (Stadium I) im Frühsommer und im Spätherbst zu erklären ist. Für jede Metamorphose, beim Weibchen auch für die Eiablage, benötigen die Zecken eine Blutmahlzeit, die bei Larven etwa 2 bis 4 Tage, bei Nymphen und bei adulten Weibchen 5 bis 9 Tage dauert. Die Hauptwirte der Larven und Nymphen sind kleine Säugetiere wie z. B. Mäuse, Vögel und Igel. Adulte Zecken befallen bevorzugt große Säugetiere wie z. B. Füchse, Rehe und Hirsche. Die größte Bedeutung für Krankheitsübertragungen beim Menschen haben Nymphen, die meistens spät oder gar nicht entdeckt und entfernt werden (Schäfer et al., 1999; Satz, 2002). Dank der Sezernierung von immunsupprimierenden Substanzen, die lokal eine Erregervermehrung und Ausbreitung fördern, ist der Zeckenstich schmerzlos und bleibt meistens unbemerkt (Montgomery et al., 2004).

Das Übertragungsrisiko hängt von der Durchseuchungsrate der Zecken mit *B. burgdorferi* ab. Diese wird für Larven mit ca. 1%, für Nymphen mit ca. 10% und für adulte Zecken mit ca. 20% angegeben (Wilske et al., 2000). Etwa 3-10 % der gesunden Normalbevölkerung und 15-30 % der beruflich exponierten Personen (z. B. Waldarbeiter) weisen erhöhte Antikörpertiter gegen *B. burgdorferi* im Serum auf (Wilske und Fingerle, 2000). Das Risiko, nach einem Zeckenstich an einer Lyme-Borreliose zu erkranken, ist mit ca. 1-5 % hingegen kleiner (Oschmann und Kaiser, 1999; Fahrer et al., 1998; Zhioua et al., 1998). Mit der Dauer des Saugaktes steigt das Übertragungsrisiko an, da eine Vermehrung und generalisierte Erregerdissemination in der Zecke durch Perforation des Zeckendarms durch die Borrelien zur Mittelmahlzeit stattfindet. Dies ermöglicht die Erregerübertragung durch die Speicheldrüsen (De Silva und Fikrig, 1995).

1.4 Pathogenese

Um Überleben und Übertragung von *B. burgdorferi* in Schildzecke und Säugetier zu ermöglichen, reagiert *B. burgdorferi* auf drastische ökologische Veränderungen in kürzester Zeit mit einer veränderten Proteinbiosynthese durch eine modifizierte Genexpression, die multifaktoriell reguliert wird.

Bei der Änderung von Temperatur, pH, Osmolarität und Nährstoffangebot (Saugakt) werden Hitzeschockproteine, OspE/F-verwandte Proteine und OspC vermehrt exprimiert sowie OspA zunehmend abgeschaltet. Dies ermöglicht eine Mobilisation der Spirochäten vom Mitteldarm in Richtung Speicheldrüse und schließlich zum Säugetierwirt. Eine temperaturabhängige Überexpression von VraA (virulent strain associated repetitive antigen A) und Dekorin-Bindungsproteine (DbpA und DbpB) könnte bei der Hautkolonisation eine Rolle spielen (Seshu und Skare, 2001).

In der Haut kommt es zunächst zu einer lokalen Ausbreitung der Erreger, später disseminieren die Spirochäten über den Blutweg und besiedeln verschiedene Organe, wo sie sich meistens in kleinen Gefäßen aufhalten. Unterstützend wirkt die Fähigkeit von *B. burgdorferi*, humanes Plasminogen und Urokinase-ähnliche Plasminogenaktivatoren an ihrer Oberfläche zu binden. Die potente Proteaseaktivität des aktivierten Plasminogens ermöglicht die Gewebeinvasion (Coleman et al., 1995). Borrelien parasitieren hauptsächlich extrazellulär. Der Erreger kann allerdings *in vitro* in kultivierten Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen überleben und ist fähig, ein einschichtiges Endothel zu penetrieren (Comstock und Thomas, 1989; Ma et al., 1991).

Im Laufe der Erkrankung erfolgt zuerst die ausgeprägte T-Zell-Antwort mit Erhöhung der NK-Zellen, Stimulierung der Lymphozyten und Bildung von lymphoplasmazellulären Infiltraten. Die Antikörperantwort auf *B. burgdorferi* entwickelt sich langsam. *B. burgdorferi* kann trotz einer aktiven Immunantwort bei untherapierten Patienten in bestimmten Nischen wie in Gelenken, Nervensystem und Haut überleben (Steere, 2000). Die Variabilität des hypervariablen VlsE Gens während der Borrelieninfektion trägt wahrscheinlich dazu bei, dass Borrelien über einen langen Zeitraum der adaptiven Immunabwehr entkommen (Seshu und Skare, 2001). Bei der chronischen Lyme arthritis kann neben einer Erregerpersistenz ein möglicher Autoimmunmechanismus durch ein so genanntes „molekulares Mimikry“ zwischen OspA und dem hLFA-1 α (human lymphocyte function antigen-1) in HLA-DR4-positiven Individuen induziert werden (Guerau-de-Arellano und Huber, 2002; Gross et al., 1998). Möglicherweise bilden Borrelien im Rahmen der Persistenz morphologisch atypische,

zystische Formen und Sphäroblasten-L-Phase-Varianten, um so eine Antibiotikatherapie der Infektion zu überstehen (Brorson und Brorson, 1998; Mursic et al., 1996).

Verschiedene Spezies von *B. burgdorferi* zeigen teilweise eine typische Organotropie und sind mit bestimmten klinischen Manifestationen der Lyme-Krankheit assoziiert. Die Lyme-arthritis, die hauptsächlich in den USA vorkommt, ist überwiegend mit *B. burgdorferi* s. s. -Infektionen assoziiert. Die Neuroborreliose, die häufiger in Europa auftritt, ist vorwiegend durch *B. garinii*-Infektionen bedingt. Am deutlichsten ist die Korrelation bei der ACA, bei der sich überwiegend *B. afzelii* findet. (Wang et al., 1999).

1.5 Klinische Symptome

Die Lyme-Borreliose verläuft als eine Multiorganerkrankung mit Befall von Haut, Bewegungsapparat, Nervensystem, Herz (Scheffold et al., 2000) und anderen Organen in mehreren Stadien ab (Tabelle 1.1).

Als Erstmanifestation entwickeln 85 % der Infizierten einige Tage bis wenige Wochen nach dem Zeckenstich ein EM. Bei der überwiegenden Zahl der symptomatisch erkrankten Personen verläuft die Borrelieninfektion selbstlimitierend und nur bei 10 bis 12 % schließen sich nach einigen Tagen bis Wochen nach dem Zeckenstich akute Organmanifestationen an. Auch dieses Stadium ist meist selbstlimitierend.

In seltenen Fällen kommt es nach Monaten (> 6 Monaten) bis zum Jahren zu chronisch inflammatorischen Prozessen der Haut sowie in einzelnen Gelenken oder im Nervensystem, die bleibende Schäden hinterlassen können. Alle Stadien können nacheinander durchlaufen, die Stadien 2 und 3 können aber auch unabhängig voneinander als selbstständige primäre Erkrankungen manifest werden (Wilske et al., 2000).

Es existiert keine eindeutige nosologische Definition für das Post-Lyme-Erkrankungssyndrom bei dem trotz einer vorausgegangenen antibiotischen Therapie andauernde Müdigkeit, Arthralgien, Myalgien oder Parästhesien bestehen (Schutzer und Natelson, 1999; Schutzer et al., 1999, Lin et al., 2000). Hierbei könnten sehr selten auch Koinfektionen mit anderen durch Zecken übertragenen Erregern, z. B. Ehrlichien, Babesien und vereinzelt das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus oder *Francisella tularensis* eine Rolle spielen (Wilske et al., 2000).

Tabelle 1.1: Stadieneinteilung und klinische Manifestationen (modifiziert nach Wilske et al., 2000).

Stadium I: lokalisierte Infektion	
Erythema migrans	schmerzlose, wandernde, scharf abgegrenzte Rötung, häufig mit zentraler Abblassung multiples Erythem und Allgemeinsymptome: Müdigkeit, Arthralgien, Kopfschmerzen, leichtes Fieber
Lymphadenosis cutis benigna	schmerzlose, livid-rötliche, polsterartige Schwellung im Bereich z. B. Ohrläppchen, Mamille; häufiger bei Kindern

Stadium II: akute Organmanifestation	
Neuroborreliose	lymphozytäre Meningo-Radikuloneuritis, wandernde, stechende Schmerzen, Missempfindungen, Lähmungen, besonders des N. facialis
Arthritis	wiederkehrende kurze Attacken, Gelenkschwellungen, diffuser Druckschmerz eines oder weniger großer Gelenke
Lyme-Karditis	AV-Block (II. - III. Grad), Rhythmusstörungen, Myokarditis oder Pankarditis
Ophthalmoborreliose	Chorioretinitis, Iridozyklitis, Keratitis, Augenmuskelparesen, Neuritis N. optici

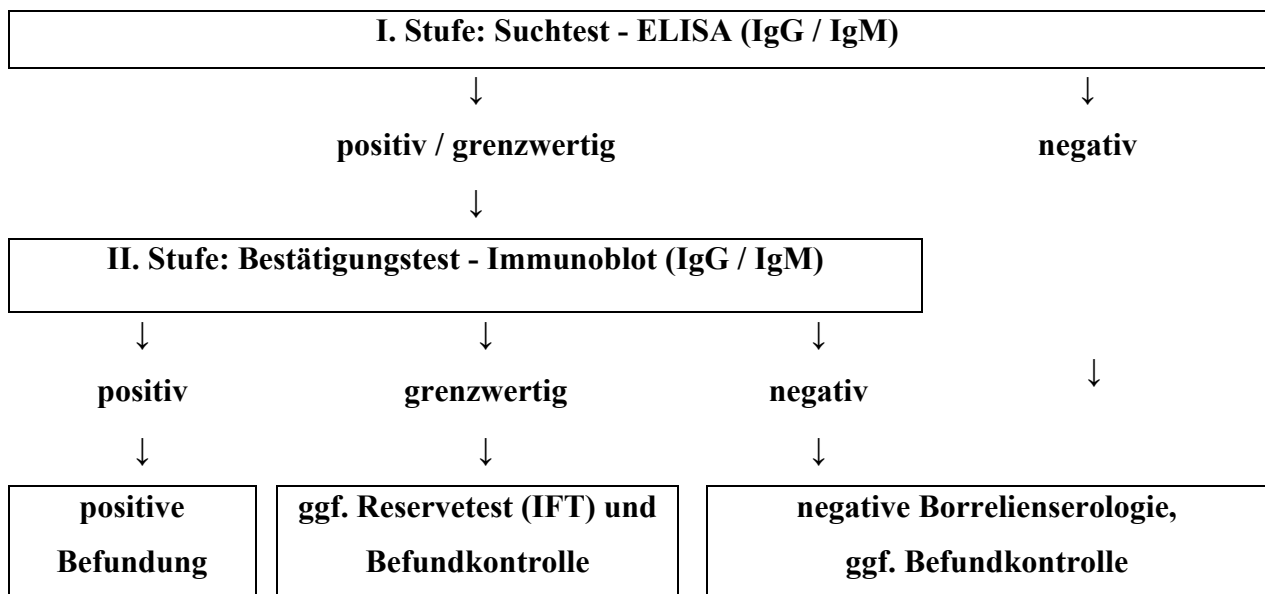
Stadium III: chronische Organmanifestation	
ACA	livide teigige Hautschwellungen die später atrophieren, gewöhnlich an den Streckseiten der Extremitäten, Missempfindungen
chronische Lyme-Arthritis	intermittierende oder chronische Episoden einer Mono-/ Oligoarthritis mit Gelenkserguss
chronische Neuroborreliose	progressive Enzephalomyelitis, Meningoenzephalitis, Radikulomyelitis, spastische Parese, Ataxien, hirnorganisches Psychosyndrom
Kardiomyopathie	dilatative Kardiomyopathie

1.6 Diagnostik

Für die Diagnostik der Lyme-Borreliose sind direkte und indirekte mikrobiologische Nachweisverfahren etabliert (Hunfeld et al., 1999).

Beim direkten Erregernachweis kann *B. burgdorferi* aus Biopsaten angezüchtet oder die erregerspezifische DNA mittels PCR nachgewiesen werden (Tabelle 1.2).

Der indirekte Erregernachweis gilt als standarddiagnostisches Verfahren und besteht aus zwei Stufen:



Die Sensitivität liegt im Frühstadium der Krankheit bei 30 bis 70 % und erreicht im Spätstadium nahezu 100 % (Wilske et al., 2000). Der Nachweis von IgM-Antikörpern gegen die Oberflächenproteine p22 (OspC) und p39 deutet auf eine frische Infektion hin. Der IgM-Titer kann aber auch über Jahre persistieren. Mit zunehmender Krankheitsdauer werden dann IgG-Antikörper gegen die Oberflächenproteine p83/100, p73, p66, OspA (p 31), OspB (p34), p39, p18 und p17 gebildet (Steere, 2000).

Bei der Neuroborreliose kann in den meisten Fällen die klinische Verdachtsdiagnose durch die Liquoranalyse zuverlässig bestätigt werden. Der Liquor zeigt typischerweise eine lymphozytäre Pleozytose mit zahlreichen Plasmazellen und aktivierten B-Lymphozyten sowie eine deutliche Schrankenstörung (erhöhter Albuminquotient, erhöhtes Gesamtprotein). Zusätzlich finden sich meist eine ausgeprägte, intrathekale IgM- und eine IgG-Synthese. Die Diagnose wird durch den Nachweis einer borrelienspezifischen, intrathekalen Antikörpersynthese mittels Bestimmung des Liquor-Serum-Antikörper-Indexes in einem am gleichen Tage gewonnenen Liquor-Serumpaar abgesichert (Hunfeld et al., 1999).

Hitzeschockproteine und das Flagellin von *B. burgdorferi* zeigen Kreuzreaktionen mit ähnlichen Antigenen von *Treponema pallidum*, mit anderen Borrelien (*B. hermsii*, *B. duttonii*) und mit Leptospiren (Hunfeld et al., 1999).

Anhand der üblichen serologischen Antikörperbestimmung (ELISA, IFT, Immunoblot) kann wegen der häufigen Antikörper-Titerpersistenz nicht sicher zwischen einer aktiven Infektion und einer ausgeheilten Infektion („Seronarbe“) unterschieden werden.

Tabelle 1.2: Spezielle Testverfahren bei der Lyme-Borreliose (modifiziert nach Wilske et al., 2000).

Klinik	Spezielle Testverfahren
EM	PCR (Sensitivität 50-70 %) Kultur aus Haut-Biopsien (Sensitivität 70-80 %)
LC	Histologie PCR Kultur aus Haut-Biopsien möglich
ACA	PCR (Sensitivität 50-70 %) Kultur aus Haut-Biopsien (Sensitivität 70-80 %)
Lyme-Arthritis	PCR (Sensitivität bis 90 %) Kultur aus Synovialis-Biopsie und / oder Synovia (Sensitivität ca. 1 %)
Lyme-Karditis	PCR und Kultur aus Endomyokard-Biopsie (Sensitivität: unklar)
Neuroborreliose	Liquor-Kultur (Sensitivität ca. 20 %) PCR (Sensitivität 10-30 %)

1.7 Therapie

Wie auch bei anderen bakteriellen Infektionen beeinflussen bei der Lyme-Borreliose verschiedene Faktoren den Therapieerfolg. Nicht nur die Empfindlichkeit von *B. burgdorferi* gegenüber dem verabreichten Antibiotikum, sondern auch dessen Penetration in das infizierte Gewebe, die Virulenz und lange Generationszeit des Erregers, die Menge des Inokulums, das Stadium der Erkrankung und nicht zuletzt die körpereigene Abwehr bestimmen den Erfolg. Trotz zahlreicher neuer Untersuchungen ist die Therapie der Lyme-Borreliose noch nicht abschließend etabliert und bedarf u. U. weiterer Modifikationen (Tabelle 1.3). Eine antibiotische Behandlung ist bei einem typischen klinischen Bild in jedem Falle indiziert. Dabei gilt: Je früher die Erkrankung therapiert wird, desto unwahrscheinlicher ist die Entwicklung von Spätmanifestationen. Dosierung, Dauer, Antibiotikum und Art der Anwendung richten sich nach dem klinischen Bild und dem Stadium der Erkrankung (Oschmann und Kaiser, 1999).

Tabelle 1.3: Stadien und symptomadaptierte Therapie der Lyme-Borreliose (modifiziert nach Satz, 2002).

Stadium	Medikament	Dosis/d	Form	Dauer/d
I	Doxycyclin*	2 x 100 mg	p. o.	14
	Amoxicillin	3 x 500mg-1g, (Kinder: 3 x 10 mg/kg KG)	p. o.	14
	Cefuroxim-axetil	2 x 500 mg	p. o.	14
II	Cefotaxim	3 x 2 g, (Kinder: 3 x 30 mg/kg KG)	i. v.	14-21
	Ceftriaxon	1 x 2 g, (Kinder: 60 mg/kg KG)	i. v.	14-21
	Doxycyclin*	2-3 x 100 mg	p. o.	21
III	Amoxicillin	3 x 500mg-1g, (Kinder: 3 x 10 mg/kg KG)	p. o.	21
	Ceftriaxon	1 x 2 g, (Kinder: 60 mg/kg KG)	i. v.	21
	Doxycyclin*	2 x 100 mg	p. o.	21-28

* nicht bei Schwangeren und Kindern unter 8 Jahren;
Makrolide gelten als Alternative bei β -Laktam-Allergie: z. B. Azithromycin 500 mg/d für 10 Tage.

Die häufigste Anwendung in der Therapie des EM findet Doxycyclin (Wormser et al., 2000). Die Therapie mit Doxycyclin bietet zudem folgenden Vorteil: Eine mögliche Koinfektion mit dem Erreger der humanen granulozytären Ehrlichiose wird mit abgedeckt.

Bei der Meningoradikuloneuritis tritt eine Schmerzlinderung sehr rasch auf. Die Therapie beschleunigt jedoch nicht unbedingt die Rückbildung eventuell bestehender Paresen. Bei Patienten mit späten neurologischen Manifestationen, z. B. Enzephalopathie oder Polyneuropathie, setzt ein Therapieerfolg oft erst nach sechs Monaten ein und bleibt infolge von Defektheilung häufig inkomplett (Wormser et al., 2000).

Bei der Lyme-Arthritis mit einer zuvor verabreichten intraartikulären Kortikosteroidtherapie erhöht sich die antibiotische Therapieversagerquote. Bei Patienten mit persistierender Arthritis nach suffizienter Therapie kommt eine symptomatische Therapie mit z. B. nichtsteroidalen Antirheumatika in Frage. Bei stärkeren Schmerzen und verminderter Gelenkfunktion muss u. U. eine arthroskopische Synovektomie in Erwägung gezogen werden (Cimmino et al., 1996).

Bei der ACA scheint eine längere Therapiedauer (21-28 Tage) eine besondere Bedeutung zu haben (Aberer et al., 1996). Die Effektivität einer antibiotischen Therapie ist oft schwierig zu beurteilen, da sich ein Ansprechen der Therapie nur im inflammatorischen Stadium in verminderter Hautschwellung bemerkbar macht, während atrophische Hautveränderungen jedoch weitgehend unbeeinflusst bleiben (Defektheilung).

Die Prognose der Lyme-Borreliose kann bei adäquater stadien- und symptomgerechter Therapie als sehr gut eingeschätzt werden. Mit einer Therapieresistenz ist im Stadium I und II in nur wenigen Fällen zu rechnen (Hunfeld et al., 2000c). Im Stadium III scheinen häufiger verzögerte Heilungen aufzutreten. Bei therapierefraktären Fällen im späten Krankheitsstadium wurde in der Literatur eine Intervalltherapie (1 x 4g Ceftriaxon einmal wöchentlich über zwölf Wochen) vorgeschlagen (Zorn et al., 1992) die aber bis heute als umstritten gilt und bislang nicht in größeren Studien evaluiert wurde. Bei ungenügendem Ansprechen der Therapie sollte aber in jedem Falle eine erneute Überprüfung der Diagnose stattfinden.

1.8 Prävention und Prophylaxe

Die Vermeidung der Exposition durch das Meiden von entsprechenden Biotopen und das Absuchen der Kleidung sowie des Körpers nach Zecken ist die wirksamste Prophylaxe gegen die Lyme-Borreliose. Repellents wie z. B. DEET sind gegen Zecken nur kurz wirksam (Wilske und Fingerle, 2000).

Da die Übertragung von *B. burgdorferi* mit der Länge des Saugaktes zunimmt, ist die rasche Entfernung der Zecken möglichst innerhalb von 24-48 h notwendig. In der Regel wird bisher in Europa wegen der unzureichenden Datenlage von einer generellen prophylaktischen Antibiotikatherapie nach Zeckenstich abgeraten.

Eine humane Impfung gegen Borreliose steht derzeit nicht zur Verfügung und wird nach bisherigem Kenntnisstand für Europa in absehbarer Zeit auch nicht verfügbar sein. In den USA war kurzzeitig eine kommerzielle OspA-Vakzine auf dem Markt, die jedoch inzwischen wegen möglicher Nebenwirkungen wieder zurückgezogen wurde. Das Wirkungsmechanismus von OspA-Vakzine kann folgendermaßen beschrieben werden: Bei der Blutmahlzeit an einem mit OspA immunisierten Wirt blockieren die aufgenommenen OspA-spezifischen Antikörper die Borrelientransmission von Vektor zu Wirt. (De Silva et al., 1996). Für die europäische Situation müsste wegen der im Vergleich zu Nordamerika größeren Heterogenität der Osp-Proteine der europäischen Genospezies eine sehr viel komplexere Vakzine entwickelt werden (Wilske und Fingerle, 2000). Weitere Impfstoffentwicklungen betreffen die Antigene OspC und DbpA (Kramer et al., 2000).

1.9 *In vitro*-Empfindlichkeitsprüfungen von *B. burgdorferi* gegen etablierte und neue antibiotische Substanzen

Die Prüfung der Erregerempfindlichkeit vor einer antibiotischen Behandlung der Lyme-Borreliose ist möglich, wird jedoch aufgrund der langen Generationszeit des Erregers (kulturelle Anzucht kann bis zu 8 Wochen dauern) und der technischen Aufwendigkeit (möglich nur in einem spezialisierten Labor, Durchführung einer Biopsie notwendig) nur selten durchgeführt. Die Beurteilung des Therapieerfolges wird häufig erschwert durch Unsicherheiten beim Auftreten von therapierefraktären Fällen und langandauernden Residualsyndromen (oft inkomplette Heilung im Spätstadium) bei Fehlen eines zuverlässigen Markers für den Therapieerfolg. Zudem existiert nur eine relativ geringe Zahl von randomisierten Studien, insbesondere zur Therapie im Spätstadium der Lyme-Borreliose.

Als optimal für die Therapie gelten β -Laktame (vor allem Ceftriaxon) und Tetracycline (Doxycyclin). Bei β -Laktam-Allergie und bei Kindern unter 9 Jahren (Tetracyclinkontraindikation) fehlen sichere Alternativen. *In vitro*-Experimente für die halbsynthetischen Makrolide Azithromycin und Clarithromycin erzielten gute Resultate (Preac-Mursic et al., 1989; Johnson et al., 1990b; Dever et al., 1993a). Bei den Makroliden sind allerdings Diskrepanzen zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Antibiotikaempfindlichkeit bei *B. burgdorferi* bekannt (Hansen et al., 1992). So treten bei Roxithromycin trotz günstiger pharmakokinetischen Eigenschaften, hoher Bioverfügbarkeit und Gewebepenetration sowie einer guten Empfindlichkeit *in vitro* rasch Rezidive ein (Hansen et al., 1992; Kekukh, persönliche Mitteilung). Es kann vorkommen, dass sehr gute *in vitro*-Ergebnisse durch Testumstände bedingt sind, welche nicht der *in vivo*-Situation beim Menschen entsprechen. Neu auf den Markt gekommene antimikrobielle Substanzen wie z. B. Ketolide (Makrolid-Abkömmlinge) und Fluorochinolone der 3. und 4. Generation wurden bislang nicht bezüglich ihrer möglichen Eignung für die Therapie der Lyme-Borreliose untersucht. Eine endgültige Entscheidung über den möglichen Einsatz solch neuer Antibiotika kann letztendlich nur nach ihrer Prüfung im Rahmen von klinischen Studien getroffen werden.

Wichtig ist es außerdem, mögliche Unterschiede in der Empfindlichkeit der drei humanpathogenen Genospezies *B. burgdorferi* s. s., *B. afzelii* und *B. garinii* sowie zwischen neuen Isolaten und laboradaptierten Stämmen zu berücksichtigen. Im Unterschied zu Baradaran-Dilmaghani und Stanek (1996) zeigen die differenzierten Experimente von Sicklinger et al. (2003), Preac-Mursic et al. (1996) und Hunfeld et al. (2000b) bei verschiedenen Antibiotika eine tendenziell bessere Empfindlichkeit von *B. garinii* im Vergleich zu den anderen Genospezies. Henneberg und Neubert (2002) finden bei den *B. burgdorferi* s. s.-Isolaten bezüglich MHK sowohl eine niedrigere Empfindlichkeit gegen Cephalosporine, Tetracycline und Ciprofloxacin, als auch eine erhöhte Empfindlichkeit gegen Erythromycin verglichen mit den *B. afzelii* und *B. garinii* Isolaten. Sicklinger et al. (2003) finden bei Doxycyclin keinen bemerkenswerten Unterschied in seiner Wirkung auf die drei Genospezies.

Zur Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung werden meistens laboradaptierte Stämme verwendet. Cinco et al. (1995) und Murgia et al. (1999) stellen in einer Vergleichsstudie mit den niedrig- und hochpassagierten Borrelien-Isolaten keinen signifikanten Unterschied in der Antibiotika-Empfindlichkeit fest. Weitere Untersuchungen mit neu isolierten Borrelien-Isolaten könnten die bisher vorliegenden Informationen über die Antibiotika-Empfindlichkeit vervollständigen.

In der Literatur beschriebene Testverfahren, Untersuchungsbedingungen und Kriterien für die Auswertung von MHK- und MBK-Bestimmungen für *B. burgdorferi* sind aufgrund mangelnder Standardisierung für langsam wachsende Bakterien nur bedingt miteinander vergleichbar (Hunfeld et al., 2002). Es ist daher von großer Bedeutung, ein standardisiertes Vorgehen bei der Empfindlichkeitsprüfung von *B. burgdorferi* zu etablieren.

Zur Anwendung kommt der Reihenverdünnungstest in flüssigem BSK-Medium (Boulliondilution) mit einem definierten Inokulum. Bei der Empfindlichkeitsprüfung von *B. burgdorferi* werden zumeist unterschiedliche Varianten von Mikro- und Makrodilutionsmethoden verwendet. Bei der Definition des Endpunktes benutzt der größte Teil der Autoren eine mikroskopische Auswertung. Die MHK-Definitionen variieren dabei sehr stark und reichen von „der niedrigsten Antibiotikakonzentration, bei der nicht mehr bewegliche Borrelien als im eingesetzten Inokulum vorliegen“ bis zu „der niedrigsten Antibiotikakonzentration, bei der keine beweglichen Borrelien mehr vorliegen“. Andere Autoren legen bei der makroskopischen und photometrischen Auswertung des MHK-Endpunktes einen Indikatorumschlag zugrunde. Die Inkubationsdauer reicht von 48 Stunden bis zu 21 Tagen und das Inokulum von 10^5 /ml bis 10^{10} /ml (Hunfeld et al., 2002). Die unterschiedliche Inkubationsdauer im BSK-Medium kann einen entscheidenden Einfluss auf die ermittelten Werte haben. Außerdem kann durch eine sehr lange Inkubationsdauer die Antibiotikastabilität im BSK-Medium beeinflusst werden.

Zum größten Teil sind sich die Autoren in der MBK-Definition einig: „Die niedrigste Antibiotikakonzentration, bei der in der Subkultur keine Borrelien entdeckt werden können“. Die inkubierten Borrelien sollten bei der Bestimmung der MBK in einem antibiotikafreien Medium subkultiviert werden. Dabei unterscheidet sich die Subkultivierungsdauer erheblich voneinander (Preac-Mursic et al., 1987; Luft et al., 1988; Johnson et al., 1990a; Agger et al., 1992; Hansen et al., 1992; Dever et al., 1992, 1999; Levin et al., 1993; Baradaran et al., 1996; Murgia et al., 1999; Hunfeld et al., 2002). Die meisten Autoren subkultivieren Borrelien in einem flüssigen Medium. Einige verwenden eine aufwendige „subsurface plating“-Methode: Borrelien werden dabei auf einem festen Nährboden ausplattiert und, um dann ein Austrocknen zu vermeiden, mit einer Schicht des noch flüssigen Agar-Mediums übergossen (Hunfeld et al., 2002). Bei der Überimpfung von antibiotikainkubierten Borrelien in das Subkulturmedium gelangt ein Teil der Antibiotika in die Subkultur. Durch die Verschleppung von Antibiotika in das Subkultivierungsmedium entsteht in der Subkultur eine Antibiotika-Verdünnung (Antibiotikakonzentration des Initialinokulums \times Verdünnungsfaktor). Die Restinhibition in der Subkultur zum Zeitpunkt der Untersuchung kann u. U. eine

Beeinflussung der MBK-Ergebnisse verursachen. Da anhand mehrerer experimentaler Studien Time-Kill-Untersuchungen im Vergleich zu MBKs eine bessere Korrelation zur Situation *in vivo* zeigen, ist es wichtig zu klären, ob diese Diskrepanz methodisch bedingt ist (CLSI, 1999).

Bei *in vitro*-Empfindlichkeitsuntersuchungen von neuen Antibiotika scheinen Abtötungskinetik-Studien besonders wichtig zu sein. Die MHKs, die nur die Hemmung der bakteriellen Vermehrung konstatieren, reflektieren nicht zwangsläufig die tatsächliche bakterizide Aktivität der Substanz. Die MBKs sind nur Ausdruck der initialen, bakteriziden Aktivität und nicht der Aktivität bei höheren Antibiotikakonzentrationen. Die Time-Kill-Kurven zeigen die Antibiotika-Abtötungsaktivität durch die messbare Inokulumreduktion bei bestimmten Antibiotikakonzentrationen über die Zeit. Um die Ergebnisse von Time-Kill-Studien effizienter zu nutzen und die Abtötungsaktivität von verschiedenen Antibiotika leichter vergleichen zu können, führte Morrissey (1997) bei den Untersuchungen der Abtötungsaktivität von Fluorochinolonen an den schnellwachsenden Bakterien einen so genannten Bakterizidie-Index (BI) ein. Das Abtötungspotenzial steigt dabei mit der Erhöhung des BI. Gleichzeitig reflektiert der BI das Abtötungspotenzial der klinisch relevanten Antibiotikakonzentrationen, da in der Berechnung des BI die maximal erreichbare Antibiotikakonzentration im Serum (C_{\max}) beim jeweiligen Antibiotikum berücksichtigt wird (Morrissey, 1997). Die Bestimmung von BIs könnte dabei eine zusätzliche Option bei der Beurteilung des bakteriziden Potenzials z.B. der verschiedenen Fluorochinolon-Antibiotika bei den Borrelien darstellen.

Bei Bakterien mit kurzer Generationszeit konnte eine Korrelation zwischen *in vitro* erhobenen MHK-Werten und den pharmakodynamischen Quotienten C_{\max}/MHK , AUC/MHK bei den Antibiotika mit konzentrationsabhängiger Wirkung oder $T_{>\text{MHK}}$ bei den Antibiotika mit zeitabhängiger Wirkung als eine Vorhersagemöglichkeit für eine *in vivo* bewiesene Antibiotikawirksamkeit aufgezeigt werden (Amsden et al., 2000). Bei Bakterien mit langer Generationszeit ist noch unklar, ob für diese Bakterien eine gleich gute Korrelation für die Vorhersage des Therapieerfolges gültig ist.

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorgelegten Untersuchungen sollten folgende wissenschaftliche Sachverhalte untersucht werden:

Zunächst sollte in einem ersten Schritt die *in vitro*-Empfindlichkeit von 17 repräsentativ ausgewählten Borrelienstämmen gegen ein neu entwickeltes Ketolid (Cethromycin) mittels eines neuen kolorimetrischen Mikrodilutionstestverfahrens bestimmt werden.

In einem zweiten Schritt sollten unter standardisierten Bedingungen Time-Kill-Untersuchungen über 120 Stunden sowie konventionelle MHK-Bestimmungen von Cethromycin, Ciprofloxacin und neu entwickelten Fluorochinolonen (Sitafloxacin und Gemifloxacin) bei *B. burgdorferi* vorgenommen werden, um diese neuen antibiotischen Substanzen hinsichtlich ihrer Aktivität mit klassischen, in der Borreliose-Therapie klinisch bewährten Antibiotika wie Doxycyclin und Ceftriaxon *in vitro* zu vergleichen.

Schließlich sollten in diesem Zusammenhang mögliche Interaktionen zwischen den getesteten Antibiotika und dem BSK-Medium untersucht werden, um so potenzielle Störfaktoren der *in vitro*-Empfindlichkeitstestung von Borrelien besser charakterisieren und einschätzen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Borrelien-Isolate

Insgesamt wurden 15 *B. burgdorferi* Isolate drei humanpathogenen Genospezies *B. afzelii* (5 Isolate), *B. garinii* (5 Isolate), *B. burgdorferi* s. s. (5 Isolate) sowie ein *B. valaisiana*-Isolat und ein *B. bissettii*-Isolat hinsichtlich ihrer Antibiotika-Empfindlichkeit untersucht (Tabelle 2.1). Für die beiden letztgenannten Genospezies konnte die Pathogenität für den Menschen bislang nicht eindeutig geklärt werden. Jeweils ein Isolat der drei humanpathogenen Borrelienspezies *B. afzelii* (EB 1), *B. garinii* (PSth) und *B. burgdorferi* s. s. (Pka-1) wurde in die Untersuchungen zur Abtötungskinetik eingeschlossen.

Tabelle 2.1: Stammkollektiv der untersuchten Borrelien-Isolate.

