

**Martin Sicklinger**

***In-vitro-Sensibilität von *Borrelia burgdorferi* sensu lato gegenüber vier Antibiotika: ein Vergleich der Genospezies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* und *Borrelia burgdorferi* sensu stricto***

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. hc. mult. G. Plewig

*In-vitro*-Sensibilität von *Borrelia burgdorferi* sensu lato gegenüber vier Antibiotika: ein  
Vergleich der Genospezies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* und *Borrelia burgdorferi* sensu  
stricto

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Martin Sicklinger  
aus München  
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. hc. mult. G. Plewig

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. B. Wilske  
Priv. Doz. Dr. med. U. Wintergerst

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. U. Neubert

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 30.03.2006

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Borrelia burgdorferi</i> .....	<b>1</b>
1.1.1 Von der Erstbeschreibung einzelner Manifestationen bis zur Erregerentdeckung.....	<b>1</b>
1.1.2 Taxonomie.....	<b>2</b>
1.1.3 Morphologie.....	<b>3</b>
1.1.4 Wachstumsbedingungen.....	<b>3</b>
1.1.5 Schildzecken der Gattung <i>Ixodes</i> als Hauptvektoren in der Erregerübertragung.....	<b>3</b>
1.2 Lyme-Borreliose – eine Multisystemkrankheit.....	<b>4</b>
1.2.1 Definition.....	<b>4</b>
1.2.2 Epidemiologie und Pathogenese.....	<b>4</b>
1.2.3 Krankheitsverlauf.....	<b>5</b>
1.2.4 Hautmanifestationen.....	<b>6</b>
1.2.4.1 Erythema migrans (EM).....	<b>6</b>
1.2.4.2 Borrelien-Lymphozytom (BL).....	<b>6</b>
1.2.4.3 Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA).....	<b>7</b>
1.2.4.4 Sklerosierende Hautveränderungen.....	<b>7</b>
1.2.5 Weitere Krankheitsbilder.....	<b>8</b>
1.2.6 Diagnostik.....	<b>8</b>
1.2.7 Therapie.....	<b>9</b>
1.2.8 Prognose.....	<b>10</b>
1.3 Fragestellung.....	<b>10</b>

<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>13</b>
2.1	Isolate.....	13
2.2	Antibiotika.....	14
2.3	Nährmedium.....	15
2.4	Herstellung der Verdünnungsreihen.....	15
2.5	Mikroskopie.....	16
2.6	Bestimmung von MHK und MBK.....	17
2.6.1	Definitionen.....	17
2.6.2	Bestimmung der MHK.....	17
2.6.3	Bestimmung der MBK.....	18
2.7	Statistik.....	18
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>20</b>
3.1	Minimale Hemmkonzentrationen (MHK).....	20
3.2	Minimal bakterizide Konzentrationen (MBK).....	22
3.3	Statistische Analyse.....	24
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>29</b>
4.1	Interpretation der Ergebnisse.....	29
4.1.1	Allgemeines.....	29
4.1.2	MHK-Werte.....	30

4.1.3	MBK-Werte.....	30
4.2	Schlussfolgerungen.....	31
4.3	Kritische Anmerkungen.....	32
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>36</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>38</b>
<b>7.</b>	<b>VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>48</b>
<b>8.</b>	<b>DANKSAGUNGEN.....</b>	<b>49</b>
<b>9.</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>50</b>

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 *Borrelia burgdorferi*

### 1.1.1 Von der Erstbeschreibung einzelner Manifestationen bis zur Erregerentdeckung

Von der Erstbeschreibung der häufigsten Symptome der Multisystemkrankheit Lyme-Borreliose Ende des 19. und Anfang des 20. Jahrhunderts bis hin zur Entdeckung des Erregers durch Burgdorfer et al. 1982 (13) waren internationale Wissenschaftler lange im Unklaren über die Ursachen der Krankheitserscheinungen. Weber et al. unterteilen diese Zeitspanne grob in drei Abschnitte (76,79):

*Phase 1 (1902-1945):* Lange vor allen anderen Krankheitserscheinungen wurden seit 1883 die für diese Infektionskrankheit typischen Hautveränderungen beschrieben: Basierend auf Arbeiten von Buchwald und vielen anderen Autoren stellten Herxheimer und Hartmann 1902