Isolat	Biologische Herkunft	Geographische Herkunft
EB 1	Haut (EM)	BRD
EB 2	Haut (EM)	BRD
FEM 1	Haut (EM)	BRD
FAC 3	Haut (ACA)	BRD
VS 461	Zecke	Schweiz
PSth	Hautbiopsie	BRD
PTrob	Hautbiopsie	BRD
ZQ 1	<i>I. ricinus</i>	BRD
JP 2	<i>I. persulcatus</i>	China
A 87S _B	Hautbiopsie	Niederlande
Pka-1	Liquor	BRD
B 31	<i>I. ricinus</i>	USA
LW 2	Hautbiopsie	BRD
Z 25	<i>I. ricinus</i>	BRD
297	Liquor	USA
VS 116	Zecke	Schweiz
25015	Zecke	USA

2.1.2 ATCC-Referenzstämme

Die Kontrolle der Methode sowie die Prüfung der Antibiotikum-Medium-Interaktion erfolgte abhängig von den getesteten Antibiotika mittels folgender ATCC-(*American Type Culture Collection*)-Referenzstämme: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 und *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

2.1.3 Modifiziertes BSK-Medium zur Borrelienanzucht

Als Nährmedium zur Anzucht aller verwendeten Borrelien-Isolate diente ein modifiziertes BSK-Medium (Preac-Mursic et al., 1986).

Zusammensetzung des Grundmediums:

HEPES	6,0 g/l
Neopepton	5,0 g/l
Na-Citrat	0,7 g/l
Glucose	5,0 g/l
Na-Bicarbonat	2,2 g/l
Na-Pyruvat	0,8 g/l
N-Acetylglucosamin	0,4 g/l

Die Substanzen des Grundmediums wurden in 800 ml Aqua demin. gelöst und mit 100 ml 10 x CMRL-Medium (Life Technologies) substituiert. Anschließend wurde der pH-Wert auf 7,6 mit 1 M NaOH eingestellt und die Lösung mit Aqua demin. auf 1l aufgefüllt. Nachfolgend wurde die Lösung mit einem 0,22 µm-Filter sterilfiltriert. Dieses Grundmedium ließ sich bei -20 °C für 3-4 Monate lagern.

Kulturmedium für Borrelien:

1000 ml	Grundmedium (sterilfiltriert)
200 ml	7% Gelatine (autoklaviert bei 121 °C für 20 min)
72 ml	Kaninchenserum, hitzeinaktiviert (56 °C für 30 min)
70 ml	Rinderserumalbumin, 35%ige Lösung (Sigma-Aldrich)

Das fertige Kulturmedium kann bei 4 °C für 3-4 Wochen gelagert werden. Für die Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung wurde als Stoffwechselaktivitätsindikator zusätzlich Phenolrotlösung zugegeben. Für diesen Zweck wurde zuerst eine gesättigte, sterilfiltrierte Phenolrot-Stammlösung hergestellt: 60 mg Phenolrot-Pulver in 50 ml BSK-Medium. 3,6 ml der Phenolrot-Stammlösung wurden 45 ml BSK-Medium zugeführt. Die photometrisch bestimmte initiale optische Dichte (OD) des BSK-Mediums wurde dabei auf 0,2 OD eingestellt.

2.1.4 Antibiotische Substanzen

Die Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung o. g. Borrelien-Isolate wurde an insgesamt vier Antibiotika-Klassen vorgenommen: Tetracycline, Cephalosporine, Ketolide und Fluorochinolone (Tabelle 2.2). Bei den Fluorochinolonen erfolgte die Empfindlichkeitsprüfung zum einen bei dem Klasse II-Fluorochinolon Ciprofloxacin, zum anderen an Sitafoxacin und Gemifloxacin, zwei neuen Klasse IV-Fluorochinolonen mit erweitertem Wirkungsspektrum.

Ein neues, halbsynthetisches Ketolid-Antibiotikum (ein 3-Keto-Makrolid als Abkömmling von Erythromycin A), Cethromycin, wurde in die erweiterte Empfindlichkeitsprüfung (gegen insgesamt 17 Borrelien-Isolaten) eingeschlossen. In der Untersuchung wurden zur Qualitätskontrolle der *in vitro*-Experimente auch Doxycyclin und Ceftriaxon als Vergleichssubstanzen eingeschlossen, da diese beiden als am häufigsten eingesetzte Substanzen bei Borreliose eine bekannte klinisch gesicherte Aktivität gegen Borrelien aufweisen.

Tabelle 2.2: Getestete antibiotische Substanzen

Substanz	Klasse	Konzentration µg/ml	Produzierende Firmen
Ciprofloxacin	Fluorochinolon II ¹	0,008-16	Bayer Vital
Sitafoxacin	Fluorochinolon IV ¹	0,008-16	Daiichi Pharmaceutical Co.
Gemifloxacin	Fluorochinolon IV ¹	0,008-16	GlaxoSmithKline
Cethromycin	Ketolid	0,002-2	Abbot
Doxycyclin	Tetracyclin	0,016-32	Ratiopharm
Ceftriaxon	Cephalosporin	0,016-32	Roche

¹ Die Klasseneinteilung der Fluorochinolone erfolgt auf der Grundlage des Wirkspektrums, der Pharmakokinetik und der Indikationen nach Naber und Adam, (1998).

Die getesteten Antibiotika wurden von der Firma Merlin-Diagnostika GmbH, Bornheim-Hersel, Deutschland in geometrischen Verdünnungsreihen in lyophilisiertem Zustand im 96-Mikrotiterplattenformat produziert. Das Endvolumen des jeweiligen Antibiotikums wurde durch Zugabe von 200 µl der auf $2,5 \times 10^7$ Borrelien/ml eingestellten BSK-Mediumsuspension in jeder Mikrotiterplatte-Vertiefung erreicht.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Borrelien

Die Borrelien-Isolate aus dem Stammkollektiv (Kapitel 2.1.1) wurden in modifiziertem BSK-Medium (Preac-Mursic et al., 1986) kultiviert. Zum Animpfen einer primären Flüssigkultur wurden 2-3 Aliquots (1,5 ml) einer bei -80 °C eingefrorenen Borrelienkultur in 7 ml Medium suspendiert. Nach 5 Tagen Inkubation bei 33 °C unter 5% CO₂ Atmosphäre wurden 3 ml aus der Kultur entnommen. Diese wurde mit einem gleichen Volumen von frischem BSK-Medium versetzt. Diese Prozedur wurde so lange wiederholt bis ca. 1×10^8 vitale Zellen/ml angewachsen waren und ein korrespondierender Farbumschlag von rot nach gelb nach etwa 3 bis 4 Tagen zu erkennen war. Die anschließende Kultivierung (Passagieren) erfolgte durch Animpfen von 0,5 - 1 ml einer bis zur spätlogarithmischen Phase gewachsenen Borrelienkultur in 10 ml BSK-Medium.

Für die Untersuchungen wurden in der Regel Kulturen verwendet, die nicht öfter als 15mal passagiert wurden. In Abständen von 2 bis 3 Passagen wurden die Zellen auf ihre Vitalität und Motilität sowie auf Kontaminationen im Dunkelfeldmikroskop (Zeiss Standard 25 mit Dunkelfeldkondensator) überprüft. Eine Ausnahme bildete ein frisch angezüchtetes Hautisolat aus der diagnostischen Routine (*B. afzelii* FAC 3). Dieses Isolat wurde direkt nach der Isolation in der 2. und 3. Passage zur Untersuchung eingesetzt.

2.2.2 Molekularbiologische Charakterisierung der eingesetzten Borrelien-Isolate mittels RFLP-Analyse von Amplifikaten der 5S-23S Region der rDNA

Zur molekularbiologischen Typisierung der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Borrelien-Isolaten wurde eine Restriktionsanalyse von 5S-23S rDNA-PCR-Fragmenten nach *MseI*-Verdau (Postic et al., 1994) angewendet.

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR wurde DNA aus Borrelien mittels QIAquick® DNA Extraction Kit, Qiagen aufgereinigt. Der Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 100 µl) bestand aus 100 ng Borrelien-DNA, 10 µl 10 x PCR-Puffer, 5 µl MgCl₂, 200 µM dNTPs, 100 pmol der beiden Oligonukleotide und 0,5 µl Taq DNA-Polymerase (1 U/µl) (Life Technologies). Jeder Zyklus startete mit einer Denaturierung von 5 min bei 95 °C. Insgesamt wurden 30 Zyklen durchlaufen, wobei für den letzten Zyklus eine Extensionszeit von 10 min definiert wurde. Die einzelnen PCR-Reaktionsschritte bestanden aus folgenden Parametern: Denaturierung 94 °C, 1 min, Annealing 52 °C, 1 min, Extension 72°C, 2 min. Für die Amplifikation mittels PCR wurde ein Thermocycler 2400 (Applied Biosystems) verwendet.

Nach Beendigung der PCR wurden die Reaktionen mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert und anschließend durch Zugabe von 0,1 Volumen (v/v) 3M Natriumacetat-Lösung und mit 2,5 Volumen (v/v) Ethanol präzipitiert. Der gesamte PCR-Ansatz wurde zunächst mit dem Restriktionsenzym *MseI* behandelt (pro Probe: 15 µl DNA und 15 µl Mischung aus 11,2 µl a. d., 3 µl NEB₂ 10 x Puffer, 0,3 µl 100 x BSA und 0,5 µl *MseI* (10 U/µl), im Termomixer 3 h bei 37°C) und die fragmentierten PCR-Amplifikate wurden elektrophoretisch in einem 2 %-igen Agarosegel (2g Agarose NEEO in 100 ml 0,5 x TBE, bei 150 V) analysiert (Kraiczky, 2002).

2.2.3 Prüfung von möglichen Interaktionen der getesteten Antibiotika mit BSK-Medium

Alle sechs getesteten Antibiotika wurden auf mögliche Interaktionen mit dem Wachstumsmedium BSK getestet (CLSI, 2003). Dies erfolgte mittels MHK-Bestimmung von zwei Referenzstämmen: *S. aureus* ATCC 29213 und *E. faecalis* ATCC 29212.

Mit Hilfe einer sterilen Öse wurden mehrere Einzelkolonien einer 18-24 Stunden alten Kultur vom Agar abgenommen. Die Kolonien wurden in NaCl homogenisiert, bis die Trübung einem McFarland von 0,5 entsprach. Für die Prüfung der Antibiotika-Interaktion mit dem BSK-Medium nach 0 h wurde eine Verdünnung von 1:110 im BSK-Medium erstellt.

Die Antibiotika-Testplatten wurden je Vertiefung mit 200 µl des vorbereiteten Inokulums beimpft und 18-24 h bei 37 °C inkubiert. Zur Wachstumskontrolle wurde die Bakteriensuspension in eine antibiotikafreie Mikrotiterplatte eingeimpft und bei identischen Bedingungen inkubiert. Die niedrigste Antibiotikakonzentration, bei der kein makroskopisch sichtbares Wachstum oder Indikatorumschlag der Referenzstäme nach 18-24 h vorlag, galt als MHK.

Zur Prüfung der Antibiotika-Interaktion mit BSK-Medium nach 72 h und 120 h wurden die Antibiotika-Testplatten zuvor mit BSK-Medium für 72 h bzw. 120 h bei 33 °C und bei 5 % CO₂ vorinkubiert. In diese vorinkubierten Antibiotika-Testplatten wurden dann nach 72 h bzw. 120 h 1,8 µl (Verdünnung 1:110) auf 0,5 McFarland eingestellte Koloniesuspension je Vertiefung zugegeben. Die MHKs wurden makroskopisch nach 18-24 h der Inkubation bei 37 °C abgelesen. Die Testungen wurden jeweils als Doppelbestimmung vorgenommen und als Mittelwert berichtet.

2.2.4 Standardisierte *in vitro*-Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung von *B. burgdorferi*

Die Testdurchführung erfolgte grundsätzlich mit vitalen Borrelienzellen aus der logarithmischen Wachstumsphase. Vor jedem Ansatz wurden die Borrelien-Isolate im Dunkelfeld-Mikroskop auf mögliche Kontamination geprüft.

Die Kulturen wurden 30 min bei 5000 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium abgegossen und das Bakterien-Sediment in 500 µl BSK-Medium resuspendiert. Mit 20 µl dieser resuspendierten Borrelien-Kultur wurde eine Verdünnungsreihe mit PBS (Phosphat-Pufferlösung: Na₂HPO₄ x 2 H₂O 9,45 ml; KH₂PO₄ 5,55 ml; A. bidest. 85 ml) erstellt, um eine optimale Zählung im Dunkelfeld-Mikroskop zu ermöglichen.

Die Anzahl der Borrelien pro ml in der resuspendierten Borrelien-Kultur wurde durch das Zählen der motilen Borrelien in einer KOVA-Zählkammer (Hycor, Garden Grove, USA) im Dunkelfeld-Mikroskop (Zeiss, Vergrößerung: 400fach) nach folgender Formel ermittelt:

$$\begin{aligned} \text{Borrelien pro ml} = & \text{Borrelienzahl im Quadrant (9 kleinste Quadranten)} \\ & \times \text{Kammerfaktor (10)} \\ & \times \text{Verdünnung.} \end{aligned}$$

Für alle Untersuchungen wurden die Borrelien-Isolate auf exakt $2,5 \times 10^7$ Borrelien pro ml BSK-Medium mit dem Wachstumsindikator Phenolrot eingestellt (Hunfeld et al., 2000a; 2000b). Alle Untersuchungen wurden in den Mikrotiterplatten mit geometrisch verdünnten, lyophilisierten Antibiotika durchgeführt. Das Endvolumen des jeweiligen Antibiotikums wurde durch Zugabe in jede Mikrotiterplatte-Vertiefung von 200 µl eingestellter Borreliensuspension erreicht. Zur Wachstumskontrolle erfolgte das Einimpfen der Borreliensuspension in eine antibiotikafreie Mikrotiterplatte. Die Mikrotiterplatten wurden luftdicht mit steriler adhäsiver Folie verschlossen und bei 33°C mit 5% CO₂ inkubiert.

2.2.5 MHK-Bestimmung

2.2.5.1 MHK-Bestimmung mittels kolorimetrischem Mikrodilutionsverfahren

Das kolorimetrische Testsystem basiert auf der Eigenschaft, dass aktive, metabolisierende Borrelien nichtflüchtige Säuren produzieren, die im Medium akkumulieren. Der durch die Herabsenkung des pH-Wertes resultierende Farbumschlag des im Medium zugesetzten Indikators Phenolrot von rot nach gelb kann photometrisch mittels ELISA-Reader bei 562/630 nm als OD-Reduktion bestimmt werden (Hunfeld et al., 2000a).

Für das kolorimetrische Mikrodilutionsverfahren wurden die Antibiotika-Mikrotiterplatten je Vertiefung mit 200 µl Borreliensuspension beimpft. Die Platten wurden dann bei 33 °C mit 5% CO₂ bis zu 72 Stunden (Kapitel 2.2.4) inkubiert. Die Extinktionswerte wurden photometrisch zu Beginn der Inkubation (E_{t_0}), nach 24 h ($E_{t_{24}}$), nach 48 h ($E_{t_{48}}$) und schließlich nach 72 h ($E_{t_{72}}$) bei 565 / 630 nm in einem ELISA-Reader (PowerWave 200, BIO-TEK Instruments) gemessen. Die Wachstumskinetiken wurden mit Hilfe eines computergestützten Programmes (Mikrowin, Version 3.0, Mikrotek) erstellt. Das Wachstum in Proben und in Kontrollen wurde für jede Mikrotiterplatte-Vertiefung basierend auf die Verminderung der Absorption nach 72 h ($E_{t_{72}}$) im Vergleich zur initialen Absorption (E_{t_0}) gemessen. Eine signifikante Extinktionsänderung mathematisch errechnet als $E_{t_{72}} < E_{t_0}$ minus 5 % spricht für das Vorliegen von Borrelienwachstum (Hunfeld et al., 2000a).

Die niedrigste Antibiotikakonzentration, bei der kein photometrisch messbares Wachstum den Borrelien nach 72 h vorlag, wurde als MHK interpretiert. Die MHK₅₀ wurde festgelegt als niedrigste Antibiotikakonzentration, bei der eine Wachstumshemmung bei 50 % der Borrelien-Isolate vorlag; analog wurde die MHK₉₀ als niedrigste Antibiotikakonzentration festgelegt, bei der Wachstumshemmung bei 90 % der Borrelien-Isolate nachweisbar war (Hunfeld et al., 2000a). Die Testungen wurden jeweils als Doppelbestimmung vorgenommen und als Mittelwert berichtet.

2.2.5.2 MHK-Bestimmung mittels konventioneller Zellzählung

Im Rahmen der Abtötungsexperimente (Kapitel 2.2.7) wurde die niedrigste Antibiotikakonzentration als MHK ermittelt, in der die Anzahl an beweglichen Borrelien im Zeitraum bis mindestens 72 h der Zell-Kultivierung nicht größer war als im Inokulum (Kraiczy et al., 2001).

2.2.6 MBK-Bestimmung mittels konventioneller Subkultivierung in flüssigem BSK-Medium

Zur Bestimmung der MBK wurden antibiotikaexponierte Borrelien aus der Vertiefung entsprechend der MHK sowie aus den Vertiefungen mit den nächsthöheren Antibiotikakonzentrationen nach 72 h in frisches BSK-Medium überimpft und bei 33 °C mit 5 % CO₂ bis zu 21 Tage subkultiviert (Hunfeld et al., 2000b). Bei den Ansätzen wurden jeweils 18 µl Medium mit antibiotikaexponierten Borrelien aus den Mikrotiterplatte-Vertiefungen in 1332 µl frisches Medium (Verdünnung 1:75) überimpft. Dabei war es wichtig, dass die Antibiotikakonzentration in der Subkultur unterhalb der jeweiligen MHK liegt. Für diesen Zweck wurden bei Cethromycin noch höhere Verdünnung 1:1000 angewendet. Dabei wurde jeweils 2 µl Medium mit Cethromycin-exponierten Borrelien aus jeder Mikrotiterplatte-Vertiefung in 1998 µl frisches BSK-Medium zur Subkultivierung überimpft.

Zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Antibiotika-Inkubationszeiten auf die konventionelle MBK-Bestimmung bei Borrelien wurden Subkulturexperimente auch nach 96 h und nach 120 h durchgeführt.

Die Subkulturen wurden nach 21 Tagen mit Hilfe des Dunkelfeld-Mikroskops (5-10 Gesichtsfelder) auf das Vorhandensein intakter, beweglicher Borrelien untersucht.

Als MBK einer Testsubstanz galt die niedrigste Antibiotikakonzentration, die notwendig war, um die Borrelien vollständig abzutöten, d. h., nach 21 Subkultivierungstagen in der Subkultur waren dann keine Borrelien nachweisbar. Die MBK₅₀ wurde die niedrigste Antibiotikakonzentration angenommen, bei der kein Wachstum bei 50 % der subkultivierten Borrelien-Isolate vorlag. Die MBK₉₀ wurde entsprechend definiert als die niedrigste Antibiotikakonzentration, bei der kein Wachstum bei 90 % der subkultivierten Borrelien-Isolate vorlag. Die Testungen wurden jeweils als Doppelbestimmung vorgenommen und als Mittelwert berichtet.

2.2.7 Time-Kill-Kinetiken

Für die Time-Kill-Kinetik wurden Polysterol-Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen beschichtet mit geometrisch verdünnten, lyophilisierten Antibiotika verwendet. Dann wurden pro Mikrotiterplattenvertiefung je 200 μl der auf $2,5 \times 10^7$ Borrelien pro ml eingestellte BSK-Mediumsuspension verimpft und bei 33°C mit 5% CO_2 bis zu 120 h (Kapitel 2.2.4) inkubiert (Kraiczy et al., 2001).

In jeder Mikrotiterplatte-Vertiefung wurde die Anzahl der antibiotikaexponierten Borrelien pro ml durch das Zählen der motilen Borrelien in einer KOVA-Zählkammer (Hycor, Garden Grove, USA) im Dunkelfeldmikroskop (Zeiss, Vergrößerung: 400fach) nach 48 h, 72 h, 96 h und 120 h Antibiotikaexposition nach folgender Formel ermittelt: Borrelien / ml = Borrelienzahl in Quadrant (9 kleinste Quadranten) x Kammerfaktor (10) x Verdünnung. Als Kriterium für Beweglichkeit galt dabei der Nachweis der charakteristischen schlängelnden oder schraubenartigen progressiven Fortbewegung entlang der Längsachse. Um eine optimale Zählung im Dunkelfeldmikroskop zu ermöglichen, wurden die antibiotikaexponierten Borrelien aus den Mikrotiterplatte-Vertiefungen mit PBS-Puffer in Polyesterröhrchen verdünnt. Pro Zählungstag wurde je eine Antibiotika-Mikrotiter-Platte benötigt, sodass pro Untersuchung mindestens vier Antibiotika-Mikrotiterplatten sowie vier antibiotikafreie Wachstumskontroll-Platten verwendet wurden.

Die jeweils ermittelte Borrelienzahl erlaubte die grafische Darstellung der Abtötungskinetik als \log_{10} der Borrelienzahl pro ml auf der Ordinatenachse (y-Achse) gegen die Zeit oder auch gegen die Antibiotikakonzentration auf der Abszissenachse (x-Achse). Mit Hilfe der so ermittelten Absterbekurven wurden die Antibiotikakonzentrationen bestimmt, die eine Abnahme der Borrelienzahl um $\geq 3 \log_{10}$ -Stufen (99,9 % Borrelienreduktion) gegenüber der initial vorliegenden Borrelienzahl innerhalb der Untersuchungszeit bewirkten. Des Weiteren wurden auch die Antibiotikakonzentrationen ermittelt, bei denen keine beweglichen Borrelien mehr nachweisbar waren.

Da die Borrelienzahl in jeder Mikrotiterplatte-Vertiefung ermittelt wurde, konnte im Rahmen der Abtötungsexperimente die MHK ebenfalls mithilfe der konventionellen Zählung festgestellt werden (Kapitel 2.2.5.2). Die Testungen wurden jeweils als Doppelbestimmung vorgenommen und als Mittelwert berichtet.

2.2.8 Ermittlung von Bakterizidie-Indizes

Zur besseren Beurteilung und Vergleichbarkeit der bakteriziden Wirksamkeit von sechs getesteten Antibiotika gegen die drei humanpathogene Borrelienspezies *B. afzelii* EB 1, *B. garinii* PSth und *B. burgdorferi* s. s. Pka-1 wurde der BI nach Morrissey, (1997), ermittelt. Der BI wurde als Berechnung der grafisch dargestellten Fläche unter dem „bakteriziden Teil“ der Kurve (AUC) ermittelt (Abbildung 2.1):

y-Achse: \log_{10} -Borrelienreduktion,

x-Achse: \log_{10} -Antibiotikakonzentration, bis zur \log_{10} - C_{\max} .

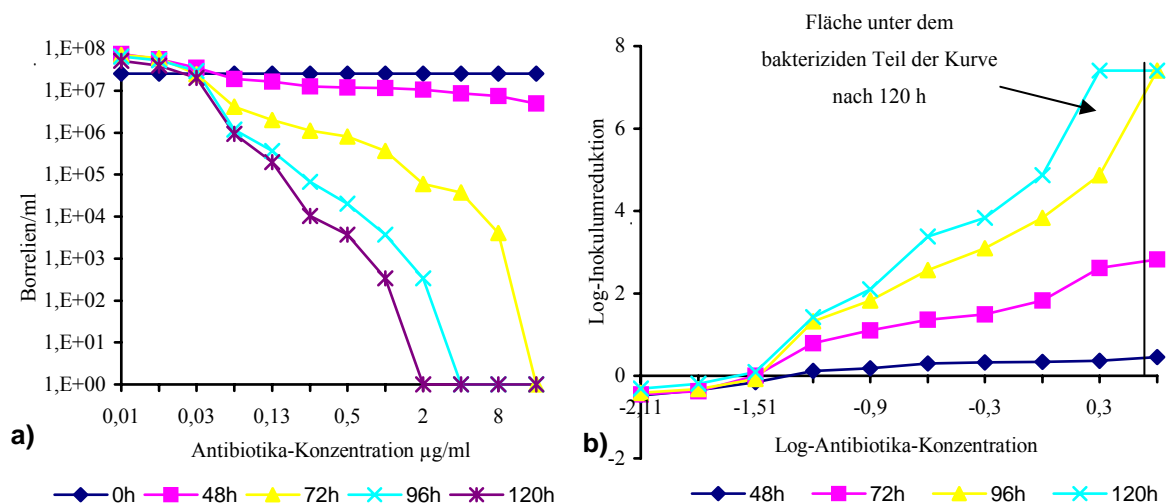


Abbildung 2.1. (a) schematische Darstellung von Antibiotika-Abtötungskinetik nach 48 h, 72 h, 96 h und 120 h Inkubation;

(b) Anwendung der Abtötungskinetik für Errechnung von Bakterizidie-Index, als Fläche unter den Kurven (\log_{10} der Inokulumreduktion gegen \log_{10} der Antibiotikakonzentration).

Die C_{\max} der untersuchten Antibiotika wurden aus der Literatur übernommen (Tabelle 2.3). Die Borrelienreduktion wurde durch die Ermittlung der Borrelienzahl pro ml in jeder Mikrotiterplatte-Vertiefung der geometrisch verdünnten Antibiotikareihe nach 48 h, 72 h, 96 h und 120 h Antibiotikaexposition festgestellt (Time-Kill-Kinetik 2.2.7). Die Fläche-Berechnungen erfolgten im GraphPad Prism Version 4.00 für Windows, GraphPad Software, San Diego California USA (www.graphpad.com). Der errechnete BI hat eine positive Korrelation mit der Größe der Fläche unter dem bakteriziden Teil der Kurve.

Der BI erlaubt eine Aussage über das bakterizide Potenzial eines Antibiotikums durch das einfache Vergleichen des BI verschiedener Antibiotika. Der BI reflektiert zugleich das

Abtötungspotenzial klinisch relevanter Antibiotikakonzentrationen, da in der Berechnung der BIs die maximal erreichbare Antibiotikakonzentration im Serum (C_{\max}) beim jeweiligen Antibiotikum eingeschlossen wurde (Morrissey, 1997).

Tabelle 2.3: Pharmakokinetische Daten der getesteten Antibiotikasubstanzen aus der Literatur

Antibiotikum	Dosis	C_{\max} µg/ml	AUC µg/ml·h	$T_{1/2}$ h	Protein- Bindung	Referenz
Ciprofloxacin	750 mg p. o.	3,8	16,8	6,4	30 %	Lettieri et al., 1992
Sitafloxacin	200 mg p. o.	1,8	12,3	1,0	n	Nakashima et al., 1995
Sitafloxacin	500 mg p. o.	4,9	29,4	n	n	Woodnutt, 2000
Gemifloxacin	320 mg p. o.	1,48	9,82	6,6	n	Allen et al., 2000
Gemifloxacin	600 mg p. o.	3,86	24,4	8,3	n	Allen et al., 2000
Cethromycin	200 mg p. o.	0,18	0,8	1,5	n	Pradhan et al., 2000
Cethromycin	400 mg p. o.	0,6	3,8	2,3	n	Pradhan et al., 2000
Doxycyclin	200 mg p. o.	3,6	56,47	16	96 %	Balogh et al., 1991
Ceftriaxon	2 g i. v.	250	n	8	95 %	Karchmer, 2000

n Daten nicht vorhanden

2.2.9 Statistische Methoden

Die Abweichung von plus/minus einer Verdünnungsstufe als eine der Bestimmungsmethode inhärente Streuung wurde bei der Reihenverdünnungstestung zur Basis 2 im direkten Vergleich der MHKs bzw. MBKs verschiedener Isolate als nicht signifikant angesehen.

Für die Prüfung auf signifikante Unterschiede der Empfindlichkeitstestung zwischen den Borreliengenospezies wurden der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-Test und der Mann Whitney-Test eingesetzt (GraphPad Prism Version 4.00 für Windows, GraphPad Software, San Diego California USA). Als signifikant verschieden gelten Werte mit $p < 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Genotypisierung der Borrelien-Isolate mittels RFLP Analyse der 5S-23S-rDNA-Region

Die Borrelien-Isolate aus dem Stammkollektiv (Tabelle 2.1) wurden molekularbiologisch typisiert. Zur Typisierung wurde eine Restriktionsanalyse 5S-23S rDNA-PCR-Region nach erfolgter PCR und *MseI*-Verdau der amplifizierten DNA-Fragmenten (Postic et al., 1994) angewendet. Mit dieser Methode lassen sich die drei humanpathogenen Genospezies *B. burgdorferi* s. s., *B. afzelii* und *B. garinii* eindeutig erfassen und klassifizieren (Kraiczky, 2002).

Nach Restriktionsanalyse der PCR-Amplifikate zeigen sich die folgenden, für die drei o. g. humanpathogenen Genospezies typischen DNA-Fragmente:

108 Bp, 50 Bp, 38 Bp und 29 Bp für *B. burgdorferi* s. s.-Isolate,

108 Bp, 95 Bp, 50 Bp, für *B. garinii*-Isolate,

108 Bp, 68 Bp und 50 Bp für *B. afzelii*-Isolate (Abbildung 3.1).

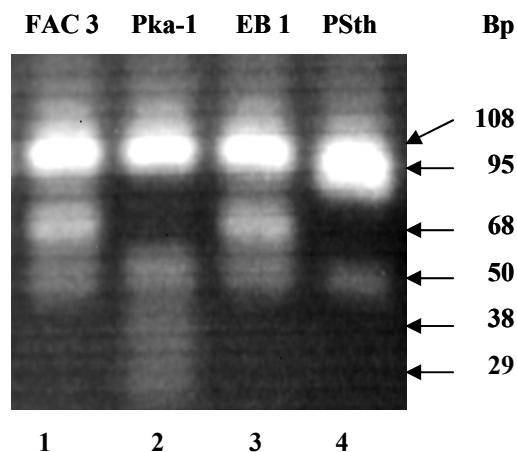


Abbildung 3.1: *MseI* Restriktionsmuster eines klinischen Isolates von einem Patienten mit ACA (Isolat FAC 3, Spur 1) und von definierten Borrelien-Isolaten der drei humanpathogenen Genospezies: *B. burgdorferi* s. s.-Isolat Pka-1 (Spur 2), *B. afzelii*-Isolat EB 1 (Spur 3) und *B. garinii*-Isolat PStH (Spur 4). Das Molekulargewicht der spezifischen Restriktionsfragmente ist rechts angegeben. Der DNA-Abschnitt zwischen dem 5S- und 23S rDNA-Gen wurde durch eine PCR mit spezifischen Primern amplifiziert. Die erhaltenen DNA-Amplifikate wurden mit dem Restriktionsenzym *MseI* behandelt. Die resultierenden Spaltprodukte wurden dann elektrophoretisch in einem 2-%-igen Agarosegel aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt.

Das untersuchte Stammkollektiv setzte sich aus 5 *B. burgdorferi* s. s.-Isolaten, 5 *B. garinii*-Isolaten, 5 *B. afzelii*-Isolaten, einem *B. valaisiana*-Isolat und einem *B. bissettii*-Isolat zusammen:

Isolat:	Genospezies:
EB 1, EB 2, FEM 1, FAC 3, VS 461	<i>B. afzelii</i>
PSth, PTrob, ZQ 1, JP 2, A 87S _B	<i>B. garinii</i>
Pka-1, B 31, LW 2, Z 25, 297	<i>B. burgdorferi</i> s. s.
VS 116	<i>B. valaisiana</i>
25015	<i>B. bissettii</i>

3.2 MHK-, MBK-Bestimmung des Ketolids Cethromycin bei 17 Borrelien-Isolaten

Bei allen 17 gegen das neu entwickelte Ketolidantibiotikum Cethromycin getesteten Borrelien-Isolaten wurde eine mittlere MHK von $\leq 0,002 \mu\text{g/ml}$ für Cethromycin festgestellt (Tabelle 3.1). Dementsprechend sind die MHK_{50} bzw. die MHK_{90} ebenfalls $\leq 0,002 \mu\text{g/ml}$. Die niedrigste MBK $\leq 0,002 \mu\text{g/ml}$ wurde bei einem von einem Patienten mit ACA neu isolierten *B. afzelii*-Isolat FAC 3 ermittelt. Bei den anderen laboradaptierten Borrelien-Isolaten wurden MBK- Mittelwerte zwischen 0,1 und 0,8 $\mu\text{g/ml}$ festgestellt. Die höchsten mittleren MBKs fanden sich bei den Borrelien-Isolaten, die zu den Spezies *B. burgdorferi* s. s. und *B. valaisiana* gehören. Dieser Unterschied war allerdings nicht signifikant (Kruskal-Wallis Test 2.2.9). Die MBK_{50} lag bei 0,25 $\mu\text{g/ml}$ und die MBK_{90} bei 0,75 $\mu\text{g/ml}$.

Tabelle 3.1: MHK-, MBK-Bestimmung von Cethromycin gegen 17 Borrelien-Isolate.

Spezies	Isolat	MHK* $\mu\text{g/ml}$	MBK* $\mu\text{g/ml}$	
		Mittelwert	Bereich	Mittelwert
<i>B. afzelii</i>	EB 1	$\leq 0,002$	0,25-0,5	0,38
	EB 2	$\leq 0,002$	0,06-0,125	0,09
	FEM 1	$\leq 0,002$	0,25	0,25
	FAC 3	$\leq 0,002$	$\leq 0,002$	$\leq 0,002$
	VS 461	$\leq 0,002$	0,125-0,25	0,19
<i>B. garinii</i>	PSth	$\leq 0,002$	0,25	0,25
	PTrob	$\leq 0,002$	0,06-0,125	0,09
	ZQ 1	$\leq 0,002$	0,125	0,125
	Jp 2	$\leq 0,002$	0,25	0,25
	A87Sß	$\leq 0,002$	0,125-0,25	0,19
<i>B. burgdorferi</i> s. s.	B 31	$\leq 0,002$	0,5-1	0,75
	Pka-1	$\leq 0,002$	0,25	0,25
	LW 2	$\leq 0,002$	0,5-1	0,75
	Z 25	$\leq 0,002$	0,25-0,5	0,38
	297	$\leq 0,002$	0,25	0,25
<i>B. valaisiana</i>	VS 116	$\leq 0,002$	0,5-1	0,75
<i>B. bissettii</i>	25015	$\leq 0,002$	0,125-0,25	0,19

* Die MHKs wurden mittels eines kolorimetrischen Mikrodilutionsverfahrens im Dreifachansatz bestimmt. Die MBKs wurden konventionell mittels Subkulturexperimenten in Flüssigmedium (Verdünnung 1: 1000) als Doppelbestimmung ermittelt und als Mittelwert berichtet.

3.3 Untersuchung möglicher Interaktionen von Antibiotika mit dem BSK-Medium

Die ermittelten MHKs bei *S. aureus* ATCC 29213 und *E. faecalis* ATCC 29212 zeigten nach 72 h und nach 120 h der Antibiotika-Platten-Vorinkubation mit BSK-Medium bei 33° C und 5 % CO₂ nur geringe Unterschiede im Vergleich mit den im BSK-Medium ohne eine vorherige Vorinkubation (0 h) ermittelten MHKs (Tabelle 3.2). Die so ermittelten MHKs lagen bei den Antibiotika bei denen CLSI Richtwerte verfügbar waren im Referenzbereich (Tabelle 3.2). Für Sifaxacin und Cethromycin liegen solche Werte bislang nicht vor. Eine signifikante Interaktion zwischen den eingesetzten Antibiotika und dem BSK-Medium konnte somit aber zumindest für die meisten der getesteten Antibiotika weitgehend ausgeschlossen werden.

Tabelle 3.2: Testung möglicher Interaktionen von sechs Antibiotika mit BSK-Medium nach 0 h, 72 h und 120 h mittels MHK-Bestimmung bei zwei ATCC-Referenzstämmen.

Antibiotikum ¹	MHK $\mu\text{g/ml}$ Mittelwert			MHK $\mu\text{g/ml}$ CLSI ² 2006
	0 h	72 h	120 h	
<i>S. aureus</i> ATCC 29213				
Ciprofloxacin	0,25	0,25	0,25	0,12-0,5
Sitafloxacin	0,03	0,03	0,03	n
Gemifloxacin	0,03	0,03	0,03	0,008-0,03
Cethromycin	0,015	0,03	0,03	n
Doxycyclin	0,25	0,5	0,5	0,12-0,5
Ceftriaxon	3	4	4	1,0-8,0
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212				
Ciprofloxacin	0,5	0,83	0,83	0,25-2
Sitafloxacin	0,125	0,18	0,18	n
Gemifloxacin	0,06	0,03	0,03	0,016-0,12
Cethromycin	0,007	0,015	0,019	n

n Daten nicht verfügbar

1 Die Untersuchungsbereich für Ceftriaxon und Doxycyclin lag zwischen 0,016-32 $\mu\text{g/ml}$, für Ciprofloxacin, Sitafloxacin und Gemifloxacin zwischen 0,008-16 $\mu\text{g/ml}$ und für Cethromycin zwischen 0,002-2 $\mu\text{g/ml}$.

2 CLSI (früher NCCLS)

Zur Prüfung der Antibiotika-Interaktion mit BSK-Medium nach 72 h und 120 h wurden die Antibiotika-Testplatten zuvor mit BSK-Medium 72 h bzw. 120 h bei 33°C und bei 5 % CO₂ vorinkubiert. Die Testungen wurden in Doppelbestimmung vorgenommen und als Mittelwert berichtet.

3.4 Ergebnisse der MHK-Bestimmungen von sechs Antibiotika bei drei *B. burgdorferi* Isolaten mittels konventioneller Zählung

Mittels konventioneller Zählung lag die MHK für Ciprofloxacin für das *B. afzelii*-Isolat EB 1 bei 1 µg/ml. Für das *B. garinii*-Isolat PSth und das *B. burgdorferi* s. s.-Isolat Pka-1 wurde eine MHK für Ciprofloxacin von jeweils 0,5 µg/ml bestimmt (Tabelle 3.3). Bei Sitafloracin unterscheiden sich die MHKs ebenfalls um nur eine geometrische Verdünnungsstufe (0,25 µg/ml bei EB 1 und Pka-1, 0,125 µg/ml bei PSth). Alle untersuchten Borrelien-Isolate zeigen einheitlich MHKs von 0,06 µg/ml für Gemifloxacin und von 0,25 µg/ml für Doxycyclin. Bereits bei der niedrigsten untersuchten Ceftriaxon-Konzentration von 0,016 µg/ml und einer Cethromycin-Konzentration von 0,002 µg/ml konnte eine Hemmung des Borrelienzwachstums verzeichnet werden. Mittels konventioneller Zählung konnte bei den MHKs kein speziesabhängiger Unterschied zwischen den drei getesteten Borrelien-Isolaten beobachtet werden.

Tabelle 3.3: MHK-Bestimmungen mittels konventioneller Borrelienzellzählung im Rahmen der Abtötungsexperimente.

Antibiotika	MHK* µg/ml Mittelwert		
	<i>B. afzelii</i> EB 1	<i>B. garinii</i> PSth	<i>B. burgdorferi</i> s. s. Pka-1
Ciprofloxacin	1	0,5	0,5
Sitafloracin	0,25	0,125	0,25
Gemifloxacin	0,06	0,06	0,06
Cethromycin	≤0,002	≤0,002	≤0,002
Doxycyclin	0,25	0,25	0,25
Ceftriaxon	≤0,016	≤0,016	≤0,016

* Bei der MHK-Bestimmungen mittels konventioneller Borrelienzellzählung im Rahmen der Abtötungsexperimente wurde die MHK als die niedrigste Antibiotikakonzentration ermittelt, bei der die Anzahl an beweglichen Borrelien nach 72 h Zell-Kultivierung nicht größer war als im Ausgangsinokulum (Inokulum $2,5 \times 10^7$ Borrelien pro ml). Es wurden jeweils Doppelbestimmungen vorgenommen und der Mittelwert der Bestimmungen für die Erstellung der Abtötungskurve benutzt.

3.5 Ergebnisse der MBK-Bestimmungen von sechs Antibiotika bei drei *B. burgdorferi* Isolaten

3.5.1 Konventionelle MBK-Bestimmung in Flüssigmedium (BSK)

Bei Ciprofloxacin fanden sich bei allen drei Borrelien-Isolaten MBKs von $>16 \mu\text{g/ml}$ (Tabelle 3.4). Bei dem Fluorochinolon Gemifloxacin wurde bei dem *B. burgdorferi* s. s.-Isolat Pka-1 höhere MBK-Werte im Vergleich zu den anderen beiden Borrelien-Isolaten gemessen. Die höchsten MBK-Werte wurden für Doxycyclin zwischen $24 \mu\text{g/ml}$ und $>32 \mu\text{g/ml}$ ermittelt. Die niedrigsten MBKs fanden sich für Cethromycin.

Tabelle 3.4: MBK-Bestimmung mittels konventioneller Subkultivierung im flüssigen BSK-Medium.

Antibiotika	MBK* $\mu\text{g/ml}$ Mittelwert		
	<i>B. afzelii</i> EB 1	<i>B. garinii</i> PSth	<i>B. burgdorferi</i> s. s. Pka-1
Ciprofloxacin	>16	>16	>16
Sitafloxacin	8	6	>16
Gemifloxacin	2	6	16
Cethromycin	0,5	0,25	0,25
Doxycyclin	24	24	>32
Ceftriaxon	1,5	1	1

* Nach 72 h Antibiotika-Exposition in frisches BSK-Medium überimpfte Borrelien wurden bei $33 \text{ }^\circ\text{C}$ mit 5% CO_2 bis zu 21 Tagen subkultiviert und mittels Dunkelfeldmikroskopie auf das Vorhandensein intakter, beweglicher Borrelien untersucht. Für Cethromycin wurde eine MBK-Bestimmung bei der Endverdünnung 1:1000 durchgeführt. Bei den anderen getesteten Antibiotika lag die Endverdünnung bei 1:75. Als MBK galt die niedrigste Antibiotikakonzentration, bei der nach 21 Tagen Subkultivierung keine intakten, beweglichen Borrelien nachweisbar waren. Es wurde stets eine Doppelbestimmung für jedes Isolat vorgenommen und der Mittelwert berichtet.

3.5.2 Testung zu möglichen Einflüssen der Antibiotikaexpositionszeit auf die MBK-Ermittlung mittels konventioneller Subkultivierung in flüssigen BSK-Medium nach 72 h, 96 h und nach 120 h

Bei dem *B. afzelii*-Isolat EB 1 wurden unter Sitafloracin, Gemifloracin und Ceftriaxon nach 72 h Antibiotikaexposition höhere MBKs als nach 96 h und 120 h ermittelt (Tabelle 3.5). Bei dem *B. garinii*-Isolat PStH waren MBKs bei Sitafloracin und Ceftriaxon nach 120 h vermindert. Bei dem *B. burgdorferi* s. s.-Isolat Pka-1 zeigte sich unter Doxycyclin und Gemifloracin nach 96 h und nach 120 h Antibiotika-Inkubation eine MBK-Verminderung. Es konnte somit bei einer längeren Antibiotika-Expositionszeit zumindest bei einigen Antibiotika eine Beeinflussung der MBK-Ermittlung festgestellt werden.

Tabelle 3.5: MBK-Bestimmungen nach 72 h, 96 h und 120 h Antibiotika-Inkubation.

Antibiotika	MBK $\mu\text{g/ml}$ Mittelwert		
	72 h	96 h	120 h
<i>B. afzelii</i> EB 1			
Ciprofloxacin	> 16	> 16	> 16
Sitafloracin	8	2	2
Gemifloracin	2,3	1	0,6
Cethromycin	0,5	0,5	0,5
Doxycyclin	24	24	16
Ceftriaxon	1,5	0,38	0,38
<i>B. garinii</i> PStH			
Ciprofloxacin	> 16	16	12
Sitafloracin	6	6	3
Gemifloracin	6	6	8
Cethromycin	0,25	0,25	0,25
Doxycyclin	24	32	24
Ceftriaxon	1	1	0,38
<i>B. burgdorferi</i> s. s. Pka-1			
Ciprofloxacin	> 16	> 16	> 16
Sitafloracin	> 16	16	16
Gemifloracin	16	12	10
Cethromycin	0,25	0,25	0,19
Doxycyclin	> 32	32	24
Ceftriaxon	1	1,5	1,5

Um den Einfluss der Antibiotikaexpositionszeit auf die MBK-Ermittlung zu überprüfen, wurden antibiotikaexponierte Borrelien jeweils nach 72 h, 96 h und nach 120 h in frisches BSK-Medium überimpft und bis zu 21 Tagen lang subkultiviert. Die Endverdünnung für Cethromycin lag bei 1: 1000, für andere getestete Antibiotika bei 1:75. Die MBK-Bestimmungen wurden jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt und als Mittelwert berichtet.

3.6 Ergebnisse der Time-Kill-Experimente

Abtötungskinetiken wurden mit sechs Antibiotika (Tabelle 2.2) gegen jeweils drei Borrelien-Isolate (*B. afzelii*-Isolat EB 1, *B. garinii*-Isolat PStH und *B. burgdorferi* s. s.-Isolat Pka-1) durchgeführt. Bei jeder Untersuchung über 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurde auch eine Wachstumskontrolle mitgeführt. Das *B. burgdorferi* s. s.-Isolat Pka-1 zeigte dabei im Vergleich mit den zwei anderen Isolaten ein etwas langsames Wachstum. Das *B. afzelii*-Isolat EB 1 und das *B. garinii*-Isolat PStH erreichten nach 96 h eine stationäre Wachstumsphase (Abbildung 3.2).

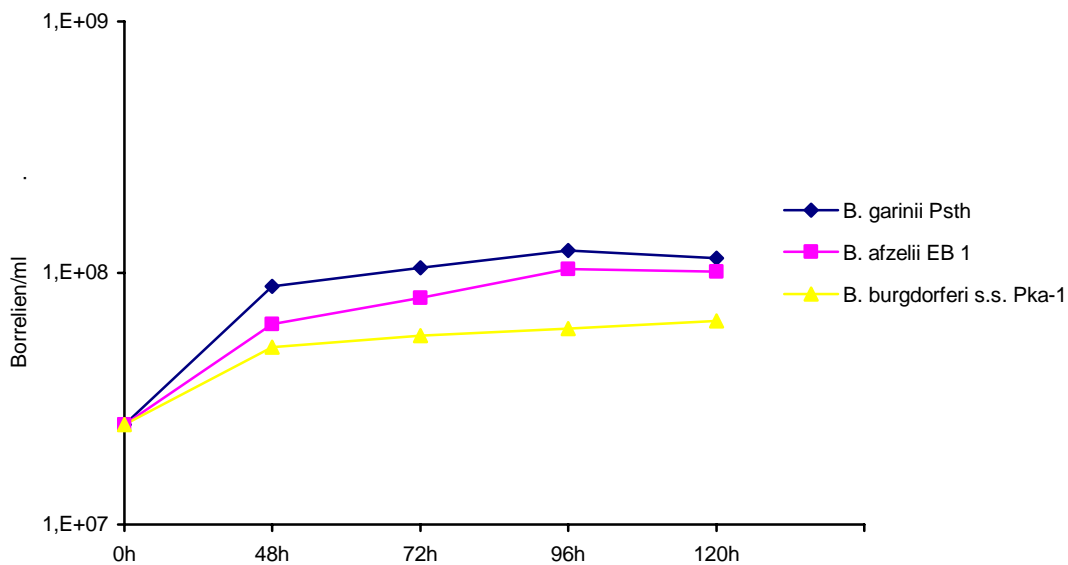


Abbildung 3.2. Wachstumskontrollen der untersuchten Borrelien-Isolate.

Bei keinem der eingesetzten Antibiotika konnte nach 48 h eine Borrelienreduktion um ≥ 3 \log_{10} -Stufen bei den getesteten Isolaten erreicht werden (Tabelle 3.6 sowie Abbildungen 3.3-3.8). Nach 72 h wurde dies bei den klinisch bewährten Antibiotika Doxycyclin und Ceftriaxon bei allen drei Isolaten und bei Gemifloxacin bei den Isolaten *B. afzelii* EB 1 und *B. garinii* PStH bei höheren Antibiotikakonzentrationen erreicht. Nach längeren Inkubationszeiten konnte die entsprechende Inokulumreduktion allerdings auch bei niedrigeren Antibiotikakonzentrationen festgestellt werden. Die Inokulumreduktion um ≥ 3 \log_{10} -Stufen wurde nach 120 h bei den Isolaten *B. afzelii* EB 1 und *B. garinii* PStH bei allen getesteten Antibiotika, außer Cethromycin erreicht. Bei Cethromycin war zwar nur eine 2,5 \log_{10} -Stufen-Reduktion, aber schon bei relativ niedrigen Konzentrationen von 0,03 $\mu\text{g/ml}$ und 0,016 $\mu\text{g/ml}$ feststellbar (Tabelle 3.6).

Auch bei dem langsam wachsenden *B. burgdorferi* s. s.-Isolat Pka-1 konnte nach 120 h eine Reduktion um ≥ 3 \log_{10} -Stufen bei allen getesteten Antibiotika, außer bei

Gemifloxacin, erreicht werden. Die dazu benötigten Konzentrationen lagen im Vergleich zu den zwei anderen Isolaten deutlich höher. Bei Gemifloxacin zeigte sich lediglich eine Reduktion um 2,5 log₁₀-Stufen. Sie war allerdings schon ab einer niedrigen Konzentration, nämlich ab 1 µg/ml zu verzeichnen (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: Ermittlung von bakterizider Antibiotikakonzentration, die eine Abnahme der Borrelienzahl um ≥ 3 log₁₀-Stufen (99,9 % Borrelienreduktion) gegenüber der initial vorliegenden Borrelienzahl bewirkt.

Isolat	Antibiotika	Borrelienreduktion von ≥ 3 log ₁₀ Stufen (µg/ml)			
		48 h	72 h	96 h	120 h
<i>B. afzelii</i> EB 1	Ciprofloxacin	-	-	-	8
	Sitafloxacin	-	-	-	2
	Gemifloxacin	-	16	4	0,25
	Cethromycin	-	-	-	0,03 (2,5 log ₁₀)
	Doxycyclin	-	16	2	2
	Ceftriaxon	-	1	0,13	0,06
<i>B. garinii</i> PSth	Ciprofloxacin	-	-	8	4
	Sitafloxacin	-	-	4	1
	Gemifloxacin	-	8	0,5	0,25
	Cethromycin	-	-	-	0,016 (2,5 log ₁₀)
	Doxycyclin	-	32	16	4
	Ceftriaxon	-	8	0,25	0,03
<i>B. burgdorferi</i> s. s. Pka-1	Ciprofloxacin	-	-	-	16
	Sitafloxacin	-	-	-	16
	Gemifloxacin	-	-	-	1 (2,5 log ₁₀)
	Cethromycin	-	-	-	0,03
	Doxycyclin	-	16	4	2
	Ceftriaxon	-	4	1	0,25

- Borrelienreduktion von ≥ 3 log₁₀ Stufen nicht erreicht

Der Untersuchungsbereich für Ceftriaxon und Doxycyclin lag zwischen 0,016-32 µg/ml, bei Ciprofloxacin, Sitafloxacin und Gemifloxacin zwischen 0,008-16 µg/ml und bei Cethromycin zwischen 0,002-2 µg/ml.

Die Abtötungsexperimente wurden in Doppelbestimmung durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwert berichtet.

Auch die Antibiotikakonzentrationen, bei denen keine morphologisch intakten beweglichen Borrelien mehr nachweisbar waren, erlauben eine nähere Beurteilung der Abtötungsaktivität von untersuchten Antibiotika (Tabelle 3.7 und Abbildungen 3.3 bis 3.8). So waren nach 120 h bei allen drei getesteten Isolaten bei den klinisch bewährten Antibiotika ab einer Doxycyclin-Konzentration von 8-16 µg/ml und ab Ceftriaxon-Konzentration von 0,25-1 µg/ml keine bewegliche Borrelien mehr nachweisbar (Tabelle 3.7 und Abbildungen 3.7-3.8).

Bei dem *B. garinii*-Isolat PStH, das im Vergleich zu den anderen zwei Isolaten das schnellste Wachstum zeigt (Abbildung 3.2), waren schon ab 96 h bei allen getesteten Antibiotika außer Cethromycin keine morphologisch intakten beweglichen Borrelien mehr nachweisbar. Bei Gemifloxacin zeigte dieses Isolat eine bessere Abtötung im Vergleich zu den zwei anderen Fluorochinolonen. Dabei konnten nach 120 h keine morphologisch intakten Borrelien ab einer Ciprofloxacin-Konzentration von 8 µg/ml, einer Sitafloxacin-Konzentration von 4 µg/ml und einer Gemifloxacin-Konzentration von 2 µg/ml mehr nachgewiesen werden.

Des Weiteren konnte bei den Fluorochinolonen eine Korrelation der Abtötungsaktivität mit der Wachstumsgeschwindigkeit der Isolate festgestellt werden. Dabei zeigte sich bei dem *B. burgdorferi* s. s.-Isolat Pka-1, das im Vergleich zu den Isolaten *B. afzelii* EB1 und *B. garinii* PStH ein langsames Wachstum aufwies, auch eine geringere abtötende Wirkung (Tabelle 3.6, 3.7 und Abbildungen 3.3-3.5). Dagegen konnte bei dem klinisch bewährten Antibiotikum Doxycyclin kein wachstumsabhängiger Wirkungsunterschied beobachtet werden (Tabelle 3.6, 3.7 und Abbildung 3.7).

Eine grafische Darstellung der Abtötungskinetik durch Einzeichnen der Borrelienzahl pro ml auf der Ordinatenachse (y-Achse) gegen die Untersuchungszeit auf der Abszissenachse (x-Achse) ermöglicht eine bessere Einteilung der Wirkung von Antibiotika (Anhang Abbildung 7.1-7.3). Bei den Fluorochinolonen konnte bei Antibiotikakonzentrationen von 2 x der MHK und 4 x der MHK eine Reduktion des Inokulum erzielt werden. Bei Antibiotikakonzentrationen von 8 x der MHK und 16 x der MHK war dagegen nur eine geringe oder sogar keine Reduktion des Inokulums zu beobachten. Bei Cethromycin wurde besonders bei dem *B. afzelii*-Isolat EB 1 bei steigenden Antibiotikakonzentrationen keine oder nur eine geringe Inokulumreduktion erreicht (Abbildung 3.6 und 7.1). Bei Doxycyclin bewirkten die höheren Antibiotikakonzentrationen eine stärkere Inokulumreduktion. Bei Ceftriaxon konnte dies nur nach 120 h beobachtet werden (Anhang Abbildung 7.1-7.3).

Tabelle 3.7: Antibiotikakonzentrationen, bei denen in der Time-Kill-Untersuchung nach 48 h, 72 h, 96 h und 120 h keine morphologisch intakten beweglichen Borrelien mehr nachweisbar waren.

Isolat	Antibiotika	Antibiotikakonzentrationen, bei denen keine beweglichen Borrelien mehr nachweisbar waren ($\mu\text{g/ml}$)			
		48 h	72 h	96 h	120 h
<i>B. afzelii</i> EB 1	Ciprofloxacin	+	+	+	+
	Sitafloxacin	+	+	+	+
	Gemifloxacin	+	+	+	+
	Cethromycin	+	+	+	+
	Doxycyclin	+	+	- (16)	- (8)
	Ceftriaxon	+	+	- (2)	- (0,25)
<i>B. garinii</i> PStH	Ciprofloxacin	+	+	- (16)	- (8)
	Sitafloxacin	+	+	- (16)	- (4)
	Gemifloxacin	+	- (16)	- (4)	- (2)
	Cethromycin	+	+	+	+
	Doxycyclin	+	+	- (32)	- (16)
	Ceftriaxon	+	+	- (8)	- (0,25)
<i>B. burgdorferi</i> s. s. Pka-1	Ciprofloxacin	+	+	+	+
	Sitafloxacin	+	+	+	+
	Gemifloxacin	+	+	+	+
	Cethromycin	+	+	+	+
	Doxycyclin	+	+	- (8)	- (8)
	Ceftriaxon	+	+	+	- (1)

+ Nachweis von morphologisch intakten beweglichen Borrelien;

- (x $\mu\text{g/ml}$) Antibiotikakonzentrationen, bei denen keine beweglichen Borrelien mehr nachweisbar waren;

Der Untersuchungsbereich für Ceftriaxon und Doxycyclin lag zwischen 0,016-32 $\mu\text{g/ml}$, bei Ciprofloxacin, Sitafloxacin und Gemifloxacin zwischen 0,008-16 $\mu\text{g/ml}$ und bei Cethromycin zwischen 0,002-2 $\mu\text{g/ml}$.

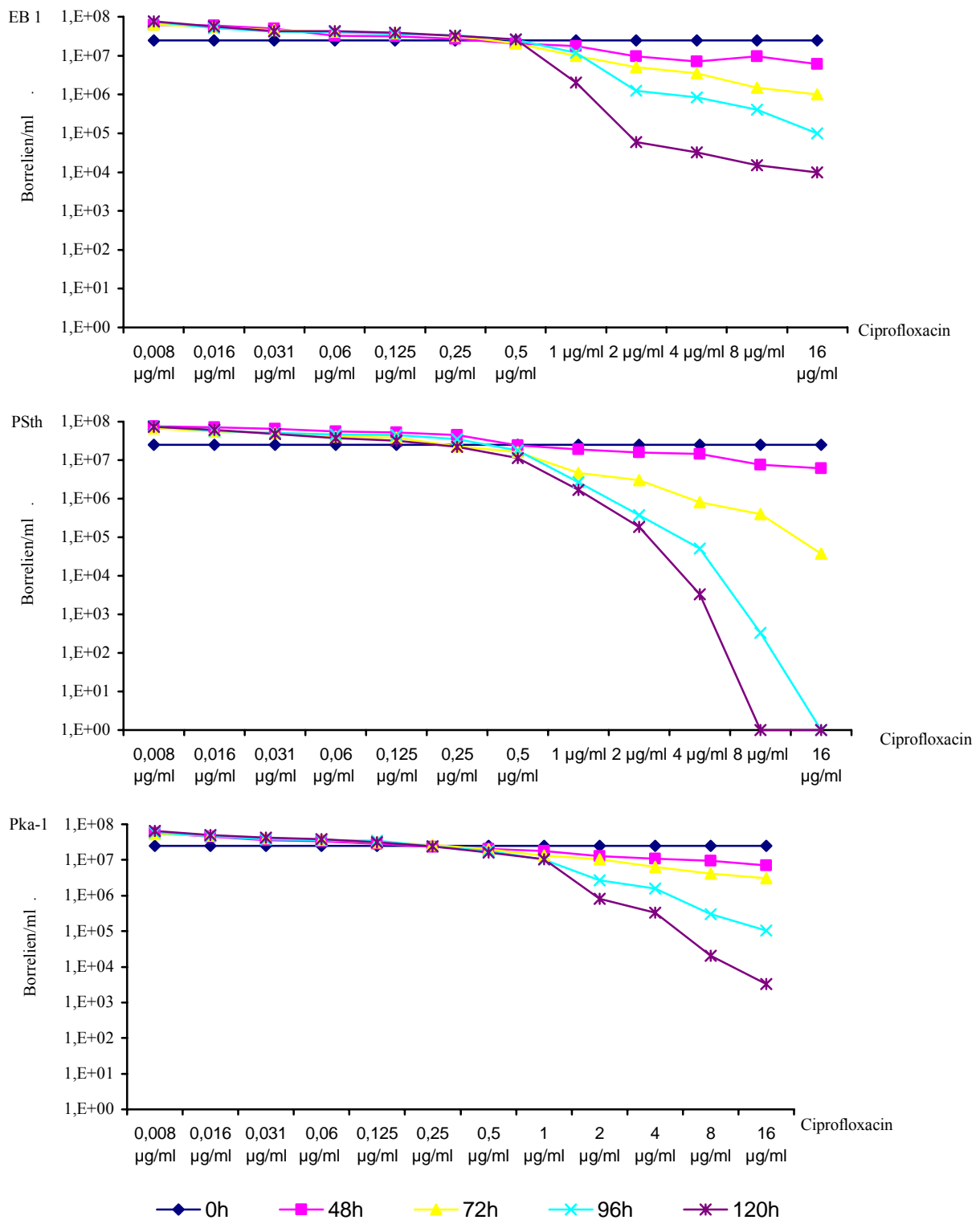


Abbildung 3.3. Wirkung von **Ciprofloxacin** (Konzentrationsbereich: 0,008 µg/ml bis 16 µg/ml) auf das *B. afzelii*-Isolat EB 1, das *B. garinii*-Isolat PSth und das *B. burgdorferi s. s.*-Isolat Pka-1 nach 48 h, 72 h, 96 h und 120 h. Die Abnahme der Borrelienzahl wurde logarithmisch gegen die Antibiotikakonzentration aufgetragen.

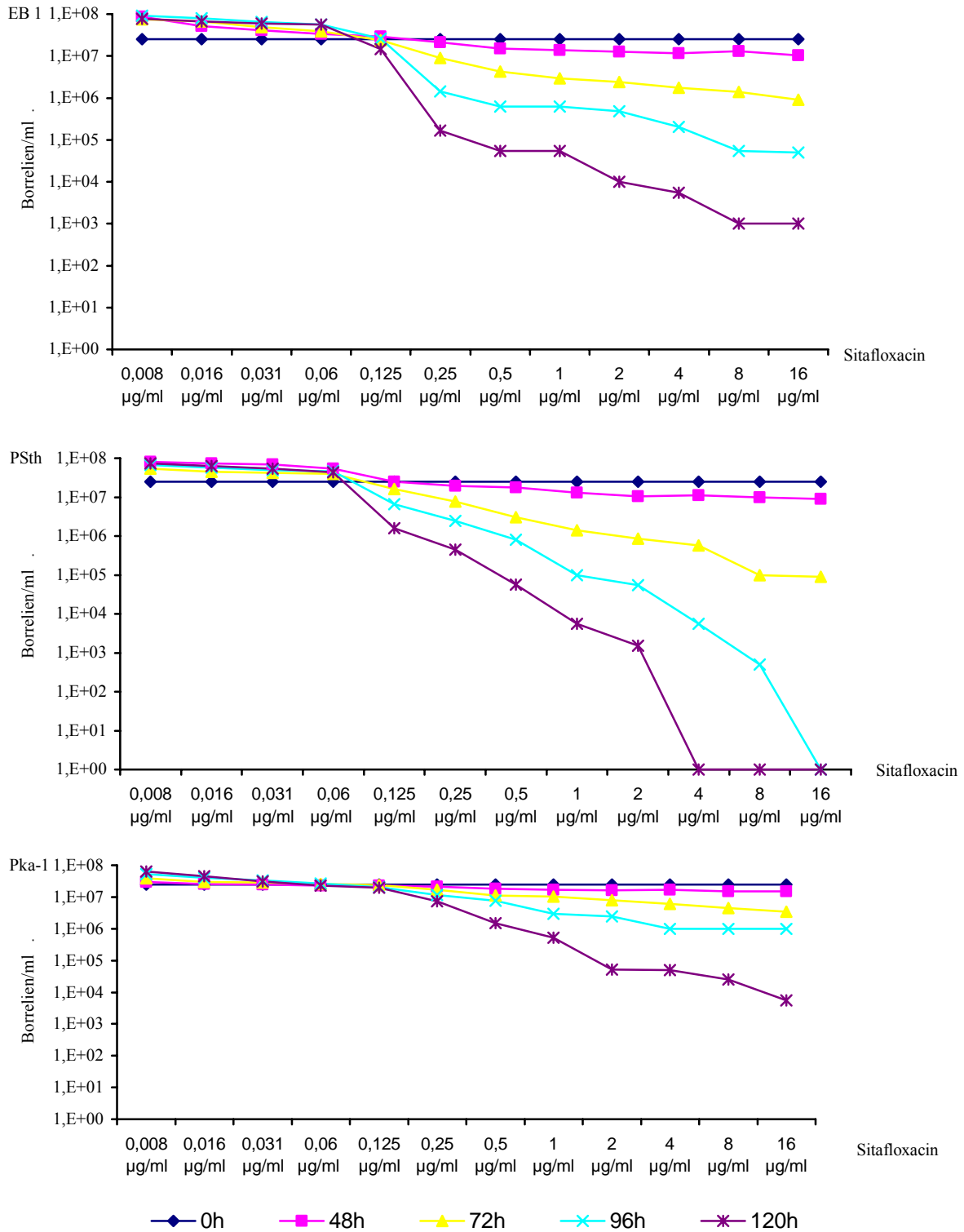


Abbildung 3.4. Wirkung von Sitafloraxacin (Konzentrationsbereich 0,008 µg/ml bis 16 µg/ml) auf das *B. afzelii*-Isolat EB 1, das *B. garinii*-Isolat PSth und das *B. burgdorferi s. s.*-Isolat Pka-1 nach 48 h, 72 h, 96 h und 120 h. Die Abnahme der Borrelienzahl wurde logarithmisch gegen die Antibiotikakonzentration aufgetragen.

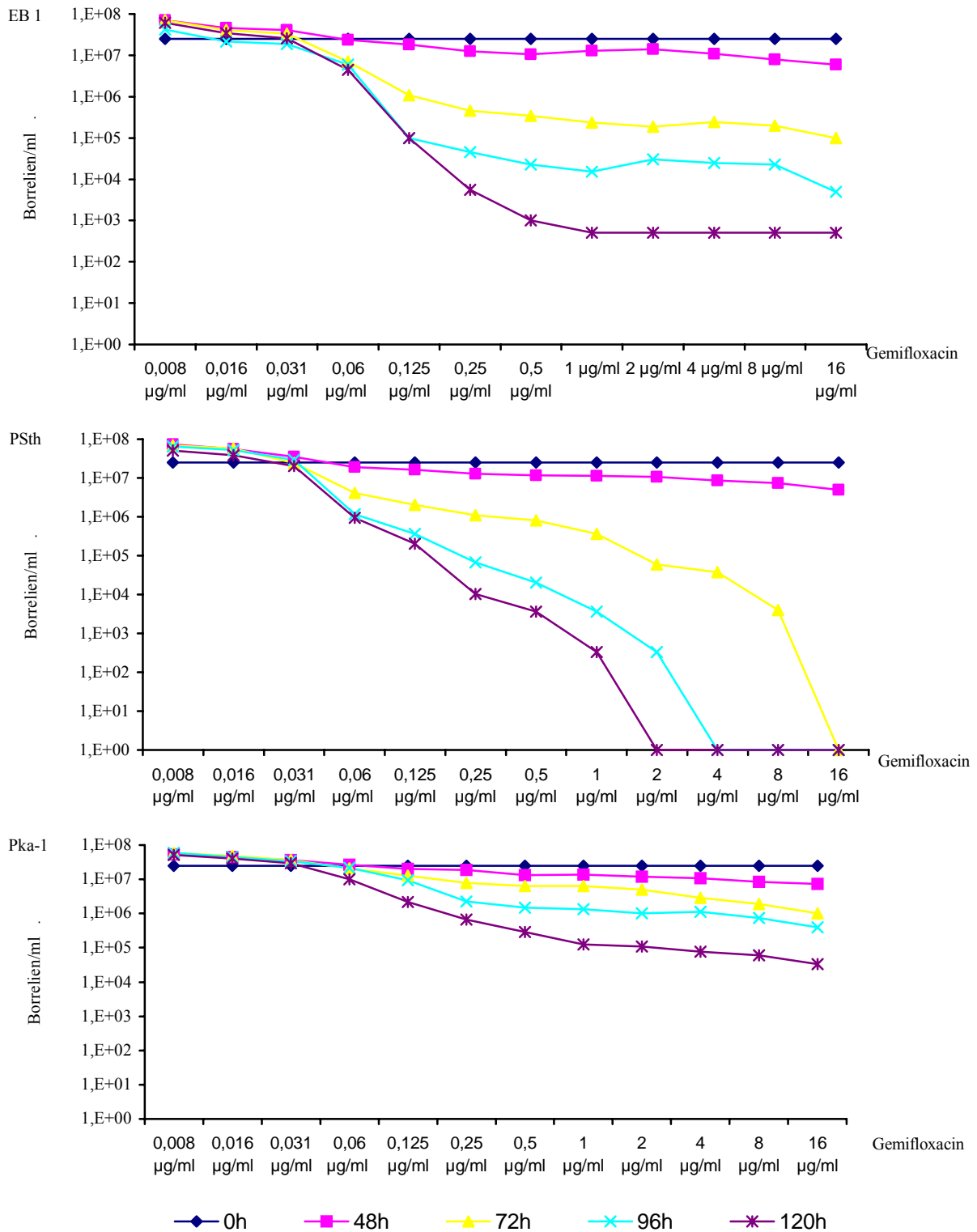


Abbildung 3.5. Wirkung von **Gemifloxacin** (Konzentrationsbereich: 0,008 µg/ml bis 16 µg/ml) auf das *B. afzelii*-Isolat EB 1, das *B. garinii*-Isolat PSth und das *B. burgdorferi s. s.*-Isolat Pka-1 nach 48 h, 72 h, 96 h und 120 h. Die Abnahme der Borrelienzahl wurde logarithmisch gegen die Antibiotikakonzentration aufgetragen.

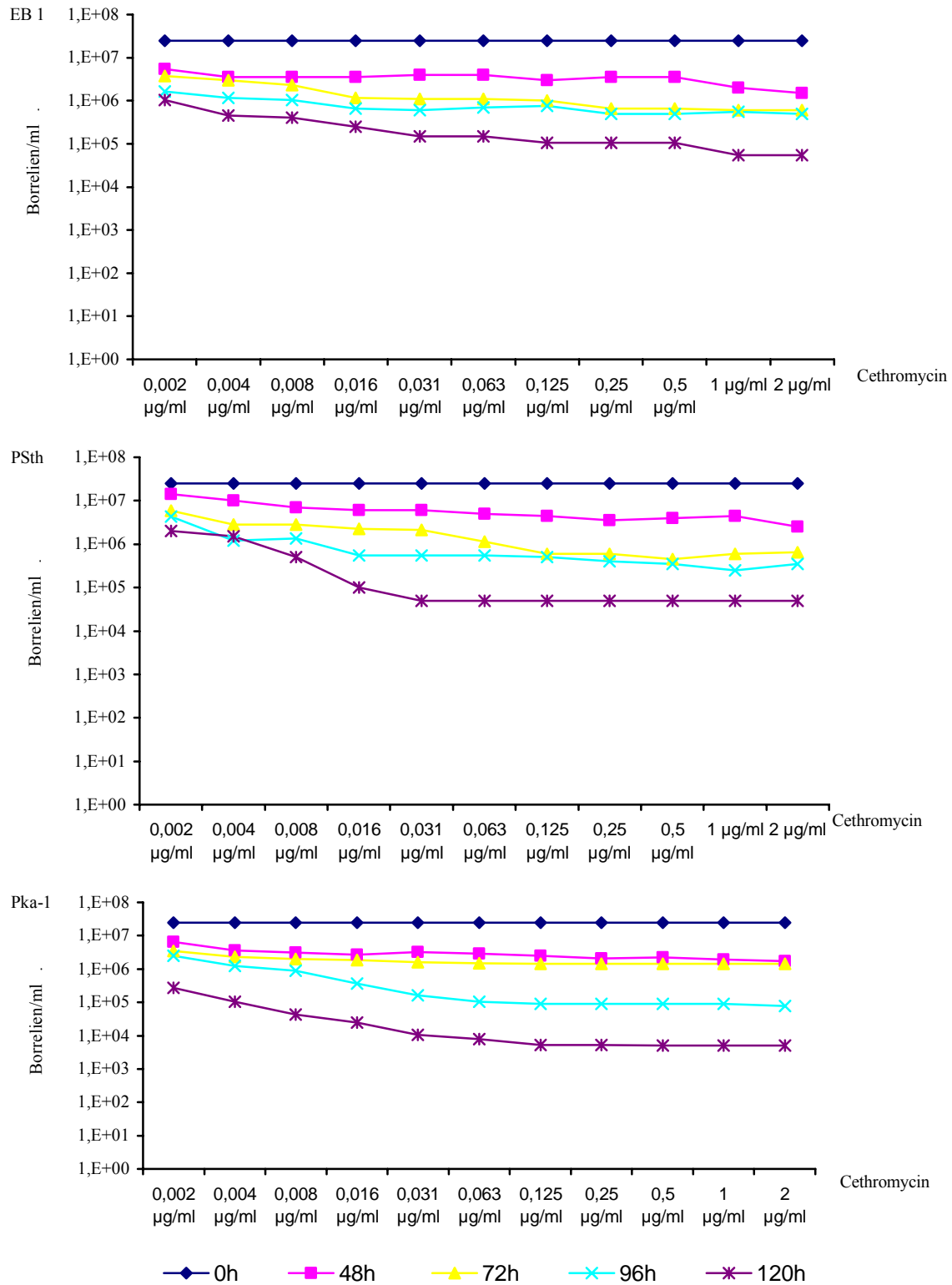


Abbildung 3.6. Wirkung von **Cethromycin** (Konzentrationsbereich 0,0019 µg/ml bis 2 µg/ml) auf das *B. afzelii*-Isolat EB 1, das *B. garinii*-Isolat PSth und das *B. burgdorferi s. s.*-Isolat Pka-1 nach 48 h, 72 h, 96 h und 120 h. Die Abnahme der Borrelienzahl wurde logarithmisch gegen die Antibiotikakonzentration aufgetragen.

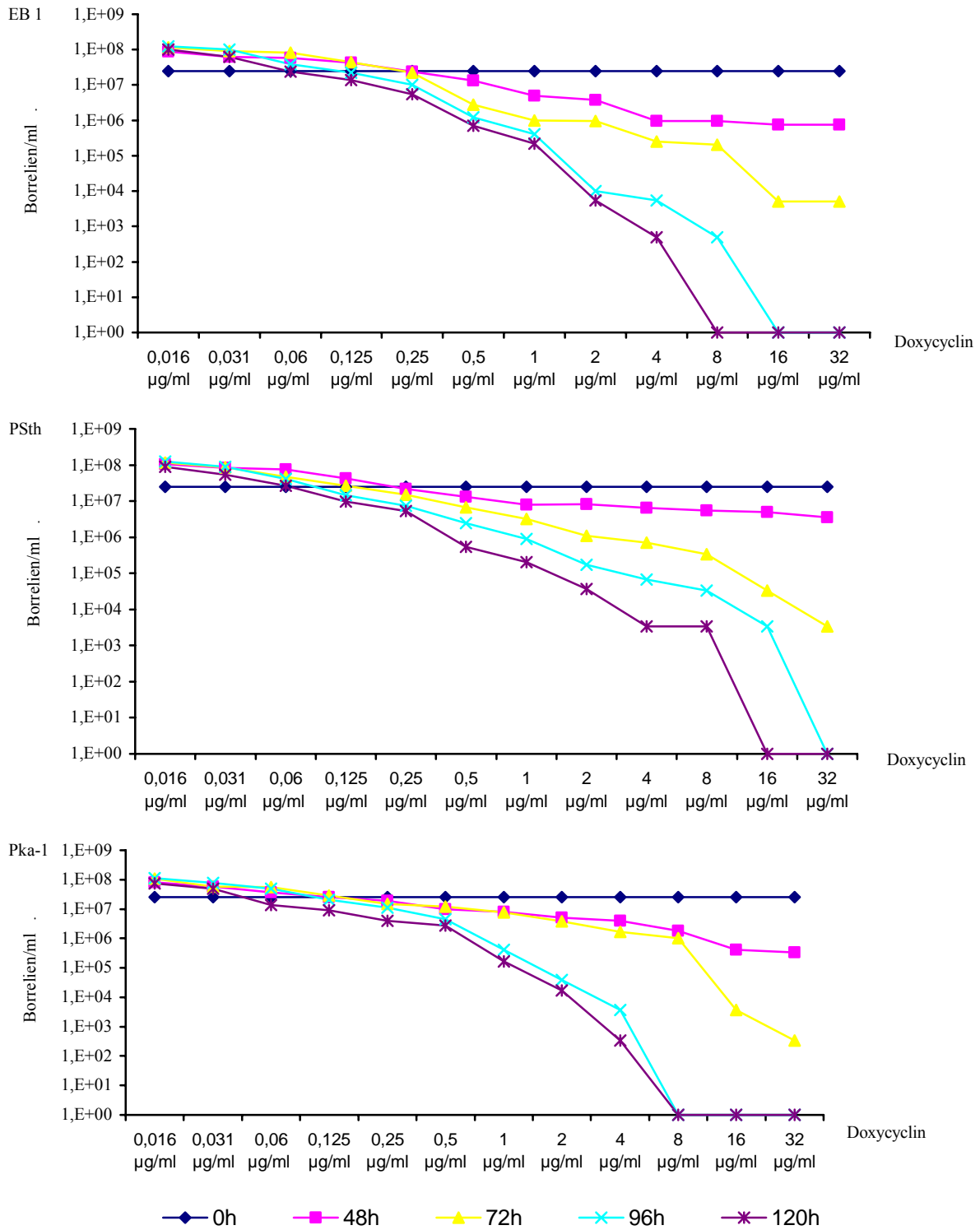


Abbildung 3.7. Wirkung von **Doxycyclin** (Konzentrationsbereich 0,016 µg/ml bis 32 µg/ml) auf das *B. afzelii*-Isolat EB 1, das *B. garinii*-Isolat PSth und das *B. burgdorferi s. s.*-Isolat Pka-1 nach 48 h, 72 h, 96 h und 120 h. Die Abnahme der Borrelienzahl wurde logarithmisch gegen die Antibiotikakonzentration aufgetragen.

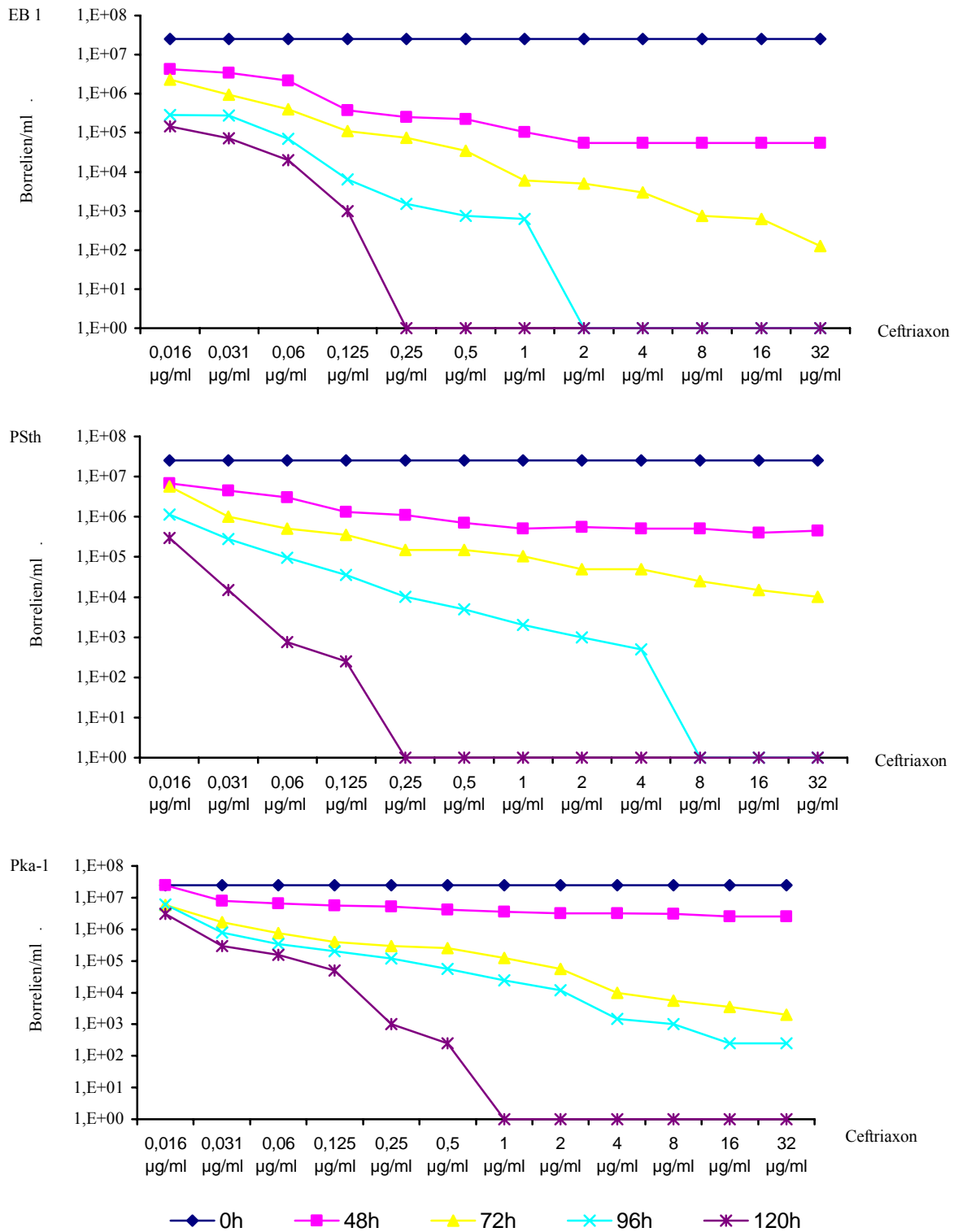


Abbildung 3.8. Wirkung von **Ceftriaxon** (Konzentrationsbereich 0,016 µg/ml bis 32 µg/ml) auf das *B. afzelii*-Isolat EB 1, das *B. garinii*-Isolat PSth und das *B. burgdorferi s. s.*-Isolat Pka-1 nach 48 h, 72 h, 96 h und 120 h. Die Abnahme der Borrelienzahl wurde logarithmisch gegen die Antibiotikakonzentration aufgetragen.

3.7 Ermittlung von Bakterizidie-Indizes

Um die Resultate der Abtötungsergebnisse zwischen drei Borrelienisolaten nach Inkubationszeiten von 48 h, 72 h, 96 h und 120 h miteinander effizienter vergleichen zu können, wurde ein so genannter BI für jedes untersuchte Antibiotikum ermittelt.

Die BIs wurden grafisch aus dem Logarithmus der Reduktion des Ausgangsinokulums und dem Logarithmus der Antibiotikakonzentrationen errechnet (Morrissey, 1997). Die höchste in die Ermittlung eingeschlossene log-Antibiotikakonzentration entsprach $\log-C_{\max}$ für die untersuchten Antibiotika. Nach i. v. Gabe von 2 g Ceftriaxon wird eine C_{\max} 250 $\mu\text{g/ml}$ erreicht (Karchmer, 2000). Die Abtötungsexperimente bei Ceftriaxon wurden allerdings nur bis zu 32 $\mu\text{g/ml}$ durchgeführt (Tabelle 2.2). Dementsprechend konnte nur diese höchste untersuchte Antibiotikakonzentration bei der Errechnung des BIs berücksichtigt werden. Der BI wurde als die Fläche unter dem „bakteriziden Teil“ der Kurve des ermittelten Grafen berechnet (Abbildung 2.1).

Die bei den drei Borrelien-Isolaten durchgeführten Time-Kill-Experimente konnten unter allen getesteten Antibiotika eine ständige Zunahme des BIs bis zu 120 h zeigen (Abbildung 3.9-3.11). Bei Cethromycin wurden bei den drei Isolaten schon nach 48 h verhältnismäßig hohe BIs festgestellt. Bei dem *B. burgdorferi* s. s.-Isolat Pka-1 wurden bei Cethromycin im Vergleich zu den Isolaten *B. afzelii* EB1 und *B. garinii* PSth höhere BIs beobachtet.

Bei den Fluorochinolonen wurden bei den drei Isolaten bei Gemifloxacin, im Vergleich zu Ciprofloxacin und Sitafloxacin die größten BIs festgestellt. Des Weiteren konnte bei den Fluorochinolonen eine Korrelation der Höhe des BI mit der Generationszeit beobachtet werden. Dabei wurden bei dem *B. garinii*-Isolat PSth, das im Vergleich zu den anderen zwei Isolaten das schnellste Wachstum aufwies (Abbildung 3.2) höhere BIs errechnet. Bei dem *B. burgdorferi* s. s.-Isolat Pka-1, das im Vergleich zu den Isolaten *B. afzelii* EB1 und *B. garinii* PSth ein langsames Wachstum hat, wurden auch bei den drei getesteten Fluorochinolonen niedrigere BIs beobachtet (Abbildung 3.9-3.11).

Wie bei den Fluorochinolonen waren auch bei Ceftriaxon die BIs bei dem *B. burgdorferi* s. s.-Isolat Pka-1 im Vergleich zu den zwei anderen Isolaten niedriger.

Bei Doxycyclin wurden bei allen drei Isolaten vergleichbare BIs errechnet (Abbildung 3.9-3.11). BIs von > 2.8 stehen dabei für eine gute antimikrobielle Aktivität.

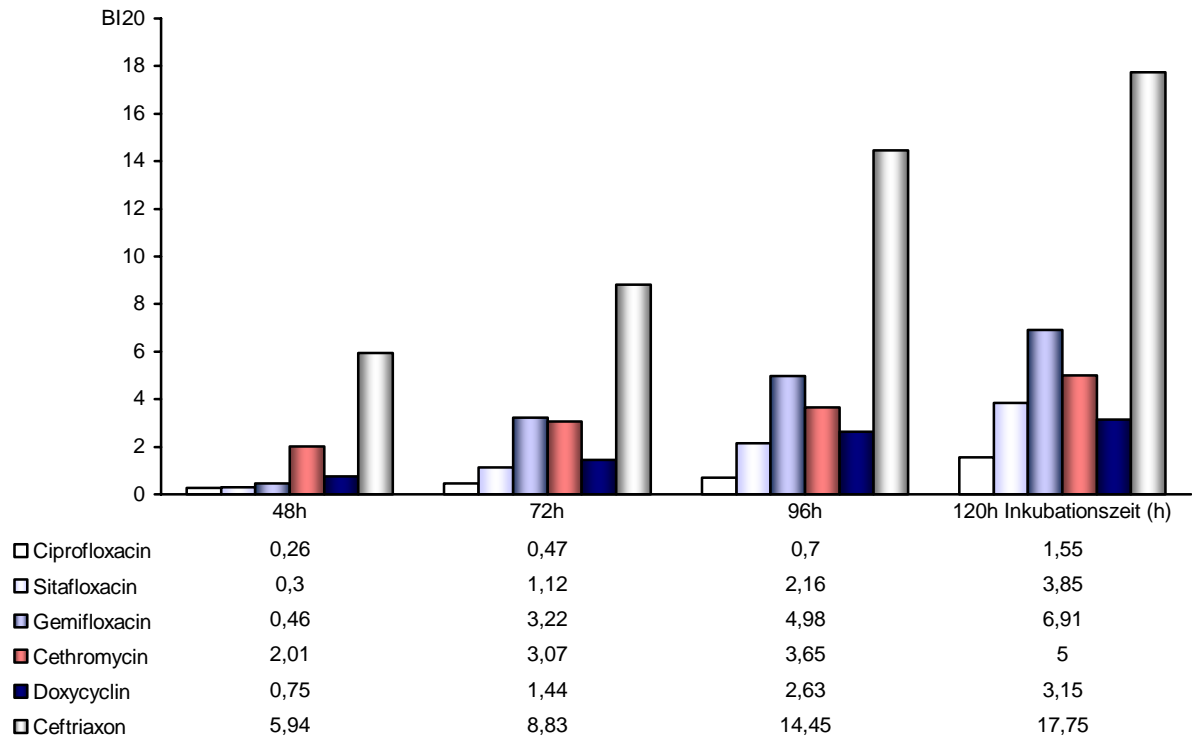


Abbildung 3.9. Das Histogramm zeigt die BIs für das Isolat **EB 1** (*B. afzelii*). Die BIs sind in der Legende als dimensionslose Werte wiedergegeben.

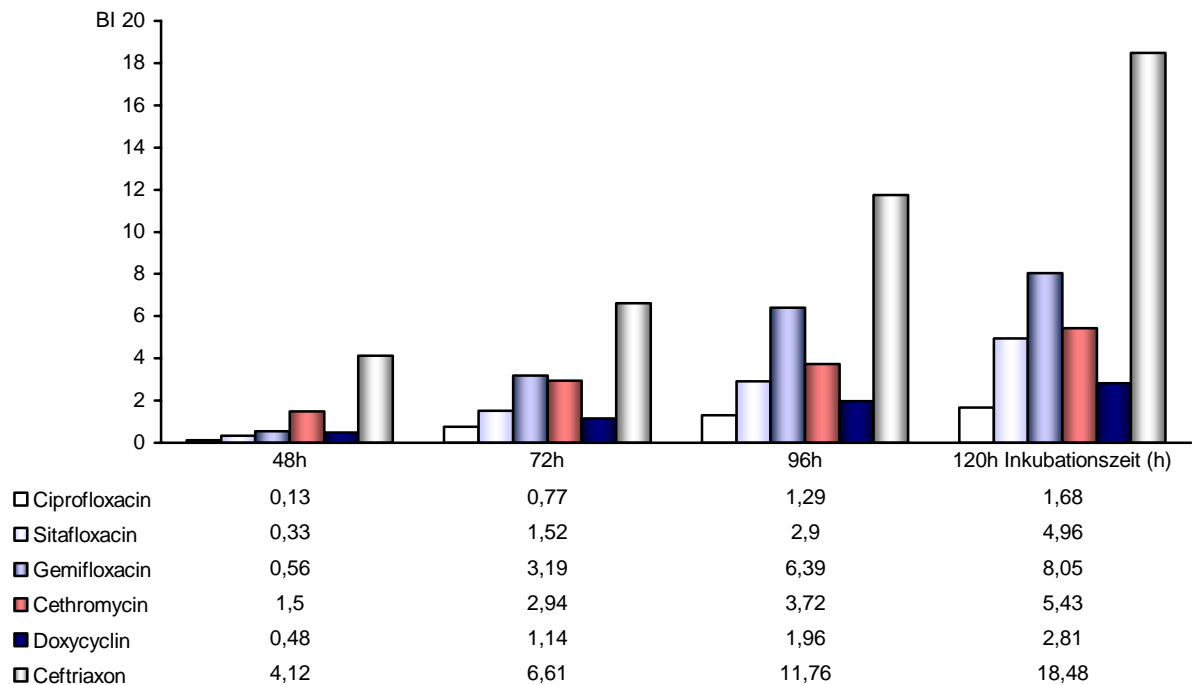


Abbildung 3.10. Das Histogramm zeigt die BIs für das Isolat **PSth** (*B. garinii*). Die BIs sind in der Legende als dimensionslose Werte wiedergegeben.

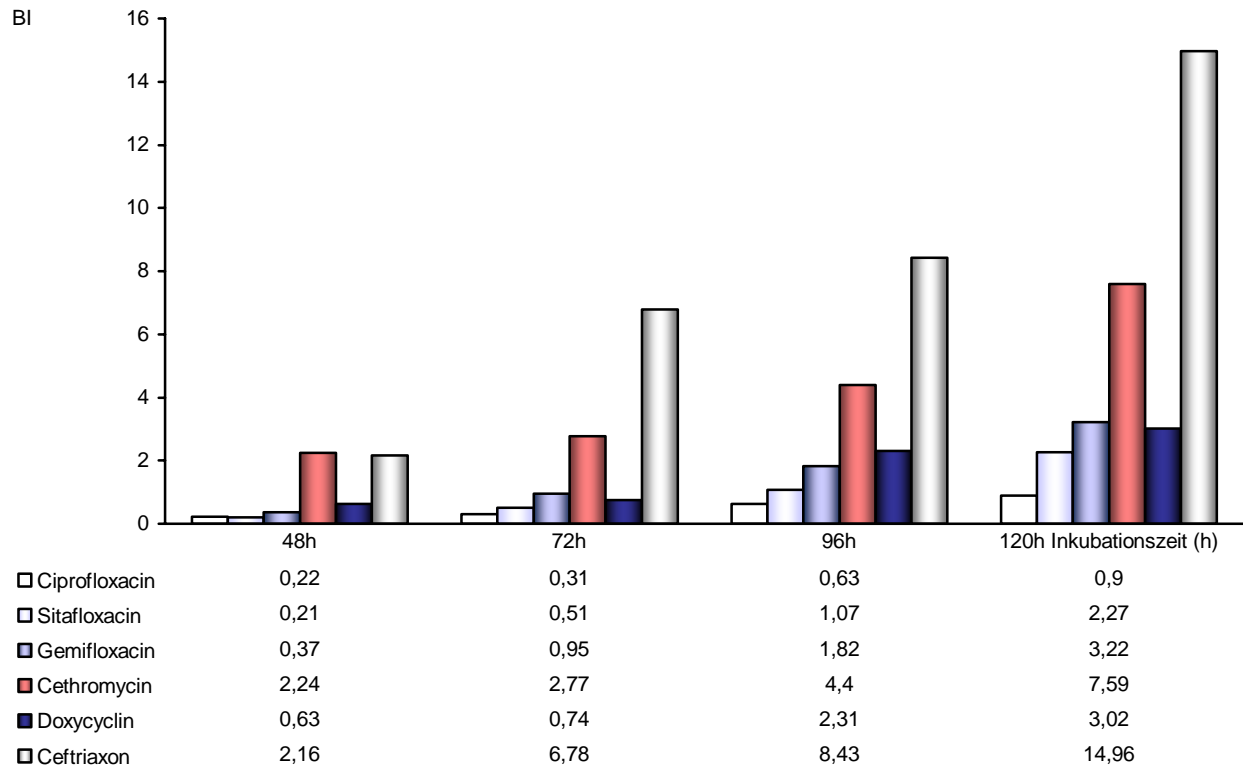


Abbildung 3.11. Das Histogramm zeigt die BIs für das Isolat **Pka-1** (*B. burgdorferi* s. s.). Die BIs sind in der Legende als dimensionslose Werte wiedergegeben.

3.8 Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung bei einem niedrigpassagierten Borrelien-Isolat

Ein aus einer Hautbiopsie bei einem Patienten mit ACA neu isoliertes Borrelien-Isolat FAC 3, das entsprechend den Ergebnissen der RFLP-Analyse (Kapitel 3.1) zur Genospezies *B. afzelii* gehörte, wurde für die MHK-Bestimmung mittels konventioneller Zählung und für die MBK-Bestimmung mittels Subkultivierung im flüssigen BSK-Medium nach 72 h Inkubation eingesetzt (Tabelle 3.8). Bei diesem Isolat wurden MHKs nur um eine, bei Sitafloxacin um zwei geometrische Verdünnungsstufen niedriger als bei den laboradaptierten Borrelien-Isolaten EB 1, Psth und Pka-1 beobachtet (Tabelle 3.3). Die MBKs waren im Vergleich zu den laboradaptierten Isolaten deutlich niedriger (Tabelle 3.4). Im Vergleich zu den laboradaptierten Isolaten weist allerdings die Wachstumskontrolle bei dem niedrigpassagierten Borrelienisolat eine nur sehr langsame Vermehrung von Borrelien auf (Abbildung 3.12).

Tabelle 3.8: MHKs und MBKs des niedrigpassagierten Isolates FAC 3 (*B. afzelii*) (2. bis 3. Passage).

Antibiotika	MHK* $\mu\text{g}/\text{m}$ Mittelwert	MBK* $\mu\text{g}/\text{ml}$ Mittelwert
Ciprofloxacin	0,25	1,5
Sitafloxacin	0,06	0,25
Gemifloxacin	0,03	0,06
Cethromycin	$\leq 0,002$	$\leq 0,002$
Doxycyclin	0,125	0,5
Ceftriaxon	$\leq 0,016$	0,016

* Die MHKs wurden mittels konventioneller Zählung und die MBKs mittels konventionellen Subkulturexperimenten in Flüssigmedium als Doppelbestimmung ermittelt und als Mittelwert berichtet.

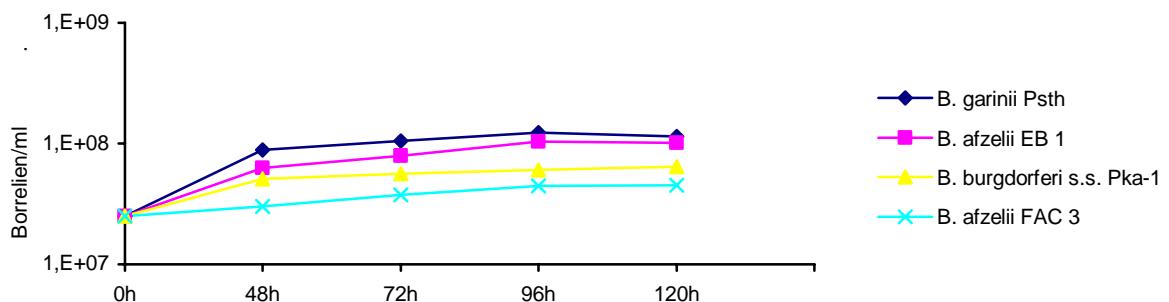


Abbildung 3.12. Vergleich von Wachstumskontrollen der untersuchten Borrelien-Isolate

4 Diskussion

4.1 Methodische und technische Probleme bei der *in vitro*-Empfindlichkeitstestung von *B. burgdorferi* gegen klinisch bewährte und neu entwickelte Antibiotika

Die Lyme-Borreliose ist eine weltweit verbreitete Multisystemerkrankung, die durch mit *B. burgdorferi* infizierte Schildzecken übertragen wird. Sie ist die häufigste durch Zecken übertragene Erkrankung in den USA und Europa. In Deutschland kommt es jährlich schätzungsweise zu ca. 30.000-60.000 Neuerkrankungen (Wilske und Fingerle, 2000).

B. burgdorferi wurde im Jahr 1982 entdeckt. Erste Therapieempfehlungen mit Tetracyclin und Penicillin basierten auf empirischen Erfahrungen (Steere et al., 1983). Die Durchführung von *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen und klinischen Studien ermöglichte aufgrund der verbesserten Charakterisierung der Antibiotikaempfindlichkeit gegen *B. burgdorferi* die Erarbeitung klinisch effektiver, stadienabhängiger Therapieoptionen für die Lyme-Borreliose. Ein umfassendes Therapieschema für die Lyme-Borreliose ist allerdings bis jetzt noch nicht abschließend etabliert.

Bei der Lyme-Borreliose kommt es, besonders im Spätstadium der Erkrankung, trotz Therapie oft zu einer unvollständigen Abheilung von Krankheitssymptomen. Entscheidend bei der Auswahl von geeigneten Antibiotika für eine effektive Therapie sind neben klinischen Studien Kenntnisse des *in vitro*-Empfindlichkeitsprofils der Borrelien. Bei der Durchführung von Empfindlichkeitsprüfungen von Borrelien gegen bekannte und neu entwickelte Antinfektiva ist eine Standardisierung von Testbedingungen und angewandten Methoden von großer Bedeutung.

Da keine umfassenden Normen zur Durchführung von *in vitro*-Empfindlichkeitstests für langsam wachsende Bakterien wie Borrelien existieren, versucht jede Arbeitsgruppe eigene Empfindlichkeitskriterien zu erarbeiten (Tabelle 4.1). Daher sind die Daten zur *in vitro*-Empfindlichkeit bei unterschiedlichen Testbedingungen nur bedingt miteinander vergleichbar.

Tabelle 4.1: Literaturübersicht der *in vitro*-Antibiotika-Empfindlichkeitstestung von *B. burgdorferi* (modifiziert nach Hunfeld et al., 2002).

Autoren	MHK-Definition (Auswertung)	Inokulum	Inkubation	Subkultur	Subkultivierung (Endverdünnung)
Mikrodilutionsmethode					
Dever et al., 1992	kein sichtbares Wachstum und kein Indikatorumschlag (makroskopisch)	10 ⁶ /ml	72 h	10-12 d	subsurface plating
Cinco et al., 1995	kein sichtbares Wachstum (mikroskopisch)	10 ⁶ /ml	7 d	14 d	konventionell (1:100)
Gasser et al., 1995	Borrelienreduktion auf $\leq 5 \times 10^5$ pro Mikroskopiefeld	10 ¹⁰ /ml	4 d	21 d	konventionell
Baradaran et al., 1996	n	10 ⁶ /ml	72 h	96 h	konventionell
Murgia et al., 1999	kein sichtbares Wachstum (mikroskopisch)	10 ⁶ /ml	7 d	14 d	konventionell (1:40)
Hunfeld et al., 2000b	kein messbarer Indikatorumschlag (photometrisch)	2,5x10 ⁷ /ml	72 h	21 d	konventionell (1:75)
Pavia et al., 2001	Wachstumshemmung (mikroskopisch)	5x10 ⁵ /ml	24-48 h	n	n
Makrodilutionsmethode					
Luft et al., 1988	nicht mehr bewegliche Borrelien als im eingesetzten Inokulum (mikroskopisch)	2x10 ⁶ /ml	48 h	n	konventionell
Johnson et al., 1990a	n	10 ⁵ /ml	21 d	21 d	konventionell (1:10)
Hansen et al., 1992	n	10 ⁵ /ml	7 d	7 d	konventionell (1:70)
Agger et al., 1992	keine beweglichen Borrelien (mikroskopisch)	10 ⁵ /ml	7 d	7 d	konventionell (1:10)
Levin et al., 1993	keine beweglichen Borrelien (mikroskopisch)	10 ⁵ /ml	7 d	21 d	konventionell (1:10)
Janovska et al., 2001	keine Borrelienumultiplikation, Beweglichkeitsverlust (mikroskopisch)	10 ⁶ /ml	48 h, 72 h, 96 h	10 d	konventionell (1:100)

n: nicht definiert

4.1.1 MHK-Bestimmung bei *B. burgdorferi*

Für die Mehrzahl der MHK-Bestimmungen wurden verschiedene Varianten herkömmlicher Mikro- und Makrodilutionsmethoden angewendet (Tabelle 4.1). Dever et al. (1992) vergleichen zwei Methoden: Makro- und Mikrodilutionsmethoden bei einer makroskopischen Resultatsauswertung. Dabei definieren sie die MHK als die niedrigste Antibiotikakonzentration, die kein makroskopisch sichtbares Wachstum (Sediment) und keinen Indikatorumschlag von rot nach gelb, verglichen mit der Wachstumskontrolle, zeigt. Beide Methoden liefern weitgehend identische Resultate. Die Mikrodilutionsmethode ist allerdings einfacher in der Auswertung und benötigt nur kleine Volumina des spezifischen Mediums. In der hier vorgelegten Arbeit wurde daher eine modifizierte kolorimetrische Mikrodilutionsmethode angewendet.

Die meisten Arbeitsgruppen benutzen zur MHK-Bestimmung eine mikroskopische Auswertung. Dabei variieren die MHK-Definitionen von der niedrigsten Antibiotikakonzentration, bei der die Anzahl der beweglichen Borrelien nicht höher als im eingesetzten Inokulum ist, bis zur niedrigsten Konzentration, bei der keine lebensfähigen Borrelien mehr entdeckt werden können (Tabelle 4.1). In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen einer Time-Kill-Untersuchung bei drei Borrelien-Isolaten eine MHK-Bestimmung mittels konventioneller Mikroskopie durchgeführt. Die MHK wurde dabei als die niedrigste Antibiotikakonzentration definiert, bei der die Anzahl der beweglichen Borrelien nicht höher als im eingesetzten Inokulum war. Bei der direkten mikroskopischen Zählung ist das relativ exakte Erfassen der Borrelienzahl von Vorteil. Nachteilig an diesem Verfahren ist jedoch ein hoher Arbeitsaufwand.

Einige Autoren beurteilen das Borrelienwachstum makroskopisch anhand des Vorhandenseins bzw. Fehlens eines Zellsedimentes sowie eines Farbumschlages des BSK-Mediums während der Inkubationszeit (Dever et al., 1992). Bei aktiver Metabolisierung der Borrelien werden im BSK-Medium nichtflüchtige Säuren akkumuliert. Die Mediumansäuerung kann durch einen Farbumschlag des Indikators Phenolrot von rot nach gelb erfasst werden. Die makroskopische Auswertung ist hingegen untersucherabhängig und die präzise Bestimmung der MHK ist oftmals aufgrund des langsamen Wachstums einiger Borrelien-Isolate schwierig.

In der vorliegenden Arbeit wurde für die MHK-Bestimmung des Ketolid-Antibiotikums Cethromycin eine kolorimetrische Mikrodilutionstestmethode mit einer photometrischen Auswertung benutzt (Hunfeld et al., 2000a). Diese Methode basiert auf einer

photometrischen Erfassung der Extinktionswert-Änderung beim Farbumschlag des mit Phenolrot versetzten BSK-Mediums nach 72 h Inkubationszeit (E_{t72}) im Vergleich zur Initialextinktion (E_{t0}). Die Methode ist untersucherunabhängig und die Resultate sind computerunterstützt auswertbar, reproduzierbar und gut dokumentierbar. Die mikroskopische Auswertung von MHKs bei den drei Borrelien-Isolaten, die im Rahmen einer Time-Kill-Studie durchgeführt wurde, liefert im Vergleich zu den kolorimetrisch ermittelten Ergebnissen der Literatur übereinstimmende Ergebnisse (Tabelle 4.2). Die computerunterstützte, photometrische MHK-Auswertung ist im Vergleich zur mikroskopischen Zählung von motilen Borrelien anwenderfreundlicher und erlaubt es, mit wesentlich geringerem Zeitaufwand mehrere Borrelien-Isolate und Antibiotika gleichzeitig zu testen.

Tabelle 4.2: Vergleich von mikroskopischer und photometrischer MHK-Auswertung.

Antibiotika	Eigene Resultate (siehe Tabelle 3.3)	Literaturdaten ^{1,2}
	MHK $\mu\text{g/ml}$ (mikroskopisch ³)	MHK $\mu\text{g/ml}$ (photometrisch ⁴)
<i>B. afzelii</i> EB 1		
Ciprofloxacin	1	1
Sitafoxacin	0,25	0,25
Gemifloxacin	0,06	0,12
Doxycyclin	0,25	0,125
Ceftriaxon	$\leq 0,016$	0,03
<i>B. garinii</i> PStH		
Ciprofloxacin	0,5	0,5
Sitafoxacin	0,125	0,125
Gemifloxacin	0,06	0,06
Doxycyclin	0,25	0,5
Ceftriaxon	$\leq 0,016$	0,015
<i>B. burgdorferi</i> s. s. Pka-1		
Ciprofloxacin	0,5	1
Sitafoxacin	0,25	0,25
Gemifloxacin	0,06	0,12
Doxycyclin	0,25	0,125
Ceftriaxon	$\leq 0,016$	0,015

1 Hunfeld et al., 2000a; 2 Kraiczy et al., 2001

3 Bei der mikroskopischen MHK-Auswertung wurde die MHK definiert als die niedrigste Antibiotikakonzentration, bei der die ermittelte Borrelienzahl durch das Zählen der motilen Borrelien nach 72 h Inkubationszeit nicht größer als im Inokulum war.

4 Bei der photometrischen MHK-Auswertung wurde die MHK definiert, als die niedrigste Antibiotikakonzentration, bei der kein photometrisch messbares Wachstum von Borrelien nach 72 h Inkubationszeit vorlag.

4.1.2 Interaktion zwischen den getesteten Antibiotika und dem BSK-Medium

Bei längeren Inkubationsperioden ist eine Interaktion zwischen den getesteten Antibiotika und dem BSK-Medium möglich. Dever et al. (1992) demonstrieren eine Reduktion der initialen Penicillinkonzentration auf 17 % nach 72 h und auf 2 % nach 7 Tagen Inkubationszeit bei 34° C in BSK-Medium. Bei Ceftriaxon finden sie eine entsprechende Reduktion der Konzentration auf 73 % und 47 %. Die Empfindlichkeitsbestimmung bei den im Medium nicht stabilen Antibiotika, z. B. den Penicillinen, kann daher bei längerer Inkubationsdauer problematisch sein. Die Dialyse-Kultur-Methode mit einer täglichen Antibiotika-Supplementierung könnte hierzu eine Alternative darstellen (Stiernstedt et al., 1999), ist aber nur schwer standardisierbar. Aktivitätsverluste von Antibiotika während der Inkubationszeit können sowohl auf der chemischen Instabilität des Antibiotikums basieren, als auch auf die enzymatische Aktivität des BSK-Mediums zurückgeführt werden.

Zur Überprüfung einer möglichen Inaktivierung von Antibiotika durch das BSK-Medium bei 33°C mit 5 % CO₂ bis zu 120 h wurden MHKs von zwei Referenzstämmen *S. aureus* ATCC 29213 und *E. faecalis* ATCC 29212 nach 0 h, 72 h und 120 h Inkubationszeit in BSK-Medium verglichen. Auf diese indirekte Weise, ohne die Konzentration der Antibiotika im BSK-Medium direkt nach der festgelegten Inkubationszeit zu bestimmen, konnte der Rückschluss auf die Antibiotika-Stabilität im BSK-Medium und die praktische Relevanz einer eventuellen Konzentrationsabnahme für die MHK Bestimmung getroffen werden. So lagen die MHKs ermittelte nach 120 h nur um maximal eine geometrische Verdünnungsstufe höher als die MHKs nach 0 h (Tabelle 3.2). Des Weiteren lagen die MHKs im Bereich der für die Antibiotika existierenden entsprechenden CLSI Grenzwerte (CLSI, 2006). Die Vorinkubation der Antibiotika-Platten mit dem BSK-Medium für einen Zeitraum von bis zu 120 h hatte daher keinen relevanten Einfluss auf die ermittelte MHKs der Referenzstämme. Somit wurde zumindest nach 120 h bei keinem der getesteten Antibiotika eine für die MHK Bestimmung signifikante Interaktion mit dem BSK-Medium festgestellt.

4.1.3 Einfluss des Inokulums auf die *in vitro*-Empfindlichkeitstestung von *B. burgdorferi*

Boerner et al. (1995) beobachten bei der Verwendung zweier Auswertungsverfahren Unterschiede in Bezug auf die MHK-Resultate. Bei der mikroskopischen Auswertung hat das Inokulum keine entscheidende Bedeutung. Dagegen zeigt ein Inokulum von 10^7 Borrelien/ml bei der makroskopischen Auswertung eine bessere Übereinstimmung der MHK mit der mikroskopischen Auswertung als ein Inokulum von 10^6 Borrelien/ml (Boerner et al., 1995). Einige Borrelien-Isolate haben eine relativ lange Generationszeit und zeigen somit nur einen langsamen Anstieg der unlöslichen Säuren im BSK-Medium als Indikator der Stoffwechselaktivität der Borrelien (Hunfeld et al., 2000a; Dever et al., 1999). Da die Methoden mit einer makroskopischen wie auch einer photometrischen Auswertung des MHKs auf den Farbumschlag des BSK-Mediums angewiesen sind, ist es wichtig, die geeignete Borrelienmenge einzusetzen oder die Inkubationszeit dementsprechend zu verlängern (Dever et al., 1999). Ein Inokulum von 10^6 Borrelien/ml für die makroskopische Auswertung ist aufgrund des zu schwachen Indikatorfarbwechsels nicht zu empfehlen (Boerner et al., 1995).

Murgia et al. (1999), die eine Mikrodilutionsmethode mit mikroskopischer Auswertung benutzen, finden keinen Hinweis auf einen Einfluss der Inokulumgröße von 5×10^4 bis 5×10^6 Borrelien/ml auf MHKs und MBKs von Cefodizime bei dem *B. burgdorferi* s.-Isolat B 31. Luft et al. (1988) finden ebenfalls keinen Hinweis auf eine Beeinflussung der Überlebensrate von Penicillin und Ceftriaxon inkubierten Borrelien bei einem Inokulum von 10^6 bis 10^7 Borrelien/ml.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein Inokulum von $2,5 \times 10^7$ Borrelien/ml benutzt. Diese Borrelienmenge erlaubt bei photometrischer Auswertung nach 72 h eine eindeutige Erfassung des Farbumschlages im BSK-Medium als Ausdruck der OD-Reduktion bei einer computerunterstützten Auswertung der MHK-Bestimmung (Hunfeld et al., 2000a). Außerdem ermöglicht die größere Borrelienmenge bei der Durchführung von Time-Kill-Experimenten eine genauere Beobachtung der Abtötungskinetik.

4.1.4 Einfluss der Inkubationsdauer auf die *in vitro*-Empfindlichkeitstestung von *B. burgdorferi*

Für eine bessere Vergleichbarkeit der Antibiotikaempfindlichkeit ist auch die Inkubationsdauer für die MHKs sowie die Subkultivierungsdauer für die MBK-Ermittlungen von entscheidender Bedeutung.

Bei den im Rahmen der vorgestellten Arbeit durchgeführten Time-Kill-Experimenten wurde ab 72 h eine zunehmende Borrelienabtötung beobachtet (Abbildung 3.3-3.8). Bei einer MHK-Ermittlung nach 72 h konnte die Grenze zwischen wachsenden und gehemmten Borrelien bereits gut erkannt werden. Auch Dever et al. (1999) finden eine Inkubationsdauer von 72 h ausreichend. Bei langsam wachsenden, niedrigpassagierten Borrelien-Isolaten sowie bei einer makroskopischen Auswertung der MHK Bestimmung muss jedoch die Inkubationsdauer bei der makroskopischen Auswertung zusätzlich noch um 24 h bis 48 h verlängert werden. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass eine längere Inkubationszeit besonders bei der Empfindlichkeitsprüfung von weniger stabilen Antibiotika, z. B. von Penicillin, problematisch sein kann (Stiernstedt et al., 1999). Eine verlängerte Antibiotika-Expositionszeit beeinflusst auch die MBK-Auswertung (Tabelle 3.5). Somit ist für eine Standardisierung der Borrelien-Empfindlichkeitsprüfung, besonders für den Vergleich der Resultate zwischen verschiedenen Labors, eine methodische Vereinheitlichung der Inkubationszeit wichtig.

4.1.5 MBK-Bestimmung bei *B. burgdorferi*

Alle in Tabelle 4.1 angegebenen Arbeitsgruppen definieren die MBK als die niedrigste Antibiotikakonzentration, bei der in der Subkultur keine Borrelien entdeckt werden können. Die dabei verwendeten Methoden unterscheiden sich allerdings deutlich voneinander (Tabelle 4.1). Dever et al. (1992) führen Vergleichsexperimente bei der MBK-Bestimmung unter Ceftriaxon gegen das *B. burgdorferi* s. s.-Isolat B31 durch. Im Vergleich zu den mittels Subkultivierung im flüssigen BSK-Medium ermittelten MBKs (0,125 µg/ml) stellen sie signifikant niedrigere MBKs bei der Anwendung der „subsurface plating“ Methode (MBK 0,03 µg/ml) fest. Bei der „subsurface plating“ Methode werden antibiotikainkubierte Borrelien auf einen festen Nährboden überimpft. Um eine Austrocknung zu vermeiden, werden die Platten mit dem vortemperierten, noch flüssigen Medium übergossen. Das Borrelienwachstum wird durch Nachweis von weißen Kolonien beurteilt. Die Borrelien-Isolate benötigen auf festem Nährboden oft aber eine längere Adaptationsperiode als im flüssigen BSK-Medium (Hunfeld et al., 2002). Die Subkultivierungsdauer wurde von Dever et al. (1992) zudem relativ kurz mit nur 10 bis 12 Tagen festgelegt.

In der vorgelegten Arbeit wurden bei der MBK-Bestimmung antibiotikaexponierte Borrelien nach 72 h in frischem, antibiotikafreiem flüssigem BSK-Medium für drei Wochen subkultiviert. Bei der Überimpfung von antibiotikaexponierten Borrelien in frisches BSK-Medium wird eine geringe Menge von Antibiotika ins Subkultivierungsmedium verschleppt. Um in der Subkultur eine Verdünnung zumindest unter die MHK des jeweiligen Antibiotikums zu erzielen und so eine Störung der Ergebnisse durch Restinhibition zu vermeiden, wurde bei Cethromycin wegen der sehr niedrigen MHKs eine höhere Verdünnung von 1:1000 und bei den übrigen getesteten Antibiotika eine Verdünnung von 1:75 angewandt.

Levin et al. (1993) verdünnen die antibiotikaexponierten Borrelien bei der Subkultivierung nur um den Faktor 10 (Tabelle 4.1). In den somit entstandenen Endverdünnungen (1:10) wird das Borrelienwachstum bei der Antibiotikakonzentration inhibiert, die der festgestellten MHK entspricht. Dabei berichten sie über MBKs, die dementsprechend um den Faktor 10 höher als MHKs liegen (Tabelle 4.3). Die Beurteilung der Abtötungsaktivität von Antibiotika mittels der durch Verdünnung der Enokulumsuspension im Flüssigmedium bestimmten MBKs ist daher insbesondere bei Antibiotika mit extrem niedrigen MHKs und hoher chemischen Stabilität problematisch. Auch ein postantibiotischer Effekt kann unter Umständen eine Rolle spielen (Davies et al., 2000). Es ist daher wichtig andere Parameter, die eine Abtötungsaktivität abschätzen lassen, z. B. Time-Kill-Kinetik in

die Beurteilung einzubeziehen. Decazes et al. (1983) und Chandrasekar et al. (1987) konnten eine bessere Korrelation zum Therapieerfolg bei MHK- und Time-Kill-Kinetik im Vergleich zur Bestimmung von MBKs zeigen. So können bestehende methodische Probleme bei der MBK-Prüfung berücksichtigt werden und die MBK-Bestimmung wird zusätzlich abgesichert und optimiert.

Tabelle 4.3: Literaturübersicht von berichteten mittleren MHK- und MBK-Werten von *B. burgdorferi*.

Autoren	Ceftriaxon		Doxycyclin		Ciprofloxacin	
	MHK	MBK	MHK	MBK	MHK	MBK
	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
Preac-Mursic et al., 1987	0,06-0,25	n	n	n	1-4	n
Luft et al., 1988	0,03	3,8	n	n	n	n
Johnson et al., 1990a	n	0,08	n	1,6	n	n
Agger et al., 1992	0,02	0,02-0,04	n	n	n	n
Hansen et al., 1992	n	0,03-0,06	n	0,5-4	n	n
Dever et al., 1992; 1999	0,03-0,06	n	1,0-2	n	n	n
Levin et al., 1993	n	n	0,125-0,5	0,25-4	0,25-2	0,5-16
Baradaran et al., 1996	0,006-0,1	0,06-0,8	0,1-0,8	0,2-1,6	n	n
Murgia et al., 1999 ^a	0,03-0,06	0,3-0,12	n	n	0,03-4	0,06-16
Hunfeld et al., 2002 ^b	0,04	2	0,25	n	2	16

a Murgia et al. (1999), untersuchten hoch- und niedrigpassagierte Isolate

b Hunfeld et al. (2002): MHK₉₀, mittlere MBK

n Daten nicht vorhanden

4.1.6 Charakterisierung des Abtötungseffektes von Antibiotika auf *B. burgdorferi* mittels Time-Kill-Kinetik

Die Dosierungen von Antibiotika werden häufig empirisch ermittelt. Die Bestrebung, die Antibiotikatherapie auf eine rationalere Basis zu stellen, wurde vor allem durch intensive Forschung auf dem Gebiet der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik vorangebracht. Anfang der 90er Jahre wurden auf der Basis von *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen zur Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der Antibiotika, Absterbekinetiken, pharmakologischen Indizes und das sogenannte Pharmakokinetik-Pharmakodynamik-Modeling als methodische Instrumente eingeführt, die zum Vergleich unterschiedlicher Antibiotika-Wirkungen herangezogen werden können. Allerdings ermöglichen die derzeit in der Literatur beschriebenen mathematischen Modelle keine universelle Anwendung (Barger, 2003b).

Mehrere Methoden werden dabei für die Evaluation der pharmakodynamischen Aktivität von Antibiotika benutzt. Die ersten Methoden, die die Pharmakokinetik in der Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit berücksichtigten, waren die Inhibitions- und Bakterizidie-Serum-Tests (Wallrauch-Schwarz et al., 1993; Hyatt et al., 1994). Es wurde beobachtet, dass MHK- und Time-Kill-Kinetik (Absterbekinetik) eine bessere Korrelation zum Therapieerfolg im Vergleich zu Bestimmung von MBKs zeigen (Decazes et al., 1983; Chandrasekar et al., 1987). Eine Absterbekinetik liefert Daten über das Absterbeverhalten eines Erregers in Abhängigkeit von der Zeit und über das Ausmaß der Abtötung. Sie liefern somit eine genaue Aussage über die Wirkung eines Antibiotikums während einer bestimmten Einwirkungszeit, z. B. über die initiale oder terminale Abtötungsphase. Die Ermittlung des Absterbeverhaltens von Bakterien kann bei konstanten Antibiotikakonzentrationen oder aber unter definierten, sich periodisch ändernden Antibiotikakonzentrationen in einem *in vitro*-Modell erfolgen. Pharmakologische *in vitro*-Modelle ermöglichen die Simulation der humanen Pharmakokinetik bei gleichzeitiger Untersuchung des Absterbeverhaltens der Bakterien (Grasso et al., 1978). Die Anwendung solcher *in vitro* pharmakokinetischer Methoden erlaubt eine Empfindlichkeitsprüfung im Rahmen von Bedingungen, welche den *in vivo*-Verhältnissen sehr nahe kommen. Sie sind allerdings technisch aufwendig (Wiedemann, 1983; Firsov et al, 2000; Barger, 2003b).

In der vorliegenden Arbeit wurden während der gesamten Versuchszeit *in vitro*-Absterbekinetiken bei einer konstanten Antibiotikakonzentration im BSK-Medium durchgeführt. Die Abtötungsrate wurde durch die Bestimmung der Zahl von intakten, motilen Borrelien mittels Dunkelfeldmikroskopie im flüssigen BSK-Medium bei geometrisch

verdünnten Antibiotikakonzentrationen nach verschiedenen Inkubationsintervallen bestimmt (Hunfeld et al., 2001; Kraiczy et al., 2001). Kochi und Johnson (1988) definieren abgetötete Borrelien durch den Verlust der Beweglichkeit, die Bildung von Blebs und darüber hinaus durch den Verlust der Unempfindlichkeit gegen Lysozym. Folglich wurden unbewegliche Borrelien als abgestorben bzw. abgetötet angesehen und nur die Beweglichen gezählt (Kraiczy et al., 2001).

Methoden zur Interpretation der Abtötungskinetik können variieren. In der vorgelegten Arbeit wurde mit Hilfe der ermittelten Absterbekinetiken die Zeit bis zum Eintritt einer Bakterienreduktion von $\geq 3 \log_{10}$ und die dafür benötigte Antibiotikakonzentration ermittelt (Abbildung 4.1).

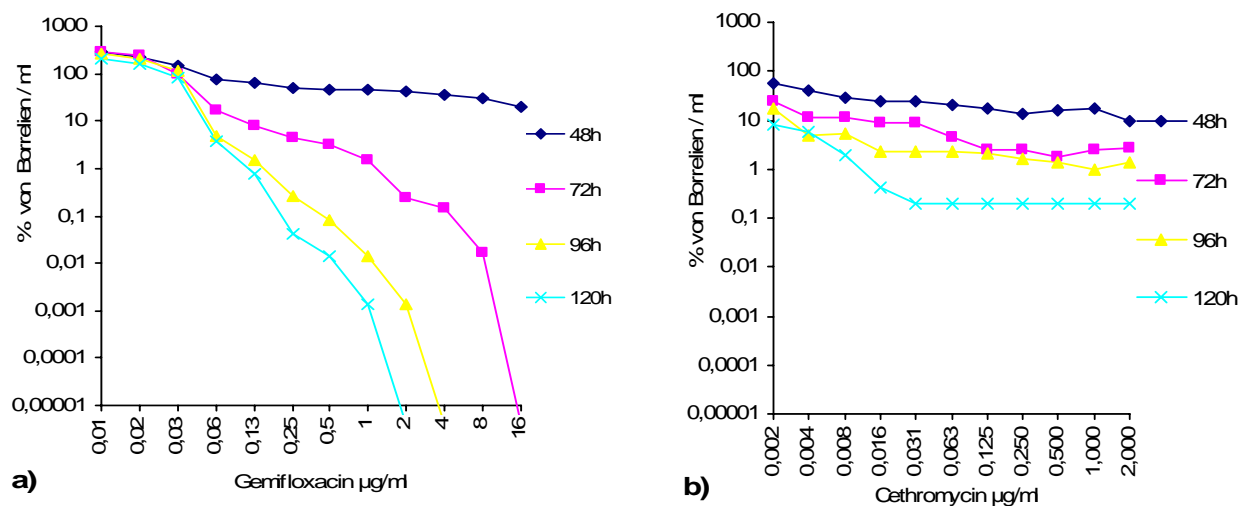


Abbildung 4.1. Absterbekinetik des *B. garinii*-Isolates PStH in Gegenwart von Gemifloxacin (a) und Cethromycin (b).

100 % motile Borrelien entsprechen dem initial eingesetzten Inokulum. Eine 99,9-prozentige Abtötung des Initialinokulums (entspricht 0,1 Prozent der motilen Borrelien) nach 120 h Inkubation mit Antibiotika wurde für Gemifloxacin ab 0,25 µg/ml beobachtet, für Cethromycin allerdings nicht erreicht.

Ab einer Konzentration von 0,06 µg/ml für Gemifloxacin und von $\leq 0,002$ µg/ml für Cethromycin wurde eine Hemmung von Borrelienwachstum beobachtet (MHK).

Ab einer Gemifloxacin-Konzentration von 2 µg/ml konnten nach 120 h keine motilen Borrelien mehr nachgewiesen werden. Gemifloxacin zeigte dabei eher eine konzentrationsabhängige und Cethromycin eher eine zeitabhängige Borrelienabtötung.

Anhand des Kurvenverlaufs konnte auch eine Einteilung der Wirkung des Antibiotikums (konzentrationsabhängige oder zeitabhängige) nach den Definitionen der bakteriziden Wirkungsmuster von Craig (1998) vorgenommen werden. Diese Parameter sind zwar bisher nur für schnell wachsende Bakterien gut definiert und untersucht, könnten sich aber auch für die Entwicklung von Modellen für die Optimierung der Antibiotikatherapie bei

der Lyme-Borreliose als hilfreich erweisen. Die Abtötungskinetik kann auch durch lineare Regression mittels Erfassung der Neigung von Abtötungskurven bei verschiedenen Antibiotikakonzentrationen interpretiert werden (Ross et al., 2001; CLSI, 1999).

Die Abtötungsaktivität ist dabei zum Teil von der Antibiotika-Klasse und der Konzentration abhängig (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4: Pharmakodynamische und pharmakokinetische Wirkung von Antibiotika auf schnell wachsende Bakterien (modifiziert nach Periti und Mazzei, 1999).

Pharmakokinetik		Pharmakodynamik
zeitabhängiger Effekt Antibiotika mit Wirkung auf Zellwandsynthese: z. B. β -Laktame ¹	konzentrationsabhängiger Effekt Antibiotika mit Wirkung auf RNS, DNS und Proteinsynthese: z. B. Fluorochinolone ² , Aminoglykoside ²	MBK, MHK, sub-MHK, postantibiotischer Effekt, postantibiotischer Leukozyteneffekt
Parameter:		
T > MHK	C _{max} /MHK, AUC/MHK	
Dosierungsschema:		
kontinuierliches oder kurzes Dosisintervall	hohe Dosis, langes Dosisintervall	

1 Antibiotika mit einem kurzen postantibiotischen Effekt

2 Antibiotika mit einem langen postantibiotischen Effekt

Bei den Untersuchungen von schnell wachsenden Bakterien konnte bei den Antibiotika, die die Protein- oder Nukleinsäure-Synthese inhibieren z. B. bei Fluorochinolonen und Aminoglykosiden eine Steigerung der Abtötung von Bakterien durch Erhöhung der Antibiotikakonzentration gezeigt werden (Craig, 1998; Periti und Mazzei, 1999). Dies wird als konzentrationsabhängige Aktivität bezeichnet. Im Unterschied dazu ist die Abtötungsrate von Antibiotika mit einer Interaktion an der bakteriellen Zellwand, z. B. den β -Laktamen und bei Vancomycin, relativ langsam und setzt sich nur so lange fort, wie die Antibiotikakonzentration über den jeweiligen MHKs liegt. Dieses Abtötungsmuster wird als zeitabhängige Aktivität bezeichnet (Craig, 1998; Periti und Mazzei, 1999). Auch bei *B. burgdorferi* zeigen Luft et al. (1988) eine zeitabhängige Borrelienabtötung durch Penicillin

und Ceftriaxon sowie eine konzentrationsabhängige Wirkung von Tetracyclin. Allerdings ist eine eindeutige Einteilung der Antibiotika aufgrund ihrer Wirkung gerade bei langsam wachsenden Bakterien häufig relativ schwierig.

So konnte in der vorliegenden Arbeit bei den Fluorochinolonen die Borrelienabtötung bis zum 4-fachen der MHK gesteigert werden. Sie ließ sich allerdings ab der 8-fachen MHK kaum noch steigern. Diese Beobachtung stimmt mit den Testergebnissen der Absterbekinetik von Ciprofloxacin und Moxifloxacin gegenüber *E. coli* durchgeführt von Barger (2003b) in einer Batchkultur (Untersuchungen unter konstanten Antibiotikakonzentrationen) überein. Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit bei Ceftriaxon nach 120 h eine konzentrationsabhängige Borrelienabtötung registriert.

Zum Vergleich der Wirkung und auch zur Vorhersage des Therapieerfolges von verschiedenen Antibiotika werden oft pharmakologische Indizes verwendet, die eine Kombination aus einem pharmakokinetischen und einem pharmakodynamischen Parameter darstellen (Tabelle 4.4) (Craig, 1998; Periti und Mazzei, 1999; Barger et al., 2003a). Für die Auswahl des richtigen Dosierungsintervalls sind sicherlich außer dem Abtötungseffekt auch die Dauer des postantibiotischen Effektes sowie der Einfluss anderer pharmakokinetischer Parameter (Tabelle 4.4) wichtig (Simon und Stille, 2000). Die Pharmakokinetik beschreibt den Konzentrations-Zeit-Verlauf eines Antibiotikums im Organismus. Bei den schnell wachsenden Bakterien wurde bei den so genannten konzentrationsabhängig wirkenden Antibiotika häufig der pharmakologische Index C_{\max}/MHK [dimensionslos] (maximale Plasmakonzentration C_{\max} dividiert durch die MHK des Erregers) und auch der Index AUC/MHK [h] (die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve über 24 h dividiert durch die MHK des Erregers) verwendet (Abbildung 4.2) (Ambrose et al., 2000). Der Index $T_{>\text{MHK}}$ [%] (kumulativer Prozentsatz der Zeit über 24 h, in der die Antibiotikakonzentration über der MHK des Erregers liegt) wird häufig für die zeitabhängig wirkenden Antibiotika verwendet (Mouton, 2002).

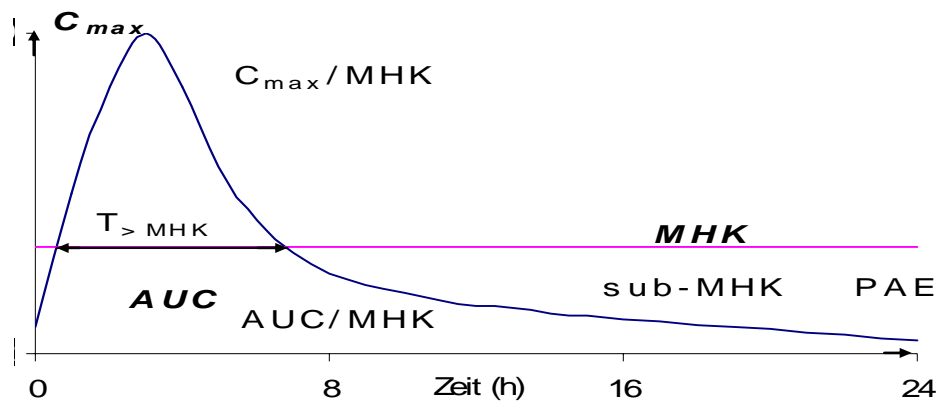


Abbildung 4.2: Zusammenhang zwischen pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Parametern (modifiziert nach Zhanel, 2001).

AUC (area under the curve): das Integral der Konzentrations-Zeit-Kurve über 24 h (gibt Auskunft über die zur Verfügung stehende Substanzmenge im Körper);

C_{max}: höchste Konzentration, die im Serum während des Applikationsintervalls erreicht wird;

PAE: postantibiotischer Effekt;

sub-MHK: Antibiotikakonzentration unter MHK;

C_{max}/MHK, AUC/MHK und T>MHK: pharmakologische Indizes, die eine Kombination aus einem pharmakokinetischen und einem pharmakodynamischen Parameter darstellen.

Experimentelle Daten aus *in vitro*-Modellen, Tiermodellen und klinischen Studien zeigten eine unterschiedlich gute Korrelation zwischen der Höhe des jeweiligen pharmakologischen Index und dem Erfolg der Antibiotikatherapie (Amsten et al., 2000). Allerdings gibt es bei vielen Arbeitsgruppen keine Einigkeit über die Grenzwerte von pharmakologischen Indizes, die einen Therapieerfolg vorhersagen (Tabelle 4.5). Pharmakologischen Indizes kommt daher zumeist nur eine relativ eingeschränkte Aussagekraft im klinischen Kontext zu.

Schentag et al. (2001) sind allerdings der Meinung, dass der Index AUC/MHK als ein universeller Index herangezogen werden kann, der für alle Antibiotikaklassen und für alle Erreger anwendbar ist. Die Dosis der Antibiotikatherapie sollte so gewählt werden, dass ein AUC/MHK-Verhältnis von 1:125 erreicht wird.

Tabelle 4.5: Pharmakologische Indizes in der Literatur (modifiziert nach Barger, 2003a).

C_{\max} /MHK	AUC/MHK h	$T_{>MHK}$ %	Antibiotika- Klasse	Untersuchungen	Referenz
8-12	125	50-60	alle	<i>in vitro</i> -Modell; Tiermodell; Patienten	Forrest et al., 1993
>8 10	125		alle	Patienten	Schentag et al., 2001
10-12	25-30 ^a , 100-125 ^b	40-50	alle	<i>in vitro</i> -Modell; Tiermodell; Patienten	Jacobs, 2001
>8	40 ^c ; 100-125	40-70	alle	<i>in vitro</i> -Modell; Tiermodell; Patienten	Scaglione, 2002
	30-50		Fluorochinolone	<i>in vitro</i> -Modell; Tiermodell; Patienten	Ambrose et al., 2000
>10	40 ^c ; 100-125		alle	<i>in vitro</i> -Modell; Tiermodell; Patienten	Wright et al., 2000
		60-70 ^d ; 40-50 ^e	Cephalosporine	Tiermodell	Craig, 1995
	350-500		alle	gesunde Freiwillige	Hyatt et al., 1994
20			Fluorochinolone	Mausmodell	Drusano et al., 1993

a) leichte Infektion; b) schwere Infektion; c) grampositive Erreger; d) gramnegative Erreger; e) Therapie der Bronchitis

Die pharmakologischen Indizes, die eine Kombination aus pharmakokinetischen und einem pharmakodynamischen Parameter darstellen wurden zum Vergleich der Wirkung und auch zur Vorhersage des Therapieerfolges von verschiedenen Antibiotika verwendet.

Zur besseren Vergleichbarkeit der bakteriziden Wirksamkeit bei verschiedenen Fluorochinolonen hat Morrissey (1997) für Experimente an schnell wachsenden Bakterien einen neuen Index, den so genannten Bakterizidie-Index (BI) eingeführt.

4.1.7 Bakterizidie-Indizes bei *B. burgdorferi*

In der vorgelegten Arbeit wurden Time-Kill-Kinetiken bei drei Borrelien-Isolaten in Gegenwart von sechs verschiedenen Antibiotika jeweils nach 48 h, 72 h, 96 h und 120 h durchgeführt (Abbildungen 3.3 bis 3.8). Die ermittelten Absterbekinetiken wurden als Basis für die Errechnung von BI herangezogen (Morrissey, 1997). Morrissey (1997) setzt die BIs zum Vergleich der Antibiotikawirkung von Substanzen, die zu einer Antibiotika-Klasse gehören, zu Fluorochinolonen.

In der vorgelegten Arbeit wurden BIs bei allen untersuchten Antibiotika ermittelt. Da bei den Fluorochinolonen drei Antibiotika untersucht wurden, war es auch möglich, einen Vergleich der Abtötungsaktivität zwischen diesen drei Antibiotika durchzuführen. Bei den anderen Antibiotika wurde lediglich ein Vergleich der Antibiotikawirkung zwischen den drei untersuchten Borrelienisolaten durchgeführt.

Der BI ist ein relatives Maß für die Zahl der abgestorbenen Bakterien und wird mittels Integration der Fläche unter der Absterbekurve berechnet (Abbildung 4.3):

y-Achse – Log_{10} - Inokulumreduktion;

x-Achse – Log_{10} - Antibiotikakonzentration, bis zu $\log\text{-}C_{\text{max}}$.

Der BI reflektiert das Abtötungspotenzial der klinisch relevanten, im Körper erreichbaren Antibiotikakonzentrationen, da in der Berechnung der BI die maximal zu erreichenden Antibiotikakonzentration im Serum (C_{max}) für das jeweilige Antibiotikum eingeschlossen wird. Der BI erlaubt somit eine Aussage über das bakterizide Potenzial eines Antibiotikums durch den einfachen Vergleich der BIs von untersuchten Antibiotika (Abbildung 3.9 – 3.11).

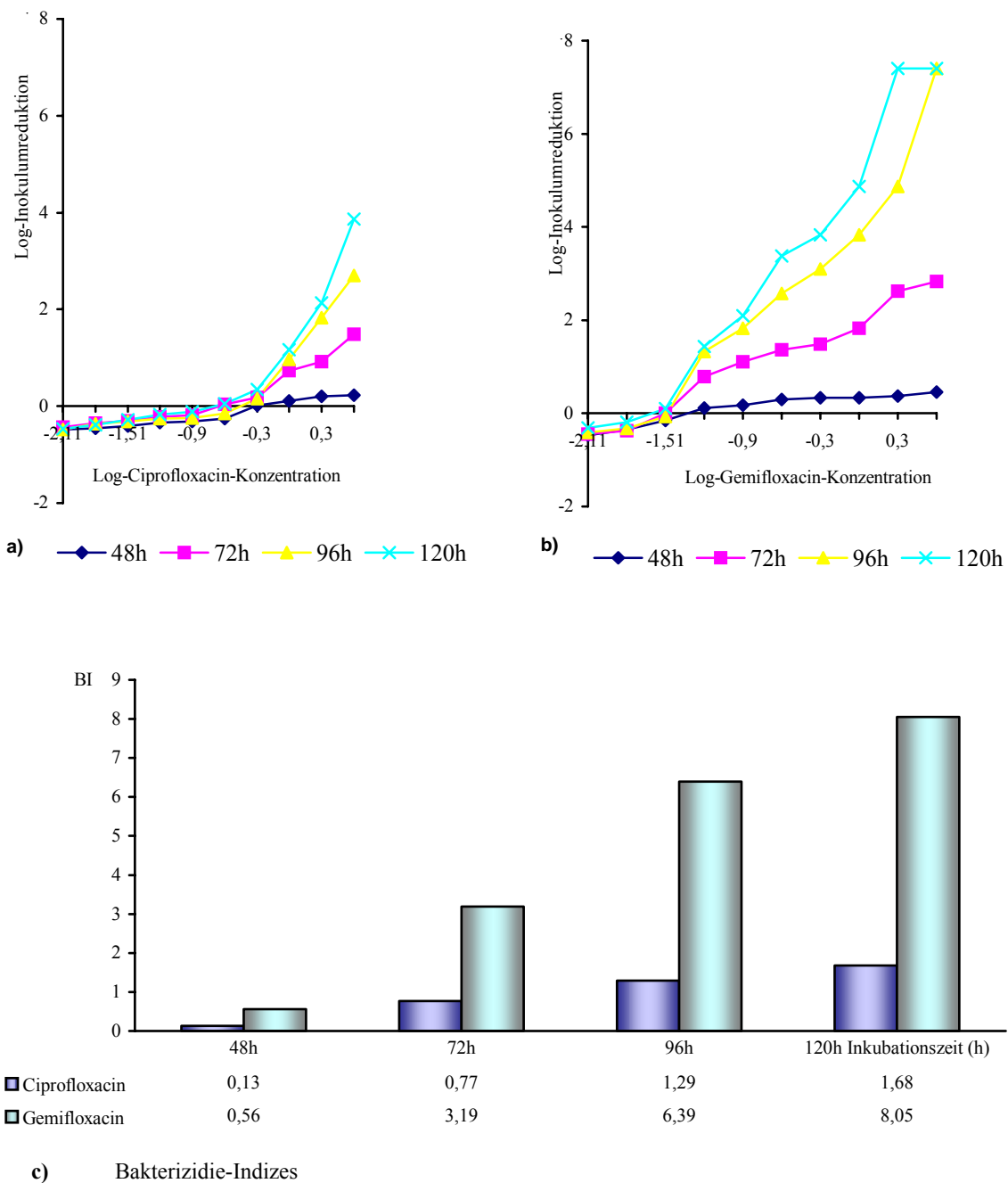


Abbildung 4.3. Abtötungspotenzial von Ciprofloxacin (a) und Gemifloxacin (b) für das *B. garinii*-Isolat PStH. Im Vergleich zu Ciprofloxacin zeigt Gemifloxacin eine größere Borrelienabtötung, die in Form von Bakterizidie-Indizes (c), als die Fläche unter dem bakteriziden Teil der Abtötungskurven nach 48 h, 72 h, 96 h und 120 h Inkubation errechnet werden kann.

4.2 Standardisierte *in vitro*-Empfindlichkeitstestung von *B. burgdorferi* gegen klinisch bewährte und neu entwickelte Antibiotika – möglicher Wegweiser für neue therapeutische Optionen bei der Therapie der Lyme-Borreliose

Bei der Anwendung von antibakteriellen Chemotherapeutika ist außer der Kenntnis über ihre Wirkungsmechanismen, Wirkungsspektren und Wirkungsqualität (bakteriostatisch oder bakterizid) auch das Wissen über die Pharmakokinetik (Resorptionsrate, Verteilungsvolumen, Gewebediffusion, Proteinbindung, Serum- und Gewebekonzentration, Metabolisierung und Elimination) und Pharmakodynamik sehr wichtig. Die Empfindlichkeit der Erreger, die Pharmakokinetik und die Verträglichkeit der Antibiotika sowie die Lokalisation des Krankheitsprozesses müssen daher bei der Auswahl der Substanz und der richtigen Dosierung berücksichtigt werden. Die Behandlungsergebnisse können jedoch in der Kombination mit der körpereigenen Abwehr (Phagozytose, humorale und zelluläre Immunität) erheblich besser sein als zunächst erwartet (Simon und Stille, 2000).

Die ersten empirischen antibiotischen Studien bei der Lyme-Borreliose demonstrierten eine schnellere Ausheilung des EM unter Therapie mit Penicillin oder Tetracyclin (Satz, 2002). Klinisch bewährte Antibiotika wie Ceftriaxon und Doxycyclin gelten heute als Therapiestandard. Als Alternative, z. B. bei der β -Laktam-Allergie bei Schwangeren oder Kindern unter 8 Jahren, werden oft Makrolide eingesetzt. Trotz guter *in vitro*-Ergebnisse mit den halbsynthetischen Makroliden Azithromycin und Clarithromycin (Preac-Mursic et al., 1989; Johnson et al., 1990b; Dever et al., 1993a) werden oft Diskrepanzen zwischen der *in vitro*- und *in vivo*-Aktivität von Antibiotika dieser Klasse bei *B. burgdorferi* beobachtet (Hansen et al., 1992). Trotz zahlreicher neuer Untersuchungen sind universelle und über eine ausreichende Anzahl von klinischen Studien abgesicherte, stadiengerechte Behandlungsschemata für die antibiotische Therapie der Lyme-Borreliose noch nicht abschließend etabliert und die Antibiotikatherapie bei Lyme-Borreliose bedarf u. U. weiterer Modifikationen (Tabelle 1.3). Der Therapieerfolg wird allerdings nicht nur durch die Antibiotikaempfindlichkeit von *B. burgdorferi*, sondern auch durch andere Faktoren, wie z. B. die Penetration des Antibiotikums in das infizierte Gewebe, die Größe des Inokulums und nicht zuletzt durch die körpereigene Abwehr bestimmt.

4.2.1 *In vitro*-Empfindlichkeitstestung von *B. burgdorferi* gegen Cethromycin

Makrolide gelten als Alternativantibiotika bei Kontraindikationen gegenüber Doxycyclin, z. B. bei Kindern und bei Penicillin- bzw. Cephalosporin-Allergie. Das neue halbsynthetische Ketolid-Antibiotikum Cethromycin (3-Keto-Makrolid), das aufgrund der chemischen Struktur eine effektivere Hemmung der Translation durch die bessere Bindung an der 50 S-Untereinheit der Ribosomen hat (Champney et al., 2001), wurde deshalb in unsere Untersuchungen mit eingeschlossen.

Bei allen 17 getesteten Borrelien-Isolaten wurden mittels kolorimetrischen Mikrodilutionsverfahrens MHKs bestimmt, die bei $\leq 0,002 \mu\text{g/ml}$ lagen. Diese Konzentration liegt erheblich unter der maximal erreichbaren Konzentration für diese Substanz im Serum (C_{max} nach 200 mg p. o. $0,18 \mu\text{g/ml}$) (Tabelle 2.3).

Auch im Rahmen der durchgeführten Time-Kill-Kinetik der drei Borrelien-Isolate EB 1 (*B. afzelii*), PStH (*B. garinii*) und Pka-1 (*B. burgdorferi* s. s.) wurde bestätigt, dass bereits bei der niedrigsten in der Untersuchung eingeschlossenen Konzentration keine Vermehrung der Borrelienzahl im Vergleich zur initial eingesetzten Borrelienmenge vorlag (Abbildung 3.6). Aufgrund des für unsere Untersuchungen verfügbaren Konzentrationsbereiches für Cethromycin zwischen $0,002 \mu\text{g/ml}$ und $2 \mu\text{g/ml}$ war eine exakte Bestimmung der MHKs für die einzelnen Isolate nicht möglich (Abbildung 3.6). Die MHKs liegen aber offensichtlich tiefer, was auch in einer zwischenzeitlich publizierten Nachfolgestudie bestätigt werden konnte (Hunfeld et al., 2004). Diese Tatsache hatte möglicherweise auch Auswirkungen auf die errechnete BIs. Diese waren schon nach 48 h verhältnismäßig hoch, was wahrscheinlich eine rasche Entfaltung der inhibitorischen Aktivität zu diesem früheren Zeitpunkt widerspiegelt.

Die MBKs lagen bei diesen drei Isolaten zwischen $0,25 \mu\text{g/ml}$ bis $0,5 \mu\text{g/ml}$. Allerdings waren in den Time-Kill-Untersuchungen auch bei den höheren Konzentrationen noch morphologisch intakte bewegliche Borrelien nach 120 h nachweisbar (Tabelle 3.7). Bei der MBK-Bestimmung können eine Restinhibition, bzw. ein erheblicher postantibiotischer Effekt aber nicht sicher ausgeschlossen werden.

Eine Borrelienreduktion um $3 \log_{10}$ -Stufen wurde nach 120 h bei dem *B. burgdorferi* s. s.-Isolat Pka-1 bei $0,03 \mu\text{g/ml}$ erreicht (Tabelle 4.6). Bei den zwei anderen Isolaten konnte zwar nur eine $2,5 \log_{10}$ -Stufen-Reduktion erreicht werden, allerdings schon bei sehr niedrigen Konzentrationen von nur $0,03$ - $0,016 \mu\text{g/ml}$. Die errechnete BIs waren bei *B. burgdorferi* s. s.-Isolat Pka-1 wesentlich höher (Tabelle 4.6). Auch Henneberg und Neubert (2002) stellten bei

der Untersuchung von 24 Borrelienisolaten höhere Empfindlichkeit von Erythromycin bei *B. burgdorferi* s. s. im Vergleich mit zwei anderen Genospezies.

Des Weiteren bewirken höhere Antibiotikakonzentrationen bei Cethromycin offensichtlich keine oder eine nur minimale abtötende Aktivität (Abbildungen 3.6 und 7.1-7.3). Es zeigte sich somit für dieses proteinbiosynthesehemmende Antibiotikum eine eher zeitabhängige Abtötungskinetik. Auch die errechnete BIs zeigen von 48 h bis 120 h keine starke Zunahme in der Höhe des Index. Somit würde bei einem möglichen Therapieeinsatz in einem immunkompetenten Organismus eine Cethromycin-Konzentration knapp über MHK ausreichen, um eine Wirksamkeit gegen Borrelien zu erzielen. Ein Vorteil dieses Antibiotikums für die Therapie wäre auch sein bekanntermaßen langer postantibiotischer Effekt (Davies et al., 2000).

Eine weitgehende klinische Evaluation des neuen Ketolids Cethromycin, mit einer stärkeren Inhibition der Proteinsynthese infolge einer höheren Bindungsstärke an die 23 S rRNA, der 50 S-Einheit, ist, im Hinblick auf einen möglichen Einsatz in der Borreliose-Therapie, z. B. beim Vorliegen einer β -Laktamallergie, von Interesse. Das Antibiotikum ist bisher nur in den USA zur Atemwegtherapie zugelassen und die Erfahrungen in der klinischen Anwendung sind gering. Daher sind vor einem klinischen Einsatz zunächst weitere Studien bei Lyme-Borreliose-Patienten notwendig, zumal Diskrepanzen zwischen *in vitro*-Resultaten und klinischen Erfahrungen bei Makrolidabkömmlingen in der Therapie der Lyme-Borreliose keine Seltenheit sind (Hansen et al., 1992; Hunfeld et al., 2005).

Tabelle 4.6: *In vitro*-Empfindlichkeitstestungen von drei *B. burgdorferi*-Isolaten gegen sechs Antibiotika

Isolat	Antibiotika	MHK ($\mu\text{g/ml}$) Mittelwert	Antibiotikakonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$), bei denen eine Borrelienreduktion von $\geq 3 \log_{10}$ Stufen erreicht wurde					Antibiotikakonzentrationen ($\mu\text{g/ml}$), bei denen keine Borrelien mehr nachweisbar waren				Bakterizidie-Index			
			72 h	48 h	72 h	96 h	120 h	48 h	72 h	96 h	120 h	48 h	72 h	96 h	120 h
<i>B. afzelii</i> EB 1	Ciprofloxacin	1	n	n	n	8	+	+	+	+	0,26	0,47	0,70	1,55	
	Sitafloxacin	0,25	n	n	n	2	+	+	+	+	0,30	1,12	2,16	3,85	
	Gemifloxacin	0,06	n	16	4	0,25	+	+	+	+	0,46	3,22	4,98	6,91	
	Cethromycin	$\leq 0,002$	n	n	n	0,03 ($2,5 \log_{10}$)	+	+	+	+	2,01	3,07	3,65	5,00	
	Doxycyclin	0,25	n	16	2	2	+	+	16	8	0,75	1,44	2,63	3,15	
	Ceftriaxon	$\leq 0,016$	n	1	0,13	0,06	+	+	2	0,25	5,94	8,83	14,45	17,75	
<i>B. garinii</i> PSth	Ciprofloxacin	0,5	n	n	8	4	+	+	16	8	0,13	0,77	1,29	1,68	
	Sitafloxacin	0,125	n	n	4	1	+	+	16	4	0,33	1,52	2,90	4,96	
	Gemifloxacin	0,06	n	8	0,5	0,25	+	16	4	2	0,56	3,19	6,39	8,05	
	Cethromycin	$\leq 0,002$	n	n	n	0,016 ($2,5 \log_{10}$)	+	+	+	+	1,50	2,94	3,72	5,43	
	Doxycyclin	0,25	n	32	16	4	+	+	32	16	0,48	1,14	1,96	2,81	
	Ceftriaxon	$\leq 0,016$	n	8	0,25	0,03	+	+	8	0,25	4,12	6,61	11,76	18,48	
<i>B. burgdorferi</i> s. s. Pka-1	Ciprofloxacin	0,5	n	n	n	16	+	+	+	+	0,22	0,31	0,63	0,90	
	Sitafloxacin	0,25	n	n	n	16	+	+	+	+	0,21	0,51	1,07	2,27	
	Gemifloxacin	0,06	n	n	n	1 ($2,5 \log_{10}$)	+	+	+	+	0,37	0,95	1,82	3,22	
	Cethromycin	$\leq 0,002$	n	n	n	0,03	+	+	+	+	2,24	2,77	4,40	7,59	
	Doxycyclin	0,25	n	16	4	2	+	+	8	8	0,63	0,74	2,31	3,02	
	Ceftriaxon	$\leq 0,016$	n	4	1	0,25	+	+	+	1	2,16	6,78	8,43	14,96	

n: Borrelienreduktion von $\geq 3 \log_{10}$ Stufen nicht erreicht

+ Nachweis von morphologisch intakten beweglichen Borrelien

4.2.2 *In vitro*-Empfindlichkeitstestung von *B. burgdorferi* gegen Fluorochinolone (Ciprofloxacin, Sitafloracin, Gemifloxacin)

Im Jahre 1988 wurde bei acht Patienten mit Dermatorborreliose (sieben Patienten mit Erythema migrans und ein Patient mit Acrodermatitis chronica atrophicans) ein Therapieversuch mit Ciprofloxacin, einem Fluorochinolon der 2. Generation, in einer Dosierung von 2 x 250 mg p. o. für 10 Tage unternommen. Wegen der nicht zufriedenstellenden Resultate (rasche Rezidive) wurde Ciprofloxacin als ungeeignet zur Therapie einer Borreliose angesehen (Meisel und Blenk, 1988). Meisel und Blenk (1988) wählten allerdings eine sehr niedrige Dosierung (2 x 250 mg / Tag) von Ciprofloxacin (vergl. Tabelle 2.3). Des Weiteren stellen Lakos und Nagy (1999) bei der *in vitro*-Synergismus-Untersuchung von Pefloxacin in Kombination mit Doxycyclin und Ceftriaxon gegenüber Borrelien keinen synergistischen Effekt fest. Aufgrund der nur schwachen Aktivität der frühen Fluorochinolone werden diese Substanzen derzeit nicht zur Therapie der Lyme-Borreliose eingesetzt (Preac-Mursic et al., 1987; Simon und Stille, 2000).

Neu entwickelte Fluorochinolone der 4. Generation mit einer deutlichen Spektrumserweiterung, insbesondere das Naphthyridinderivat-Gemifloxacin, zeigen *in vitro* eine deutlich verbesserte Wirksamkeit gegen Borrelien (Kraiczky et al., 2001). Auch eine *in vitro*-Resistenzstudie mit dem neuen des-fluoro (6) Fluorochinolon BMS-284756 konnte eine gute *in vitro*-Aktivität gegen *B. burgdorferi* zeigen (Fung-Toms et al., 2000). Ein anderes Antibiotikum, das vielversprechende neue des-fluoro (6) Fluorochinolon DX-619, wurde bezüglich seiner Empfindlichkeit gegenüber Borrelien noch nicht untersucht (Fukuda et al., 2006).

Der Hauptangriffspunkt der Fluorochinolone ist ein tetrameres bakterielles Enzym, die DNA-Gyrase, welche die für eine schnelle DNA-Synthese wichtige energetisch günstige DNA-Verdrillung durch die Trennung, Passage und Wiedervereinigung von DNA-Doppelsträngen ermöglicht. Die Fluorochinolone gehen eine irreversible Verbindung mit dem DNA-Topoisomerasekomplex ein und stabilisieren diesen. Durch die Persistenz von doppelsträngigen DNA-Brüchen werden SOS-Reparaturmechanismen initiiert, die letztendlich zur Lyse der Bakterienzellen führen. Die Wirkungsstärke ist von der Stoffwechsellage der Bakterien abhängig (Hooper et al., 2001). Außerdem erreichen die Fluorochinolone im Gewebe und in den Zellen oft ein Mehrfaches der Serumantibiotikakonzentration und zeigen daher im Vergleich zu Ketoliden und Makroliden eine noch bessere Aktivität gegen intrazelluläre Erreger. Auch besitzen sie z. T. eine gute Liquorgängigkeit (Simon und Stille, 2000; Stout et al., 2005; Fukuda et al., 2006).

In der vorliegenden Studie wurde im Rahmen von Time-Kill-Experimenten mit drei Borrelien-Isolaten eine höhere Empfindlichkeit von Borrelien gegen die Klasse IV Fluorochinolone Sitafloxacin und Gemifloxacin im Vergleich zu Ciprofloxacin (Klasse II) festgestellt (Tabelle 4.6). So lagen die MHKs bei Ciprofloxacin zwischen 0,5 und 1 µg/ml, bei Sitafloxacin zwischen 0,125 und 0,25 µg/ml und bei Gemifloxacin einheitlich bei 0,06 µg/ml (Tabelle 4.6). Diese Konzentrationen liegen unterhalb der C_{\max} der jeweiligen Antibiotika im Serum, d. h. sie sind bei ausreichender Dosierung gut erreichbar (Tabelle 2.3). Fluorochinolone zeigen eine konzentrationsabhängige Wirkung auf Borrelien nur bis zur 8-fachen MHK (Abbildungen 3.3 bis 3.5). Bei den höheren Konzentrationen ist dieser Effekt nicht oder sehr schwach ausgeprägt. Barger (2003b) bekräftigt diese Beobachtung durch ihre Testergebnisse der Absterbekinetik von Ciprofloxacin gegenüber *E. coli* und *S. aureus* in einer Batchkultur (Kultur zur Ermittlung der Absterbekinetik mit konstanten Antibiotikakonzentrationen – geschlossenes System) und im *in vitro*-Modell (Kultur mit sich ähnlich der *in vivo*-Situation ändernden Antibiotikakonzentrationen – kontinuierliches System). Firsov et al. (1998) zeigen in einem *in vitro*-Modell, dass sich die initiale Abtötungsgeschwindigkeit ab der 16-fachen Konzentration der MHK nicht mehr ändert. Bei hohen Ciprofloxacinkonzentrationen ist sogar ein Wiederauwachen von *E. coli* zu beobachten (Firsov et al., 1998). Hyatt et al. (1994) konnten den gleichen paradoxen Effekt der Ciprofloxacin-Wirkung gegenüber *S. aureus* ab 15 µg/ml und gegenüber *P. aeruginosa* ab 20 µg/ml beobachten. Dieser Effekt ist aber wahrscheinlich nur ein *in vitro*-Phänomen (Barger, 2003b). Für eine optimale antimikrobielle Aktivität scheint eine Antibiotikakonzentration bis zur 8-fachen MHK ausreichend. Bei einer vergleichbaren C_{\max} (Tabelle 2.3) der drei Antibiotika im Serum entfaltet Gemifloxacin mit seinen niedrigen MHKs offensichtlich eine höhere antimikrobielle Wirkung relativ zur Wirkstoffkonzentration.

Eine Borrelienreduktion um bis zu 99,9 % konnte bei den Isolaten EB 1 (*B. afzelii*) und PSth (*B. garinii*) mit Konzentrationen von zwei bis drei geometrischen Verdünnungsstufen oberhalb der MHK nach 120 h erreicht werden. Bei dem *B. garinii*-Isolat PSth konnten nach 120 h, ab einer Ciprofloxacin-Konzentration von 8 µg/ml, einer Sitafloxacin-Konzentration von 4 µg/ml und einer Gemifloxacin-Konzentration von 2 µg/ml keine morphologisch intakten Borrelien mehr nachgewiesen werden (Abbildung 3.3-3.5 und Tabelle 4.6). Die bessere Empfindlichkeit von PSth könnte durch das schnellere Absterben dieses *B. garinii*-Isolates unter *in vitro*-Bedingungen nach Antibiotikaeinwirkung, bedingt durch die kürzere Generationszeit des Erregers, verursacht sein (Abbildung 3.2). Auch in anderen Studien wurde eine tendenziell bessere Wirksamkeit der verschiedenen Antibiotika

auf die Genospezies *B. garinii* beobachtet (Sicklinger et al., 2003; Preac-Mursic et al., 1996; und Hunfeld et al., 2000b). Da die Borrelien unterschiedlich lange Generationszeiten aufweisen (Abbildung 3.2), könnte die Antibiotika-Aktivität bei Borrelien-Isolaten mit einer langen Generationszeit gegenüber den Antibiotika, deren Wirkung von der Teilung der Borrelien abhängig ist, negativ beeinflusst werden. Da die Wirkungsstärke von Fluorochinolonen von der Stoffwechsellage der Bakterien abhängig ist (Hooper et al., 2001), könnte dies eine etwas schwächere Empfindlichkeit des *B. burgdorferi* s. s.-Isolats Pka-1 erklären (Tabelle 4.6). Auch andere Autoren finden bei *B. burgdorferi* s. s.-Isolaten eine niedrigere Empfindlichkeit für Cephalosporine, Tetracycline und Ciprofloxacin verglichen mit *B. afzelii*- und *B. garinii*-Isolaten (Henneberg und Neubert, 2002).

In der vorliegenden Studie erwies sich Gemifloxacin *in vitro* (Time-Kill-Kinetik und BIs) als das stärkste gegen Borrelien wirksame Fluorochinolon mit der größten antimikrobiellen Potenz. Dies wurde auch schon in früheren Studien beobachtet (Kraiczky et al., 2001). Die untersuchten Borrelien wurden schon bei sehr niedrigen Konzentrationen gehemmt (mittlere MHK von Gemifloxacin 0,06 µg/ml). Dieser MHK-Wert lag (bei identischen Testbedingungen für die Borrelien-Isolate) unter denen für Doxycyclin, einem häufig zur Borreliose-Therapie verwendeten Antibiotikum (mittlere MHK von Doxycyclin 0,25 µg/ml). Auch die durchgeführten Time-Kill-Untersuchungen bekräftigen die *in vitro*-Aktivität von Gemifloxacin. Bei Gemifloxacin trat eine rasche Reduktion der morphologisch intakten, mobilen Borrelien um $\geq 3 \log_{10}$ Stufen ein, die bei den Isolaten EB 1 (*B. afzelii*) und PStH (*B. garinii*) schon nach 72 h feststellbar war. Eine vergleichbare Borrelienreduktion um $\geq 3 \log_{10}$ Stufen nach 72 h konnte nur bei den klinisch bewährten Antibiotika Doxycyclin und Ceftriaxon beobachtet werden (Tabelle 4.6). Dementsprechend ergeben sich für Gemifloxacin auch hohe BIs, die im Vergleich zu Doxycyclin sogar numerisch relativ größer ausfielen (Tabelle 4.6). Darüber hinaus zeigt Gemifloxacin in elektronenmikroskopischen Untersuchungen einen deutlich verstärkten zytotoxischen Effekt auf Borrelien im Vergleich zu Ciprofloxacin (Kraiczky et al., 2001). Möglicherweise verdankt Gemifloxacin die hohe Empfindlichkeit seiner chemischen Struktur, die eine erhöhte Affinität zu den Topoisomerasen von Borrelien, insbesondere zur Topoisomerase IV ermöglicht (Kraiczky et al., 2001; Galbraight et al., 2005). Nähere Untersuchungen, insbesondere klinische Prüfungen mit modernen Fluorochinolonen bezüglich einer alternativen Therapie bei Lyme-Borreliose, erscheinen insofern wünschenswert.

4.2.3 *In vitro*-Empfindlichkeitstestung von *B. burgdorferi* gegen Ceftriaxon

Ceftriaxon wurde als Vergleichssubstanz mit bekannter Aktivität gegen *B. burgdorferi* in die Untersuchungen eingeschlossen. Wegen der klinisch belegten guten Aktivität gegenüber Borrelien gilt es als ein Antibiotikum der ersten Wahl bei Lyme-Borreliose im Stadium II bis III. Aufgrund der langen Serum-Halbwertszeit ist die Therapie mit Ceftriaxon auch im ambulanten Bereich möglich.

Ceftriaxon wirkt sekundär bakterizid durch Hemmung der Transpeptidase bei der Mureinsynthese und verhindert die Quervernetzung der einzelnen Mureinstränge. Das β -Laktamgerüst von Antibiotika ist der N-Acetylmuraminsäure strukturverwandt und blockiert die Transpeptidasen der Zellwand. Zellwanddefekte führen zu hohem osmotischem Druck, der wiederum zu einer Bakterizidie führt. Bei Antibiotikakonzentrationen zwischen dem 1 bis 5 fachen der MHK erfolgt eine Bakteriolyse durch Perforation der Querwand während der Zellteilung. Unter höheren Dosen kommt es häufig zur relativ schnellen Abtötung infolge der Schädigung der Zytoplasmamembran nach Reaktion mit den Penicillin-Bindenden-Proteinen (Norgard et al., 1995; Miksits und Dierich, 1999). Kersten et al. (1995) beschreiben bei Ceftriaxon eine Verdickung der Borrelien-Zellwand gefolgt von der Entstehung von Vesikeln sowie einer Zelllysis. Die Verdickung der Zellwand könnte als Ausdruck einer Gegenreaktion der Zelle durch eine vermehrte Produktion von Peptidoglykan-Vorläufersubstanz (Cui et al., 2006) sowie durch eine Verminderung der Zellwandpermeabilität infolge der Unterregulierung der Porine-Synthese (Hunfeld, 2004) angesehen werden. Auch Vesikelbildung könnte einen Mechanismus darstellen, der zum Überleben der Zelle beiträgt (Alban et al., 2000; Brorson und Brorson, 1998; Mursic et al., 1996; Kersten et al., 1995). β -Laktame wirken an der dem periplasmatischen Raum zugewandten Außenfläche der Zytoplasma-Membran, die bei Spirochäten im Unterschied zu den grampositiven Bakterien viel enger mit der Peptidoglykan-Zellwand assoziiert und sehr flexibel ist (Charon et al., 1981; Kochi und Johnson, 1988).

Ceftriaxon erreicht im Serum nach 2 g i. v. eine C_{\max} von 250 $\mu\text{g/ml}$ (Tabelle 2.3). Da Ceftriaxon eine Proteinbindung von bis zu 95% hat, wird im Liquor bei Patienten abhängig von der Funktion der Blut-Hirn-Schranke eine Konzentration von 1,2-39 $\mu\text{g/ml}$ erreicht (Karchmer et al., 2000). In der vorgelegten Arbeit wurde bei Ceftriaxon insbesondere nach einer längeren Inkubationszeit von 120 h, eine konzentrationsabhängige Borrelienabtötung beobachtet (Abbildungen 7.1-7.3). Einige Studien konnten einen unterschiedlichen klinischen Effekt bei der Anwendung verschiedener Dosierungen der β -Laktamantibiotika nachweisen

(Periti und Nicoletti, 1999). Eine höhere Dosierung kann unter anderem zur Überwindung von phänotypischen Resistenzmechanismen des Erregers, sowie zur Steigerung der Konzentration von frei gelösten Antibiotika gegenüber der proteingebundenen Fraktion infolge des Überschreitens der Bindungskapazität der Plasmaproteine beitragen (Miksits und Dierich, 1999). Die Ceftriaxon-Konzentration im Liquor liegt auch bei normalen Dosierungen weit über der MHKs der drei untersuchten Borrelien-Isolaten (mittlere MHK $\leq 0,016 \mu\text{g/ml}$) (Tabelle 4.6). Bei dem *B. afzelii*-Isolat EB 1 und dem *B. garinii*-Isolat PSth wurden bei $0,25 \mu\text{g/ml}$ ($4 \times \text{MHK}$) und bei dem *B. burgdorferi* s. s.-Isolat Pka-1 bei $1 \mu\text{g/ml}$ ($6 \times \text{MHK}$) nach 120 h keine intakten beweglichen Borrelien mehr beobachtet (Tabelle 4.6). Das Abtötungspotenzial der freien, nicht an das Protein gebundenen Moleküle scheint somit für eine sichere Borrelienabtötung völlig ausreichend.

In der Time-Kill-Kinetik konnte nach 72 h eine $\geq 3 \log_{10}$ -Stufen Borrelienreduktion bei allen drei Isolaten erreicht werden. Sie wurde nach 120 h bei dem *B. afzelii*-Isolat EB 1 bei einer Konzentration von $0,06 \mu\text{g/ml}$, bei dem *B. garinii*-Isolat PSth bei $0,03 \mu\text{g/ml}$ und bei dem *B. burgdorferi* s. s.-Isolat Pka-1 bei $0,25 \mu\text{g/ml}$ erreicht (Tabelle 4.6). Bei Ceftriaxon wurden die im Verhältnis höchsten BIs festgestellt (Abbildungen 3.5 bis 3.7). Um eine 99,9-prozentige Abtötung zu erreichen, war in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Luft et al. (1988) eine Zeitspanne von mehr als 48 h notwendig (Tabelle 4.6). Kersten et al. (1995) hingegen beschreiben bei Ceftriaxon unter Verwendung einer Transmission-Elektronenmikroskopie schon nach 8 h ein sehr rasches Einsetzen von Alterationen bei Borrelien und bei Konzentrationen, die $1/10$ der MHK entsprachen, nach 48 h eine völlige Abwesenheit von motilen Borrelien. Diese Beobachtung korreliert mit der sehr guten Wirksamkeit von Ceftriaxon in Tiermodell. *In vivo* konnten Kazragis et al. (1996) bei Ceftriaxon eine völlige Eliminierung der Borrelien aus dem Gehirn sowohl bei immunkompetenten als auch bei immunsupprimierten Mäusen beobachten. Bei immunsupprimierten Mäusen, die bei einer seit 12 Tage bestehenden Infektion nur eine geringe inflammatorische Aktivität der Meningen zeigten, konnte durch die Ceftriaxon-Therapie eine völlige Eliminierung der Borrelien erzielt werden.

Zusammenfassend stellt Ceftriaxon bis heute das *in vitro* und *in vivo* aktivste Antibiotikum gegen *B. burgdorferi* dar.

4.2.4 *In vitro*-Empfindlichkeitstestung von *B. burgdorferi* gegen Doxycyclin

Doxycyclin ist die am häufigsten für die Therapie der Lyme-Borreliose angewandte Substanz (Wormser et al., 2000). Es gilt bis heute als Antibiotikum der ersten Wahl bei einer kutanen Manifestation der Borrelien-Infektion. Doxycyclin hemmt die Proteinsynthese der Bakterien, indem es mit der Bindung von Aminoacyl-t-RNS an der Akzeptorseite der 30 S-Untereinheit der bakteriellen 70 S-Ribosomen interferiert. Es geht aber nur eine transiente Bindung ein, daher ist seine Wirkung bakteriostatisch. Auch die Komplexbildung von Metallionen z. B. von Zn^{2+} , das essenziell für das Borrelienwachstum ist, zu Chelaten trägt in vielfältiger Weise zu den inhibitorischen Effekten bei (Montgomery et al., 2006).

Dank seiner Lipophilie verteilt sich Doxycyclin leicht im Körpergewebe und liegt dort z. B. im Herz, Lungen, Nieren und Muskeln verglichen zur entsprechenden Serumkonzentration oft in deutlich höherer Konzentration vor. Auch intrazelluläre Erreger werden durch hohe Konzentration in der Zelle zuverlässig eliminiert (Barza et al., 1975; Balogh et al., 1991). Bei den therapierefraktären Fällen ist oft unklar, ob Borrelien in bestimmten Nischen überleben können (Hassler et al., 1991; Pfister et al., 1991). Comstock und Thomas (1989) und Ma et al. (1991) zeigten unter *in vitro*-Bedingungen die Fähigkeit von Borrelien, ein einschichtiges Endothel zu penetrieren und in kultivierten Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen zu überleben. Unter Ceftriaxon-Einwirkung zeigen Fibroblasten *in vitro* einen protektiven Effekt auf das Überleben von Borrelien (Georgilis et al., 1992). Brouqui et al. (1996) beschreiben eine bessere Effektivität von Doxycyclin und Erythromycin im Vergleich zu Penicillin und Ceftriaxon auf Borrelien, die in einem mit den humanen endothelialen Zellen supplementierten Medium wachsen.

Kersten et al. (1995) beschreiben bei Doxycyclin eine mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie nachweisbare rasche Immobilisation von Borrelien sowie die Entwicklung von so genannten Mesosomen. Ein Motilitätsverlust ist bei der Begrenzung der Borreliendissemination im Organismus unter Doxycyclin-Therapie möglicherweise von Bedeutung. Dattwyler et al. (1997) finden bei Patienten mit einer akuten disseminierten Lyme-Borreliose ohne Meningitis, dass eine orale Einnahme von Doxycyclin die gleiche Wirkung bei der Prävention von Spätkomplikationen hat wie die i. v. Gabe von Ceftriaxon.

Bei den drei untersuchten Isolaten wurde einheitlich bei relativ niedriger Doxycyclinkonzentration keine Vermehrung der Borrelien im Vergleich zum initial eingesetzten Borrelieninokulum festgestellt (mittlere MHK 0,25 $\mu\text{g/ml}$). Diese inhibitorische Antibiotikakonzentration liegt unter der maximal erreichbaren Konzentration im Serum

(C_{max} nach 200 mg p. o.: 3,6 µg/ml) (Tabelle 2.3). Dank seiner außerordentlich langen Halbwertszeit (T_½ 16 h) bleibt die Serumkonzentration über die gesamte Therapiezeit relativ konstant (Balogh et al., 1991). Die Substanz erreicht im Liquor etwa 10-30 % der Plasmakonzentration (Andersson und Alestig, 1976; Dotevall und Hagberg, 1989; Karlsson et al., 1996). Karlsson et al. (1996) zeigten eine erfolgreiche Behandlung bei einer akuter Neuroborreliose, unter Therapie mit 200 mg Doxycyclin täglich über 2 Wochen. Borg et al. (2005) stellen nach 6 Monaten Nachbeobachtungszeit keinen Unterschied der Effektivität bei der Therapie der Neuroborreliose mit Ceftriaxon (2 g i. v. / d) oder Doxycyclin (400 mg p. o. / d) fest. Sie verabreichen dabei ungewöhnlich hohe Doxycyclin-Dosen. Bei der Time-Kill-Kinetik in der vorliegenden Arbeit konnte eine zeit- und konzentrationsabhängige Borrelienabtötung bei Doxycyclin beobachtet werden (Abbildungen 3.2 bis 3.4). Diese Tatsache spricht für die Sinnhaftigkeit höherer Doxycyclin Dosierungen in der Therapie der Neuroborreliose. Außerdem verkürzt eine hohe Dosierung die Dauer der Aufsättigungsphase bis zum Erreichen des steady-state im Serum, die sonst bei der langen Halbwertszeit und ausgeprägten Lipophilie des Antibiotikums bis zu 5 Tagen dauern kann (Cunha, 2000).

Bei den drei Isolaten konnte unter einer Doxycyclinkonzentration von 2 und 4 µg/ml eine Borrelienreduktion um 3 \log_{10} -Stufen nach 120 h erreicht werden. Bei höheren Konzentrationen wurde eine 99,9-prozentige Borrelienreduktion schon nach 72 h beobachtet (Tabelle 4.6).

Übereinstimmend mit den Testergebnissen von Sicklinger et al. (2003) konnte bei Doxycyclin kein bemerkenswerter Unterschied in dessen Wirkung auf die Isolate der drei Genospezies gefunden werden. Auch die errechneten BIs waren bei den drei Isolaten gleich hoch (Tabelle 4.6). Dies unterstreicht die Eignung von Doxycyclin als sichere therapeutische Option in der Therapie der Lyme-Borreliose. Vorteilhaft bei der Doxycyclin-Therapie ist auch die antiinflammatorische Aktivität, die unter anderem durch eine Reduktion der Migration und eine Phagozytoseaktivität der Granulozyten infolge einer Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion und eine Inhibition der Metalloproteasen hervorgerufen wird (Labro, 2000). Eine synergistische Kombination von Substanzen wird oft gegenüber vielen Erregern angewendet (Firsov et al., 2004). Dever et al. (1993b) konnten eine *in vitro*-Synergie zwischen Vancomycin und Penicillin bei Konzentration, die jeweils nur ¼ der MHK der beiden Antibiotika betrug, demonstrieren. Es wäre zukünftig interessant zu zeigen, ob eine Kombination von Doxycyclin mit z. B. Makroliden oder Fluorochinolonen gegen Borrelien synergistisch wirksam ist.

4.2.5 Unterschiede in der Antibiotikaempfindlichkeit zwischen hoch- und niedrigpassagierten Borrelien-Isolaten

In Rahmen von *in vitro*-Empfindlichkeitsprüfungen werden meistens laboradaptierte Borreliensämme untersucht. Es ist bekannt, dass Borrelien nach einer längeren *in vitro*-Kultivierung durch den Verlust von Plasmiden nicht mehr infektiös sind. Purser und Norris, (2000) beschreiben eine Verminderung der Infektiosität von Borrelien-Isolaten für Mäuse durch den Verlust von Plasmiden, sowie eine Änderung in der Proteinexpression von Borrelien nach 10 bis 17 Passagen. Es ist oft unklar, ob dadurch auch die Antibiotikaempfindlichkeit beeinflusst wird und neu angezüchtete klinische Borrelienisolate möglicherweise noch sensitiver auf Antibiotika reagieren. Einige Untersuchungen deuten auf eine vergleichbare Antibiotikaempfindlichkeit zwischen laboradaptierten und frisch isolierten Borrelien-Isolaten hin (Cinco et al., 1995; Murgia et al., 1999; Dever et al., 1999). Dever et al. (1992) beobachten ein verlangsamtes Wachstum bei den niedrigpassagierten Stämmen und stellen dabei keinen signifikanten Unterschied zwischen MHKs bei hoch- und niedrigpassagierten Isolaten fest. Murgia et al. (1999) finden keinen Unterschied für MHKs und MBKs bei niedrig- und hochpassagierten Borrelien-Isolaten.

Für die Prüfung auf Unterschiede in der Empfindlichkeitstestung zwischen laboradaptierten Isolaten und einem vor kurzem aus einer Hautbiopsieprobe kultivierten Isolat (FAC 3) wurden MHK- und MBK-Bestimmungen durchgeführt (Tabelle 4.7). Dabei lagen die MHKs bei dem *B. afzelii*-Isolat FAC 3 nur um eine bis zwei geometrische Antibiotika-Verdünnungsstufen niedriger als bei den laboradaptierten Borrelien-Isolaten EB 1, PStH und Pka-1 (Tabelle 4.7). Die MBKs waren dagegen im Vergleich zu den laboradaptierten Isolaten deutlich niedriger. Das könnte allerdings genauso gut Ausdruck einer noch ungenügenden Adaptation an die *in vitro*-Kulturbedingungen sein (Abbildung 3.12).

Die Frage, ob neu isolierte Borreliensämme, die sich noch in einer Anpassungsphase zu *in vitro*-Bedingungen befinden, andere Empfindlichkeit zeigen, kann nur anhand einer größeren Zahl von Isolaten geklärt werden. Unklar bleibt auch, ob sich die Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung solcher Kulturoisolate auf die Situation von Borrelien extrapolieren lassen, die in einem infizierten Wirt mit sich ständig verändernden Bedingungen konfrontiert sind.

Tabelle 4.7: Vergleich der MHKs und MBKs von hoch- und niedrigpassagierten Borrelien-Isolaten.

Antibiotika	Mittelwert der drei laboradaptierten Isolate EB 1, PStH und Pka-1 (siehe Tabelle 3.3, 3.4)	FAC 3 Passage 2 bis 3 (siehe Tabelle 3.8)
MHK ($\mu\text{g/ml}$)		
Ciprofloxacin	0,6	0,25
Sitafloxacin	0,2	0,06
Gemifloxacin	0,06	0,03
Cethromycin	$\leq 0,002$	$\leq 0,002$
Doxycyclin	0,25	0,13
Ceftriaxon	$\leq 0,016$	$\leq 0,016$
MBK ($\mu\text{g/ml}$)		
Ciprofloxacin	>16	1,5
Sitafloxacin	10	0,25
Gemifloxacin	8	0,06
Cethromycin	0,3	$\leq 0,002$
Doxycyclin	27	0,5
Ceftriaxon	1,2	0,016

5 Zusammenfassung

Die Lyme-Borreliose, eine durch Zecken übertragene Multisystem-Erkrankung, wird durch die Spirochäte *B. burgdorferi* s. l. hervorgerufen. Die *in vitro*-Empfindlichkeit von Borrelien gegenüber einer ganzen Reihe von Substanzen ist bislang nicht oder nur unzureichend bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die *in vitro*-Empfindlichkeit von *B. burgdorferi* gegenüber einer Reihe von neu entwickelten Antibiotika im Vergleich zu bekannten Substanzen unter standardisierten Bedingungen untersucht.

Im 1. Teil der Arbeit wurde ein neues kolorimetrisches Mikrodilutionstestverfahren in Kombination mit konventioneller Subkultivierung in Flüssigmedium zur Bestimmung der *in vitro*-Empfindlichkeit von 17 repräsentativ ausgewählten Borrelienstämmen gegenüber dem neu entwickelten Ketolid Cethromycin eingesetzt. Das Verfahren ist standardisiert, gut reproduzierbar und erlaubt es, mehrere Antibiotika bzw. Isolate gleichzeitig effizient zu testen. Die MHK₉₀ für Cethromycin lag für die getesteten Isolate einheitlich bei $\leq 0,002 \mu\text{g/ml}$. Die MBK₉₀ lag bei $0,75 \mu\text{g/ml}$.

Im 2. Teil der Arbeit wurden auf der Basis von konventionellen Zellzählungen mittels Dunkelfeldmikroskopie zusätzlich Untersuchungen zur Aktivität von Cethromycin, Sitafloracin und Gemifloxacin im Vergleich zu Ciprofloxacin und den bekanntermaßen gut gegen Borrelien wirksamen Substanzen Doxycyclin und Ceftriaxon für je ein repräsentatives Isolat der humanpathogenen Genospezies *B. burgdorferi* s. s., *B. garinii* und *B. afzelii* durchgeführt.

Von den untersuchten neuen Substanzen zeigten Cethromycin (MHK [Mittelwert]: $\leq 0,002 \mu\text{g/ml}$; MBK [Mittelwert]: $0,3 \mu\text{g/ml}$) und Gemifloxacin (MHK [Mittelwert]: $0,06 \mu\text{g/ml}$; MBK [Mittelwert]: $8 \mu\text{g/ml}$) im Vergleich zu den in der Therapie der Lyme-Borreliose bewährten Substanzen Ceftriaxon (MHK [Mittelwert]: $0,016 \mu\text{g/ml}$; MBK [Mittelwert]: $1,2 \mu\text{g/ml}$) und Doxycyclin (MHK [Mittelwert]: $0,25 \mu\text{g/ml}$; MBK: von 24 bis $>32 \mu\text{g/ml}$) die vielversprechendste Aktivität gegen *B. burgdorferi*.

Diese Ergebnisse konnten in Hinblick auf die Aktivität der getesteten Antibiotika gegenüber Borrelien durch die zusätzlich über 120 h durchgeführten Time-Kill-Experimenten abgesichert werden.

Im 3. Teil der Arbeit wurden dann unter Zuhilfenahme eines theoretischen Modells mittels Einbeziehung weiterer pharmakologischer und pharmakokinetischer Daten für alle getesteten Substanzen sogenannte Bakterizidie-Indizes (BIs) auf der Basis der erzielten *in vitro*-Resultate berechnet. BIs von > 2,8 stehen dabei für eine gute bis sehr gute antimikrobielle Aktivität.

Für Cethromycin zeigte sich bei den untersuchten Isolaten ein rascher Anstieg der BIs schon nach einer sehr kurzen Inkubationszeit von 48 h. Dabei lagen die Werte für Cethromycin (BIs 5,0-7,59) nach 120 h sogar über denen von Doxycyclin (BIs 2,81-3,15). Ebenso lagen die errechneten BIs für Gemifloxacin nach 120 h (BIs 3,33-8,05) höher als für Doxycyclin. Ceftriaxon war allerdings die bei weitem am besten wirksame Substanz und zeigte auch die höchsten BIs von 14,96 bis 18,48.

Unter Berücksichtigung aller verfügbaren Daten ergab sich aus der vorliegenden Arbeit zusammenfassend folgende Rangordnung für die *in vitro*-Aktivität der getesteten antibiotischen Substanzen: Ceftriaxon > Cethromycin > Gemifloxacin > Doxycyclin > Sitafloxacin > Ciprofloxacin.

Für neu entwickelte Antibiotika stellen *in vitro*-Untersuchungen einen ersten Schritt für eine Charakterisierung ihrer antimikrobiellen Wirksamkeit gegen Infektionserreger dar. Die Einbeziehung weiterer pharmakologischer Daten in die Interpretation solcher experimentell gewonnenen Ergebnisse ist innovativ, vermittelt zusätzliche Informationen und erlaubt eine vergleichende modellhafte Abschätzung der Aktivität solcher Substanzen unter Berücksichtigung wichtiger pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Parameter. Zusammenfassend legen die in der vorliegenden Arbeit herausgearbeiteten Ergebnisse eine vielversprechende Aktivität von zwei neuen Substanzen (Cethromycin und Gemifloxacin) gegen *B. burgdorferi* nahe und lassen daher eine weitergehende klinische Prüfung dieser Antibiotika für eine mögliche therapeutische Anwendung bei Lyme-Borreliose sinnvoll erscheinen.

Summary

Lyme Borreliosis is a multi-system disease caused by bacteria from the genus *Borrelia*, the vector of infection is typically the bite of an infected black-legged or deer tick. The *in vitro* sensitivity of *Borrelia* bacteria to a wide range of substances is either not known or insufficiently investigated. In this work therefore the *in vitro* sensitivity of *B. burgdorferi* sensu lato to a range of newly developed antibiotics compared with a range of well-known substances under standardized conditions is examined.

In the first part of this work a new colorimetric microdilution test procedure was used with conventional sub cultivation into liquid medium for the determination *in vitro* sensitivity of 17 representative *Borrelia* strains against the newly developed ketolid Cethromycin. The procedure is standardized, easily reproducible and permits the efficient testing of several antibiotics and/or Isolates at the same time. The MHK_{90} for Cethromycin for the tested Isolate was found to $\leq 0.002 \mu\text{g/ml}$. The MBK_{90} was about $0.75 \mu\text{g/ml}$.

In the second part of the work on the basis of conventional cell counting by means of dark field microscopy additional investigations were carried out on the activity of Cethromycin, Sitafloxacin and Gemifloxacin compared with Ciprofloxacin and well-known substances Doxycyclin and Ceftriaxon, effective against *Borrelia*, for representative Isolate each of the humanpathogenic genospecies *B. burgdorferi* s.s., *B. garinii* and *B. afzelii*.

Of the examined new substances Cethromycin (MHK [average value] showed: $\leq 0.002 \mu\text{g/ml}$; MBK [average value]: $0.3 \mu\text{g/ml}$) and Gemifloxacin (MHK [average value]: $0.06 \mu\text{g/ml}$; MBK [average value]: $8 \mu\text{g/ml}$) compared with the substances , worked satisfactorily in the therapy of the Lyme Borreliose, Ceftriaxon (MHK [average value]: $0.016 \mu\text{g/ml}$; MBK [average value]: $1.2 \mu\text{g/ml}$) and Doxycyclin (MHK [average value]: $0.5 \mu\text{g/ml}$; MBK : from 24 to $> 32 \mu\text{g/ml}$) showed the most promising activity against *B. burgdorferi*.

These results could be confirmed in respect of the activity of the tested antibiotics against *Borrelia* by additional time kill experiments carried out over 120 h.

In the third part of the work with help of a theoretical model by means of inclusion of further pharmacological and pharmacokinetic data for all tested substances so-called bactericidal indices (BIs) on the basis of the obtained were then computed into vitro results. BIs of >2.8 represent a good to very good antimicrobial activity.

With Cethromycin a rapid rise of the BIs with the isolates examined was observed after a very short incubation period of 48 h. The values for Cethromycin (BIs 5.0-7.59) after 120 h were above those from Doxycyclin with the examined Isolates (BIs 2.81-3.15). Likewise the calculated lay to for Gemifloxacin after 120 h (BIs 3.33-8.05) higher than for Doxycyclin. Ceftriaxon was however by far the best effective substance and showed also the highest BIs from 14.96 to 18.48.

With consideration of all available data resulting from this work the following ranking for in vitro activity of the tested antibiotic substances: Ceftriaxon > Cethromycin > Gemifloxacin > Doxycyclin > Sitafloxacin > Ciprofloxacin is observed.

For newly developed antibiotics represent *in vitro* investigations a first step for a characterisation of their antimicrobial effectiveness against infection excitors. The inclusion of additional pharmacological data in the interpretation of such experimentally won results is innovative, adds additional information and permits a comparative estimation of the activity of such substances with consideration of important pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. In summary the results presented in this work suggest a promising activity of two new substances (Cethromycin and Gemifloxacin) against *B. burgdorferi* and thus a large scale clinical examination of these antibiotics for a possible therapeutic application with Lyme Borreliosis to appears to be worthwhile.

6 Literaturverzeichnis

- Aberer**, E., F. Breier, G. Stanek, B. Schmidt. 1996. Success and failure in the treatment of acrodermatitis chronica atrophicans. *Infection* 24:85-87.
- Agger**, W.A., S.M. Callister, D.A. Jobe. 1992. *In vitro* susceptibility of *Borrelia burgdorferi* to five oral cephalosporins and ceftriaxone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 1788-1790.
- Ackermann**, R. 1983. The spirochetal etiology of erythema chronicum migrans and Garin-Bujadoux-Bannwarth meningo-polyneuritis. *Fortschr. Med.* 101:1167-1170.
- Alban**, P.S., P.W. Johnson, and D.R. Nelson. 2000. Serum-starvation-induced changes in protein synthesis and morphology of *Borrelia burgdorferi*. *Microbiology* 146: 119-127.
- Allen**, A., E. Bygate, S. Oliver, M. Johnson, C. Ward, A. Cheon, Y.G. Choo, I. Kim. 2000. Pharmacokinetics and tolerability of gemifloxacin (SB-265805) after administration of single oral doses to healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 1604-1608.
- Ambrose**, P.G., R.C. Owens, D. Grasela. 2000. Antimicrobial pharmacodynamics. *Med. Clin. North. Am.* 84:1431-1446.
- Amsden**, G.W., C.H. Ballow, and Bertino. 2000. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antiinfective agents. Chapter 17. In *Principles and practice of infectious diseases*. Mandel, Douglas, and Bennett's. Churchill Livingstone.
- Andersson**, H. and K. Alestig. 1976. The penetration of doxycycline into CSF. *Scand. J. Infect. Dis.* 9:17-19.
- Asbrink**, E., B. Hederstedt, A. Hovmark. 1984. The spirochetal etiology of erythema chronicum migrans. *Afzelius. Acta. Derm. Venereol.* 64: 291-295.
- Balogh**, A., C. Rechenbach, R. Brix, J. Mundhenke, R. Tjuljumbow, A. Hoffmann. 1991. Untersuchungen zur bioäquivalenz von Doxycyclin bei zwei preparaten in Kapselzubereitung. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 41: 1289-1293.
- Baradaran-Dilmaghani**, R., and G. Stanek. 1996. *In vitro* susceptibility of thirty *Borrelia* strains from various sources against eight antimicrobial chemotherapeutics. *Infection* 24: 60-67.
- Barger**, A., C. Fuhst, B. Wiedemann. 2003a. Pharmacological indices in antibiotic therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 52 :893-898.
- Barger**, A. 2003b. Entwicklung eines mathematischen Modells zur Vorhersage der Wirkung von Antibiotika. Dissertation. Bonn, Univ.
- Barza**, M., B.R. Brown, C. Shanks, C. Gamble, L. Weinstein. 1975. Relation between lipophilicity and pharmacological behaviour of minocycline, doxycycline, tetracycline, and oxytetracycline in dogs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 8: 713-720.
- Boerner**, J., K. Failing, 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.
- Borg**, R., L. Dotevall, L. Hagberg, V. Maraspin, S. Lotric-Furlan, J. Cimperman, F. Strle. 2005. Intravenous ceftriaxone compared with oral doxycycline for the treatment of Lyme neuroborreliosis. *Scand. J. Infect. Dis.* 37: 449-454.
- Brorson**, O., and S.H. Brorson. 1998. A rapid method for generating cystic forms of *B. burgdorferi*, and their reversal to mobile spirochetes. *APMIS* 106: 1131-1141.
- Brouqui**, P., S. Badiaga, D. Raoult. 1996. Eucaryotic cells protect *Borrelia burgdorferi* from the action of penicillin and ceftriaxone but not from the action of doxycycline and erythromycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996. 40: 1552-1554.

- Burgdorfer**, W., A.G. Barbour, ST. Hayes, J.L. Benach, E. Grunwaldt, J.P.Davis. 1982. Lyme disease - a tick-borne spirochetosis? *Science* 216: 1317-1319.
- Champney**, W. S., and C. L. Tober. 2001. Structure-activity relationships for six ketolide antibiotics. *Curr. Microb.* 42: 203-210.
- Chandrasekar**, P.H., L.R. Crane, E.J. Bailey. 1987. Comparison of the activity of antibiotic combinations *in vitro* with clinical outcome and resistance emergence in serious infection by *Pseudomonas aeruginosa* in non-neutropenic patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 19: 321-329.
- Charon**, N.W., C.W. Lawrence, S. O'Brien. 1981. Movement of anti-body-coated beads attached to the spirochete *Leptospira interrogans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 7166-7170.
- Cimmino**, M.A., G.L. Moggiana, M. Parisi, S. Accardo. 1996. Treatment of Lyme arthritis. *Infection* 24: 91-96.
- Cinco**, M., D. Padovan, G. Stinco, G. Trevisan. 1995. *In vitro* activity of rokitamycin, a new macrolide, against *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob. Agent Chemother.* 39: 1186-1186
- CLSI (formerly NCCLS)** 1999. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; Approved Guideline. M26-A. 940 West Valley Road, Wayne, Pa 19087-1898 U.S.A.
- CLSI (formerly NCCLS)** 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. M100-S16.
- CLSI (formerly NCCLS)** 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; M7-A6.
- Coleman**, J.L., T.J. Sellati, J.E. Testa, R.R. Kew, M.B. Furie, J.L. Benach. 1995. *Borrelia burgdorferi* binds plasminogen, resulting in enhanced penetration of endothelial monolayers. *Infect. Immun.* 63:2478-2484.
- Comstock**, L.E., and D.D. Thomas. 1989. Penetration of endothelial cell monolayers by *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 57, 1626-1628.
- Craig**, W.A. 1995. Interrelationship between pharmacokinetics and pharmacodynamics in determining dosage regimens for broad spectrum cephalosporins. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 22: 89-96.
- Craig**, W.A. 1998. Pharmacokinetic / pharmacodynamic parameters: Rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin. Microbiol. Infect.* 26:1-12.
- Cui**, L., A. Iwamoto, J.Q. Lian, H.M. Neoh, T. Maruyama, Y. Horikawa, K. Hiramatsu. 2006. Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:428-438.
- Cunha**, B.A. 2000. Minocycline versus doxycycline in the treatment of Lyme neuroborreliosis. *Clin. Infect. Dis.* 30: 237-238.
- 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, D. Maladorno. 1997. Ceftriaxone compared with doxycycline for the treatment of acute disseminated Lyme disease. *N. Engl. J. Med.* 337:289-294.
- Davies**, T.A., L.M. Ednie, D.M. Hoelmann, G.A. Pankuch, M.R. Jacobs, P.C. Appelbaum. 2000. Antipneumococcal activity of ABT-773 compared to those of 10 other agents. *Antimicrob. Agent Chemother.* 44: 1894-1899.
- Decazes**, J.M., J.D. Ernst, M.A. Sande. 1983. Correlation of *in vitro* time-kill curves and kinetics of bacterial killing in cerebrospinal fluid during Ceftriaxone therapy of experimental *Escherichia coli* meningitis. *Antimicrob. Agent Chemother.* 24: 463-467.
- 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.

- De Silva**, A.M., S.R. Telford, L.R. Brunet, S.W. Barthold, E. Fikrig. 1996. *Borrelia burgdorferi* OspA is an arthropod-specific transmission-blocking Lyme disease vaccine. *J. Exp. Med.* 183: 271-275.
- Dever**, L.L., J.H. Jorgensen, A.G. Barbour. 1992. In vitro antimicrobial susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi*: a microdilution MIC method and time-kill studies. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2692-2697.
- Dever**, L.L., J.H. Jorgensen, A. G. Barbour. 1993a. Comparative in vitro activities of clarithromycin, azithromycin, and erythromycin against *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:1704-1706.
- Dever**, L.L., J.H. Jorgensen, A. G. Barbour. 1993b. In vitro activity of vancomycin against the spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 1115-1121.
- Dever**, L.L., C.V. Torigian, A.G. Barbour. 1999. In vitro activities of the evernimycin SCH 27899 and other newer antimicrobial agents against *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1773-1775.
- Dotevall**, L. and L. Hagberg. 1989. Penetration of doxycycline into cerebrospinal fluid in patients treated for suspected Lyme neuroborreliosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 1078-1080.
- Drusano**, G.L., D.E. Johnson, M. Rosen, H.C. Standifort. 1993. Pharmacodynamics of a fluoroquinolone antimicrobial agent in a neutropenic rat model of *Pseudomonas* sepsis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 483-490.
- Fahrer**, H., M.J. Sauvain, E. Zhioua, C.V. Hoecke, L.E. Gern. 1998. Long term survey (7 years) in a population at risk for Lyme borreliosis: what happens to the seropositive individuals? *Eur. J. Epidemiol.* 14:117-123.
- Firsov**, A.A., S.N. Vostrov, A.A. Shevchenko, S.H. Zinner, G. Cornaglia, Y.A. Portnoy. 1998. MIC-based interspecies prediction of the antimicrobial effects of ciprofloxacin on bacteria of different susceptibilities in an *in vitro* dynamic model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2848-2852.
- Firsov**, A.A., S.H. Zinner, I. Y. Lubenko, S.N. Vostrov. 2000. Gemifloxacin and ciprofloxacin pharmacodynamics in an *in-vitro* dynamic model: prediction of the equivalent AUC/MIC breakpoints and doses. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 16: 407-414.
- Firsov**, A.A., S.N. Vostrov, I.Y. Lubenko, Y.A. Portnoy, S.H. Zinner. 2004. Prevention of the selection of resistant *Staphylococcus aureus* by moxifloxacin plus doxycycline in an in vitro dynamic model: an additive effect of the combination. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 23: 451-456.
- da Franca**, I., L. Santos, T. Mesquita, M. Collares-Pereira, S. Baptista, L. Vieira, I. Viana, E. Vale, C. Prates. 2005. Lyme borreliosis in Portugal caused by *Borrelia lusitaniae*? Clinical report on the first patient with a positive skin isolate. *Wien Klin. Wochenschr.* 117:429-432.
- Fraser**, C.M., S. Casjens, W.M. Huang, G.G. Sutton, R. Clayton, R. Lathigra, O. White, K.A. Ketchum, R. Dodson, E.K. Hickey, M. Gwinn, B. Dougherty, J-F. Tomb, R.D. Fleischmann, D. Richardson, J. Peterson, A.R. Kerlavage, J. Quackenbush, S. Salzberg, M. Hanson, R. van Vugt, N. Palmer, M.D. Adams, J. Gocayne, J. Weidman, T. Utterback, L. Watthey, L. McDonald, P. Artiach, Ch. Bowman, S. Garland, C. Fujü, M.D. Cotton, K. Horst, K. Roberst, B. Hatch, H.O. Smith, J.C. Venter. 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* 390: 580-586.
- Foldvari**, G., R. Farkas, A. Lakos. 2005. *Borrelia spielmanii* erythema migrans, Hungary. *Emerg. Infect. Dis.* 11:1794-5.
- Forrest**, A., D.E. Nix, C.H. Ballow, T.F. Goss, MC Birmingham, J.J. Schentag. 1993. Pharmacodynamics of intravenous ciprofloxacin in seriously ill patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 1073-1081.
- Fung-Toms**, J. C., B. Minassian, B. Kolek, E. Huczko, L. Aleksunes, T. Stickle, T. Washo, E. Gradelski, L. Valera, D. Bonner. 2000. Antibacterial spectrum of a novel des-fluoro (6) Quinolone, BMS-284756. *Antimicrob. Agent Chemother.* 44: 3351-3356.

- Fukuda**, Y., K. Yanagihara, H. Ohno, Y. Higashiyama, Y. Miyazaki, K. Tsukamoto, Y. Hirakata, K. Tomono, Y. Mizuta, T. Tashiro, S. Kohno. 2006. *In Vivo* Efficacies and Pharmacokinetics of DX-619, a Novel Des-Fluoro (6) Quinolone, against *Streptococcus pneumoniae* in a Mouse Lung Infection Model. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:121-125.
- Galbraith**, K.M., A.C. Ng, B.J. Eggers, C.R. Kuchel, C.H. Eggers, D.S. Samuels. 2005. parC mutations in fluoroquinolone-resistant *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 4354-4357.
- Gasser**, R., I. Wendelin, E. Reisinger, J. Bergloff, B. Feigl, I. Schafhalter, B. Eber, M. Grisold, W. Klein. 1995. Roxithromycin in the treatment of Lyme disease – update and perspectives. *Infection* 23 Suppl. 1: 39-43.
- Georgilis**, K., M. Peacocke, M.S. Klempner. 1992. Fibroblasts protect the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, from ceftriaxone *in vitro*. *J. Infect. Dis.* 166: 440-444.
- Grasso**, S., G. Meinardi, I. De Carneri, V. Tamassia. 1978. New *in vitro* model to study the effect of antibiotic concentration and rate of elimination on antibacterial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 570–576.
- Gross**, D.M., T. Forsthuber, M. Tary-Lehmann., C. Etling, K. Ito., Z.A. Nagy, J.A. Field, A.C. Steere, B.T. Huber. 1998. Identification of LFA-1 as a candidate autoantigen in treatment-resistant Lyme Arthritis. *Science.* 281: 703-706.
- Guerau-de-Arellano**, M., B.T. Huber. 2002. Development of autoimmunity in Lyme arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 14:388-393.
- Hansen**, K., A. Hovmark, AM Lebech, K. Lebech, I. Olsson, L. Halkier-Sorensen, L., E. Olsson, 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 Dermatologica Venerologica* 72: 297-300.
- Hassler**, D., K. Riedel, J. Zorn, V. Preac-Mursic. 1991. Pulsed high-dose cefotaxime therapy in refractory Lyme borreliosis. *Lancet.* 338: 193.
- Henneberg**, J.P., and U. Neubert. 2002. *Borrelia burgdorferi* Group: *in-vitro* antibiotic sensitivity. *Orv. Hetil.* 143:1195-1198.
- Hooper** D. G. 2001. Emerging mechanism of fluoroquinolone resistance. *Emerging Inf. Dis.* 7:337-341.
- Hunfeld**, K.-P., P. Oschmann, R. Kaiser, J. Schulze, V. Brade. 1999. Diagnostics. In: Lyme Borreliosis and Tick-borne encephalitis, Eds. P. Oschmann, P. Kraiczy, J. Halperin, and V. Brade, UNI-Med, International publishers, Bremen.
- Hunfeld**, K.-P., P. Kraiczy, T.A. Wichelhaus, V. Schäfer, V. Brade. 2000a. A new colorimetric microdilution method for *in vitro* susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi* against antimicrobial substances. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19: 27-32.
- Hunfeld**, K.-P., P. Kraiczy, T.A. Wichelhaus, V. Schäfer, V. Brade. 2000b. Colorimetric *in vitro* susceptibility testing of penicillins, cephalosporines, macrolides, streptogramins, tetracyclines and aminoglycosides against *Borrelia burgdorferi* isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents* 15: 11-17.
- Hunfeld**, K.-P., und V. Brade. 2000c. Zeckenstich-Saison 2000, Dade Behring News 2/2000.
- Hunfeld**, K.-P., E. Kekoukh, T.A. Wichelhaus, P. Kraiczy, V. Brade. 2001. *In vitro* susceptibility of the *Borrelia burgdorferi* s. l. complex to ABT 773 - a novel ketolide. *J. Antimicrob. Chemother.* 48: 447-449.
- Hunfeld**, K.-P., P. Kraiczy, E. Kekoukh, V. Schäfer, V. Brade. 2002. 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): 125-137.

- Hunfeld, K.-P.** 2004. Contributions to seroepidemiology, diagnosis, and antimicrobial susceptibility of *Borrelia*, *Ehrlichia*, and *Babesia* as indigenous tick-conducted pathogens. Frankfurt (Main), Univ., Habil.-Schr., 2004
- Hunfeld, K.-P., E. Ruzic-Sabljić, D. E. Norris, P. Kraiczy, 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: 1294-1301.
- Hyatt, J.M., D.E. Nix, J.J. Schentag.** 1994. Pharmacokinetic and pharmacodynamic activities of ciprofloxacin against strains of *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* for which MICs are similar. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 2730–2737.
- Jacobs, M. R.** 2001. Optimisation of antimicrobial therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. *Clin. Microbiol. Infect.* 7: 589–596.
- Janovska, D., D. Hulinska, T. Godova.** 2001. Sensitivity of *Borrelia burgdorferi* strains isolated in the Czech Republic. *Cent. Eur. J. publ. Health* 9: 38-40.
- Johnson, R.C., C.B. Kodner, P.J. Jurkovich, J.J. Collins.** 1990a. Comparative *in vitro* and *in vivo* susceptibilities of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* to cefuroxime and other antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:2133-2136.
- Johnson, R.C., C. Kodner, M. Russell, D. Girard.** 1990b. *In-vitro* and *in-vivo* susceptibility of *Borrelia burgdorferi* to azithromycin. *J. Antimicrob. Chemother.* 1990. 25:33-38.
- Kaiser, R.** 1997. Borreliose. In *Infektiologie*. Hofmann-Verlag, 9/97: 22.
- Karchmer, A.W.** 2000. Cephalosporins. In *principles and practice of infectious diseases*, Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. Fifth Edition, Churchill Livingstone: 274-291.
- Karlsson, M., S. Hammers, I. Nilsson-Ehle, A.S. Malmberg, B. Wretling.** 1996. Concentrations of doxycycline and penicillin G in sera and cerebrospinal fluid of patients treated for neuroborreliosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 1104-1107.
- Kazragis, R.J., L.L. Dever, J.H. Jorgensen, A.G. Alan.** 1996. *In vivo* activities of ceftriaxon and vancomycin against *Borrelia* ssp. in the mouse brain and other sites. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 2632-2636.
- Kersten, A., C. Poitschek, S. Rauch, E. Aberer.** 1995. Effects of penicillin, ceftriaxone, and doxycycline on morphology of *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1127-1133.
- Kochi, S.K., R.C. Johnson.** 1988. Role of immunoglobulin G in killing of *Borrelia burgdorferi* by the classical complement pathway. *Infect. Immun.* 56: 314-321.
- Kraiczy, P., G. Acker, and V. Brade.** 1999. Characteristics of the pathogen. In: *Lyme Borreliosis and Tick-borne encephalitis*, Eds. P. Oschmann, P. Kraiczy, J. Halperin, and V. Brade, UNI-Med, International publishers, Bremen.
- Kraiczy, P., J. Weigand, T. A. Wichelhaus, P. Heisig, H. Backes, V. Schäfer, G. Acker, V. Brade, K.-P. Hunfeld.** 2001. *In vitro* activity of fluoroquinolones against the spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2486-2494.
- Kraiczy, P.** 2002. Natürliche Komplementresistenz und humorale Immunabwehr bei *Borrelia burgdorferi*, dem Erreger der Lyme-Borreliose. Habilitationsschrift. Frankfurt (Main), Univ.
- Kramer, M., R. Wallich, H. Hoffmann, M. Simon.** 2000. Lyme-Borreliose. *Deutsches Ärzteblatt* 49: 2503-2505.
- Labro, M.T.** 2000. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or "immuno-fairy tales"? *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 615-650.
- 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: 1529-1532.

- Lettieri**, J.T., M.C. Rogge, L. Kaiser, R.M. Echols, A.H. Heller. 1992. Pharmacokinetic profiles of ciprofloxacin after single intravenous and oral doses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:993-996.
- Levin**, J.M., J.A. Nelson, J. Segreti, B. Harrison, C.A. Benson, F. Strle. 1993. *In vitro* susceptibility of *Borrelia burgdorferi* to 11 antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 1444-1446.
- Lin**, B., R. Noring, A.C. Steere, M.S. Klempner, L.T. Hu. 2000. Soluble CD 14 levels in the serum, synovial fluid, and cerebrospinal fluid of patients with various stages of Lyme disease. *J. Infect. Dis.* 181: 1185-1188.
- Luft**, B.J., D.J. Volkman, J.J. Halperin, R.J. Dattwyler. 1988. New chemotherapeutic approaches in the treatment of Lyme borreliosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 539: 352-361.
- Ma**, Y., A. Sturrock, and J.J. Weis. 1991. Intracellular localisation of *Borrelia burgdorferi* within endothelial cells. *Infect. Immun.* 59: 671-678.
- Meisel**, C., und H. Blenk. 1988. Zur Wirksamkeit von Ciprofloxacin bei bakteriellen Hauterkrankungen. *Zeitschrift für Hautkrankheiten* 63: 1016-1022.
- Miksits**, K., und M.P. Dierich. 1999. Spezielle antimikrobielle Chemotherapie aus Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer-Verlag, 3. Auflage, Hrsg. H. Hahn, D. Falke und P. Klein.
- Montgomery**, R.R., D. Lusitani, A. De Boisfleury Chevance, S.E. Malawista. 2004. Tick saliva reduces adherence and area of human neutrophils. *Infect. Immun.* 72:2989-2994.
- Montgomery**, R.R., K. Schreck, X. Wang, S.E. Malawista. 2006. Human neutrophil calprotectin reduces the susceptibility of *Borrelia burgdorferi* to penicillin. *Infect. Immun.* 74:2468-2472.
- Morrissey**, I. 1997. Bactericidal index: a new way to assess quinolone bactericidal activity *in vitro*. *J. Antimicrob. Chemother.* 39: 713-717.
- Mouton**, J.W. 2002. Why the AUC/MIC ratio should not be used to predict the effects of beta-lactams. *Clin. Infect. Dis.* 35:209-210.
- Murgia**, R., F. Marchetti, and M. Cinco. 1999. Comparative bacteriostatic and bactericidal activities of ceftiofime against *Borrelia burgdorferi* s. l. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 3030-3032.
- Mursic**, V.P., G. Wanner, S. Reinhardt, B. Wilske, U. Busch, W. Margret. 1996. Formation and cultivation of *Borrelia burgdorferi* spheroplast-L-form variants. *Infection* 24: 218-226.
- Naber**, K.G., and D. Adam. 1998. Einteilung der Fluoroquinolone. *Chemother. J.* 7: 66-68.
- Nakashima**, M, T. Uematsu, K. Kosuge, K. Umemura, H. Hakusui, M. Tanaka. 1995. Pharmacokinetics and tolerance of DU-6859a, a new fluoroquinolone, after single and multiple oral doses in healthy volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:170-174.
- Norgard**, M.V., S.I. Baker, J.D. Radolf. 1995. Chemiluminescent analysis of *Borrelia burgdorferi* penicillin-binding proteins using ampicillin conjugated to digoxigenin. *Microb. Pathog.* 19:257-272.
- Oschmann**, P., and R. Kaiser. 1999. Clinical symptoms; Therapy and prognosis. In: Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis, Eds. P. Oschmann, P. Kraiczy, J. Halperin, and V. Brade, UNI-Med, International publishers, Bremen. Seiten 52-79.
- Pavia**, C.S., G.P. Wormser, J. Nowakowski, A. Cacciapuoti. 2001. Efficacy of an evernimycin (SCH27899) *in vitro* and in an animal model of Lyme disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 936-937.
- Pfister**, H.W., K.M. Einhäupl, V. Preac-Mursic, B. Wilske, G. Schierz. 1984. The spirochetal etiology of lymphocytic meningoradiculitis of Bannwarth (Bannwarth syndrome). *J. Neurol.* 231: 141-144.
- Pfister**, H.W., V. Preac-Mursic, B. Wilske, F. Schielke, F. Sorgel, K.M. Einhäupl. 1991. Randomized comparison of ceftriaxone and cefotaxime in Lyme neuroborreliosis. *J. Infect. Dis.* 163: 311-318.

- Periti, P.**, and T. Mazzei. 1999. Clarithromycin: pharmacokinetic and pharmacodynamic interrelationships and dosage regimen. *J. Chemother.* 11: 11-27.
- Periti, P.**, and P. Nicoletti. 1999. Classification of betalactam antibiotics according to their pharmacodynamics. *J. Chemother.* 11:323-330.
- Postic, D.**, M.V. Assous, P.A.D. Grimont, 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. Sys. Bacteriol.* 44: 743-752.
- Pradhan, R. S.**, L. E. Gustavson, D. D. Londo, Y. Zhang, J. Zhang, M. M. Paris. 2000. Single oral dose pharmacokinetic and safety of ABT-773 in healthy subjects. ICAAC Toronto: Board 21.
- Preac-Mursic, V.**, B. Wilske, G. Schierz, M. Holmburger, E. Suss. 1987. *In vitro* susceptibility of *Borrelia burgdorferi*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 6: 424-426.
- Preac-Mursic, V.**, B. Wilske, G. Schierz, E. Suss, B. Gross. 1989. Comparative antimicrobial activity of the new macrolides against *Borrelia burgdorferi*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 8:651-653.
- Preac-Mursic, V.**, W. Marget, U. Busch, D. Pleterski Rigler, S. Hagl. 1996. Kill kinetics of *Borrelia burgdorferi* and bacterial findings in relation to the treatment of Lyme borreliosis. *Infection* 24:9-16.
- Purser, J.E.**, S.L. Norris. 2000. Correlation between plasmid content and infectivity in *Borrelia burgdorferi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97:13865-13870.
- Rahn, D. W.** Lyme disease. 2000. In *Infectious diseases*, Armstrong D., and Cohen J. Chapter 45.2.
- Ross, G.H.**, D.H. Wright, L.B. Hovde, M.L. Peterson, J.C. Rotschafer. 2001. Fluoroquinolone resistance in anaerobic bacteria following exposure to levofloxacin, trovafloxacin, and sparfloxacin in an *in vitro* pharmacodynamic model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2136-2140.
- Satz, N.** 2002. *Klinik der Lyme-Borreliose*. 2. Auflage 2002. Huber, Bern.
- Scaglione, F.**, G. Demartini, M.M. Arcidiacono, S. Dugnani, F. Fraschini. 1998. Influence of protein binding on the pharmacodynamics of ceftazidime or ceftriaxone against gram-positive and gram-negative bacteria in an *in vitro* infection model. *J. Chemother.* 10:29-34.
- Scaglione, F.** 2002. Can PK/PD be used in everyday clinical practice. *Int. J. Antimicrob. Agents* 19: 349-353.
- Schäfer, C.**, M. Hashn, P. Oschmann. 1999. Tick ecology and epidemiology. In: *Lyme Borreliosis and Tick-borne encephalitis*, Eds. P. Oschmann, P. Kraiczy, J. Halperin, and V. Brade, UNI-Med, International publishers, Bremen.
- Scheffold, N.**, C. Sucker, J. Bergler-Klein, N. Kaag, J Cyran. 2000. Akute Myokarditis und Kardiomyopathie bei der Lyme-Borreliose. *Z. Kardiol.* 89: 1046-1052.
- Schentag, J. J.**, K.K. Gilliland, J.A. Paladino. 2001. What have we learned from pharmacokinetic and pharmacodynamic theories? *Clin. Infect. Dis.* 32, Suppl. 1: 39-46.
- Schmid, G.P.**, A.G. Steigerwalt, S.E. Johnson, A.G. Barbour, A.C. Steere, I.M. Robinson, D.J. Brenner. 1984. DNA characterization of the spirochete that causes Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.* 20:155-158.
- Schutzer, S.E.**, and B.H. Natelson. 1999. Absence of *Borrelia burgdorferi*-specific immune complexes in chronic fatigue syndrome. *Neurology* 53:1340-1341.
- Schutzer, S.E.**, P.K. Coyle, P. Reid, B. Holland. 1999. *Borrelia burgdorferi*-specific immune complexes in acute Lyme disease. *JAMA.* 282:1942-1946.
- Seshu, J.**, and J. T Skare. 2001. The many faces of *Borrelia burgdorferi*. In *The Spirochetes: molecular and cellular biology*. Chapter 16: 147-158. Horizon scientific press. Wymondham UK.

- Sicklinger**, M., R. Wienecke, U. Neubert. 2003. *In vitro* susceptibility testing of four antibiotics against *Borrelia burgdorferi*: a comparison of results for the three Genospezies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, and *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. J. Clin. Microbiol. 41:1791-1793.
- Simon**, C., und W. Stille. 2000. Antibiotika-Therapie in Klinik und Praxis. 10., neubearbeitete und erweiterte Auflage, Schattauer Verlag, Stuttgart, New York.
- Steere**, A.C., R.L. Grodzicki, A.N. Kornblatt, J.E. Craft, A.G. Barbour, W. Burgdorfer, G.P. Schmid, E. Johnson, S.E. Malawista. 1983. The spirochetal etiology of Lyme disease. N Engl J Med. 308:733-740.
- Steere**, A.C. 2000. *Borrelia burgdorferi*. In principles and practice of infectious diseases, Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. Fifth Edition, Churchill Livingstone, 2504-2518.
- Stiernstedt**, S.H., T. Tadesse, B. Wretling. 1999. Dialysis culture for determination of MIC and MBC of benzylpenicillin against *Borrelia burgdorferi*. APMIS 107: 380-382.
- Stout**, J.E., K. Sens, S. Mietzner, A. Obman, V.L. Yu. 2005. Comparative activity of quinolones, macrolides and ketolides against *Legionella species* using *in vitro* broth dilution and intracellular susceptibility testing. Int. J. Antimicrob. Agent. 25: 302-307.
- Wallrauch-Schwarz**, C., D. Milatovic, I. Braveny. 1993. Evaluation of the serum bactericidal test. Arzneimittelforschung. 43:1378-1381.
- Wang**, G., A.P. van Dam, I. Schwartz, J. Dankert. 1999. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato*: Taxonomic, epidemiological, and clinical implications. Clin. Microbiol. Rev. 12: 633-653.
- Wiedemann**, B. 1983. Comparison of the activity of cefaclor with amoxicillin, erythromycin and doxycycline in an *in vitro* model. Arzneim.-Forsch. 33: 1232-1235.
- Wilske**, B., V. Preac-Mursic, U.B. Göbel, B. Graf S. Jauris, E. Soutchek, E. Schwab, G. Zumstein. 1993. An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. J. Clin. Microbiol. 31: 340-350.
- Wilske**, B., S. Jauris-Heipke, R. Lobentanzer, I. Pradel, V. Preac-Mursic, D. Röbber, E. Soutchek, R.C. Johnson. 1995. Phenotypic analysis of outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi sensu lato* by monoclonal antibodies: relationship to Genospezies and OspA serotype. J. Clin. Microbiol. 33: 103-109.
- Wilske**, B., L. Zoeller, V. Brade, H. Eiffert, U.B. Goebel, G. Stanek, H.W. Pfister. 2000. Qualitätsstandards in der Mikrobiologisch-Infektiologischen Diagnostik: Lyme-Borreliose. Urban & Fischer Verlag, München.
- Wilske**, B., und V. Fingerle. 2000. Therapie der Lyme-Borreliose. MMW Fortschr. Med. 142: 322-323.
- Woodnutt**, G. 2000. Pharmacodynamics to combat resistance. J. Antimicrob. Chemother. 46: 25-31.
- 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.
- Wright**, D.H., G.H. Brown, M.L. Peterson, J.C. Rotschafer. 2000. Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. J. Antimicrob. Chemother. 46: 669-683.
- Zhioua**, E., L. Gern, A. Aeschlimann, M.J. Sauvain, S. Van der Linden, H. Fahrner. 1998. Longitudinal study of Lyme borreliosis in a high risk population in Switzerland. Parasite 5:383-386.
- Zorn** J., D. Hassler., V. Reac-Mursic. 1992. Progrediente Pannikulitis durch *Borrelia burgdorferi*. Lyme-Borreliose. MMV Medizin Verlag: 125-130.

7 Anhang

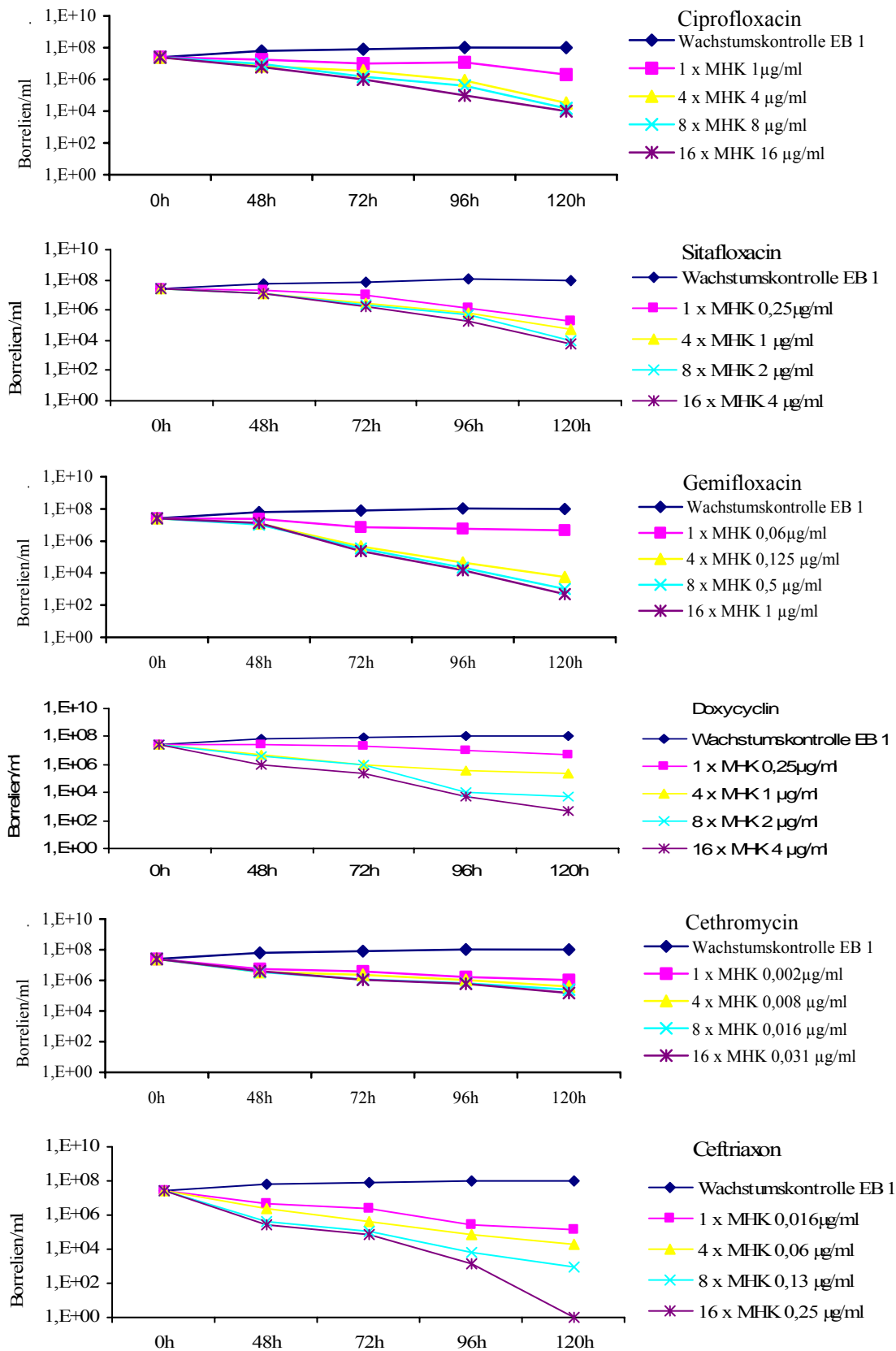


Abbildung 7.1. Abtötungskinetik des Isolates **EB 1** (*B. afzelii*) bei 1-, 4-, 8- und 16 x MHK unter Ciprofloxacin, Sitafloxacin, Gemifloxacin, Doxycyclin, Cethromycin und Ceftriaxon.

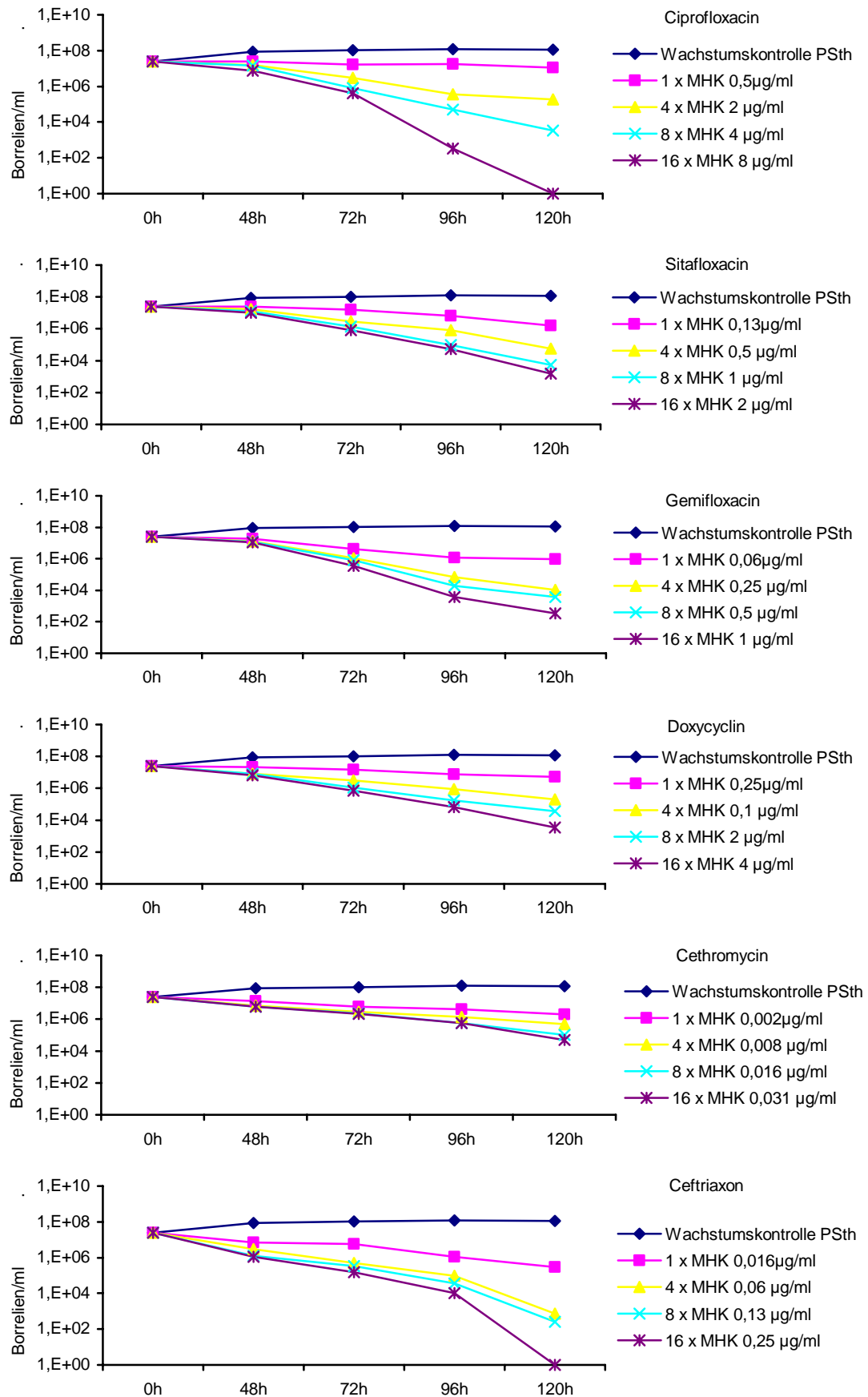


Abbildung 7.2. Abtötungskinetik des Isolates PStH (*B. garinii*) bei 1-, 4-, 8- und 16 x MHK unter Ciprofloxacin, Sitafloxacin, Gemifloxacin, Doxycyclin, Cethromycin und Ceftriaxon.

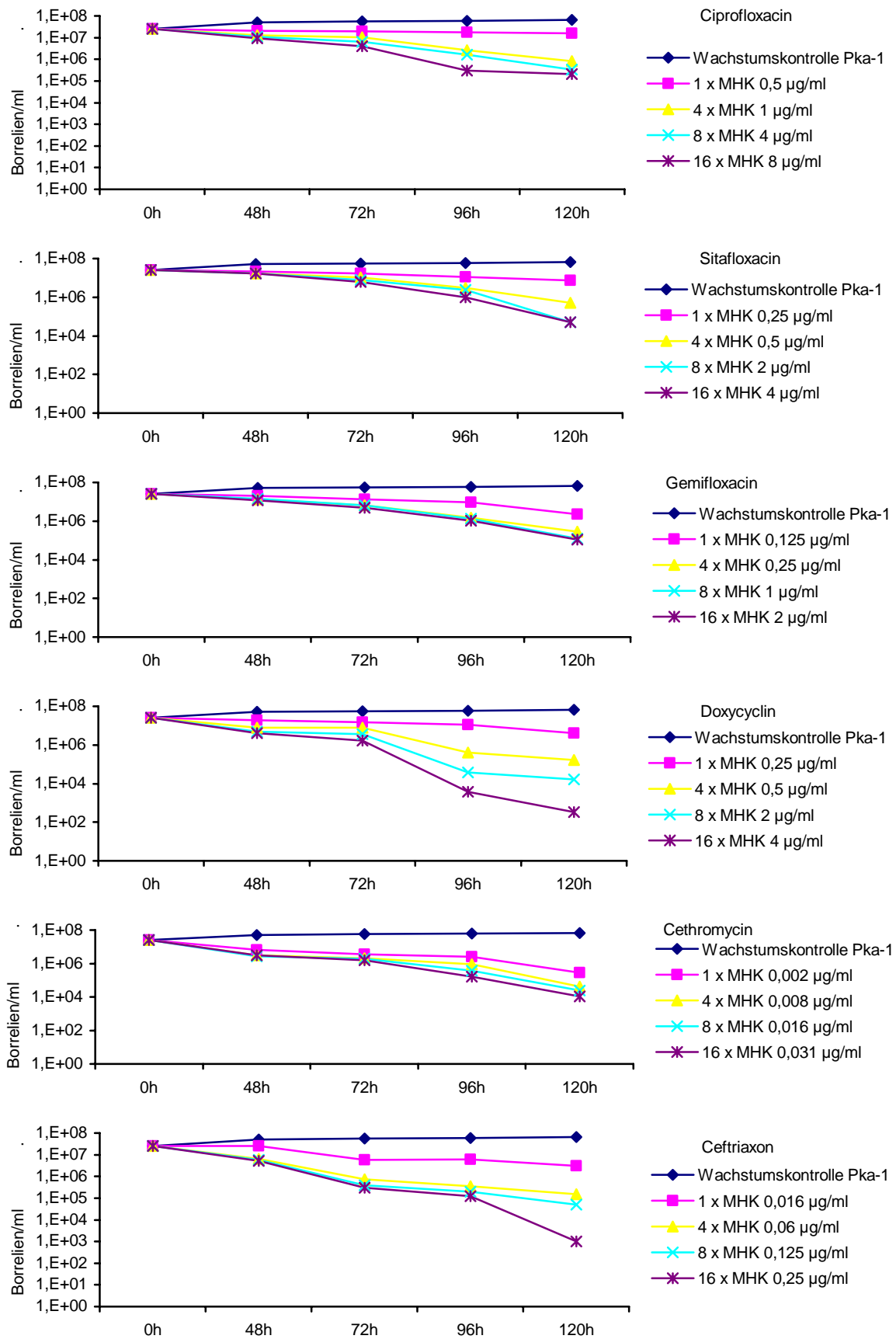


Abbildung 7.3. Abtötungskinetik des Isolates **Pka-1** (*B. burgdorferi* s. s.) bei 1-, 4-, 8- und 16 x MHK unter Ciprofloxacin, Sitafloxacin, Gemifloxacin, Doxycyclin, Cethromycin und Ceftriaxon.

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Volker Brade, Direktor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, möchte ich für die Überlassung des Themas danken.

Herrn Priv. Doz. Dr. med. Klaus-Peter Hunfeld, Oberarzt am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene möchte ich ganz besonders für die vielfältige Unterstützung, kritischen Anregungen und wertvollen Diskussionen bei der Durchführung der Untersuchungen und Abfassung der vorliegenden Arbeit danken.

Ebenso gilt mein Dank allen MitarbeiterInnen des Institutes für die Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit und das sehr gute Arbeitsklima. Hervorzuheben sind Herr Priv. Doz. Dr. phil. nat. Peter Kraiczky und Herr Priv. Doz. Dr. Tomas Wichelhaus, bei denen ich mich für ihre vielfältigen wissenschaftlichen Anregungen bedanke. Frau Dr. Annette Mischke und Frau Annette Schröder möchte ich für das Korrekturlesen der Arbeit danken. Herrn Diplom-Ingenieur Waldemar Wesner danke ich für die wertvolle Hilfe bei der Flächenerrechnung.

Ausdrücklich hervorzuheben ist das freundliche Entgegenkommen und die wertvolle Hilfe von Frau Christa Hanssen-Hübner (MTA) und Frau Angelika Sames (MTA), die sehr viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann, meinem Sohn und allen Freunden, die mir durch ihr Verständnis, ihr Interesse, ihre Ermutigung und ihre Freundschaft geholfen haben.

9 Abkürzungsverzeichnis

\leq :	kleiner oder gleich
\geq :	größer oder gleich
ACA:	Acrodermatitis chronica atrophicans
AK:	Antikörper
ATCC:	American Type Culture Collection
AUC:	area under the concentration-vs.-time curve
AV:	Atrioventrikulär
B.:	Borrelia
BI:	Bakterizidie-Index
Bp:	Basenpaare
BSK:	Barbour-Stoenner-Kelly-Medium
C_{\max} :	maximale Plasmakonzentration
ch.:	chronisch
CLSI:	Clinical and Laboratory Standards Institute / neuer Bezeichnung für NCCLS
d:	Tag
DbpA:	Decorin binding protein A
E:	Extinktion
ELISA:	Enzyme-linked immunosorbent assay
EM:	Erythema migrans
EDTA:	Ethylen-Diamino-Tetraessigsäure
et al.:	et alii (und andere)
h:	Stunde
HEPES:	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HSP:	Heat shock protein
I.:	Ixodes
i. v.:	intravenös
kb:	Kilo-Basenpaare
IL:	Interleukin
l:	Liter
MBK:	Minimale bakterizide Konzentration

MHK:	Minimale Hemmkonzentration
<i>Mlu</i> I:	Restriktionsenzym aus <i>Micrococcus luteus</i>
<i>Mse</i> I:	Restriktionsenzym aus <i>Micrococcus species</i>
NCCLS:	National Committee for Clinical Laboratory Standards / frühere Bezeichnung für CLSI
NK:	natürliche Killerzellen
OD:	Optische Dichte
Osp:	Outer surface protein
p:	Protein
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR:	Polymerase chain reaction
p. o.:	per os
RFLP:	Restriction-fragment-length-polymorphism
rDNA:	ribosomal DNA
s. l.:	sensu lato
s. s.:	sensu stricto
T>MHK %:	Prozentuales Zeitintervall zwischen den Antibiotikumdosen über MHK
T ^{1/2} :	Halbwertszeit
Th:	T-Helfer
TNF:	Tumor-Nekrose-Faktor
VlsE:	variable Oberflächenprotein: vmp (variable major protein)-like sequence locus E

10 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel: Untersuchungen zur in vitro-Empfindlichkeit von *Borrelia burgdorferi* gegen Ciprofloxacin, Sitafloxacin, Gemifloxacin, Cethromycin, Doxycyclin und Ceftriaxon, im Zentrum der Hygiene, des Fachbereichs Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Volker Brade mit Unterstützung durch Herrn Priv. Doz. Dr. med. Klaus-Peter Hunfeld, Oberarzt am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführte Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden im Journal of Antimicrob. Chemother. 2001 Sept; 48 (3): 447-449: „*In vitro* susceptibility of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex to ABT-773, a novel ketolide” veröffentlicht.

Frankfurt, den 25. November 2007

11 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Elena Kekukh
 Anschrift: An der Farrwiese 10, 66424 Homburg
 Geboren: 16.06.1968 in Nowoalexandrowsk, Russland
 Familienstand: verheiratet, Sohn Alexander geb. am 19.01.2002

Schulbildung:

09 / 1975 – 05 / 1985 Gymnasium, Russland

Beruflicher Werdegang:

09 / 1985 – 07 / 1987 MTLA-Ausbildung, St. Petersburg, Russland

08 / 1987 – 09 / 1992 MTLA, Zentrallabor, Krankenhaus Nr.26, St. Petersburg

09 / 1989 – 01 / 1996 Medizinstudium an der Staatlichen Medizinischen Metschnikow Akademie, St. Petersburg, Russland

02 / 1996 – 08 / 1997 MTLA-Schule, Wiesbaden, am 04.06.1997 staatliche Prüfung

09 / 1997 – 10 / 1997 Laborpraktikum „In vitro diagnostika GmbH“, Mainz-Kastel

10 / 1997 – 03 / 1998 Sprachkurs und Zertifikat, JWG-Universität Frankfurt

04 / 1998 – 04 / 1999 Medizinstudium und PJ im Kreiskrankenhaus Bad Homburg, JL-Universität Gießen

26.04.1999 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, JL-Universität Gießen

07 / 1999 – 12 / 1999 ÄiP, Urologie, St. Katharinen Krankenhaus, Frankfurt

01 / 2000 – 12 / 2001 ÄiP und Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der JWG-Universität Frankfurt, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Doktorarbeit

28.06.2001 Approbation als Ärztin, Hessisches Landesprüfungsamt für Heilberufe, Frankfurt

01 / 2002 – 11 / 2004 Abfassung der Doktorarbeit, Elternzeit

11 / 2004 – 05 / 2007 Assistenzärztin am Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie, DRK- Blutspendedienst, Mannheim

07 / 2007 – derzeit Assistenzärztin am Institut für klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin, Uniklinikum Saarland, Homburg

12 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden vor Abschluss des Promotionsverfahrens veröffentlicht:

Hunfeld, K.-P., E. Kekoukh, T.A. Wichelhaus, P. Kraiczy, V. Brade. 2001. *In vitro* susceptibility of the *Borrelia burgdorferi* s. l. complex to ABT 773 - a novel ketolide. J. Antimicrob. Chemother. 48: 447-449.

Hunfeld, K.-P., P. Kraiczy, E. Kekoukh, V. Schäfer, V. Brade. 2002. 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): 125-137.

Hunfeld; K.-P., J. Weigand, T.A. Wichelhaus, E. Kekoukh, P. Kraiczy, V. Brade. 2001. *In vitro* activity of mezlocillin, meropenem, aztreonam, vancomycin, teicoplanin, ribostamycin and fusidic acid against *Borrelia burgdorferi*. Int. J. Antimicrob. Agents. 17: 203-208.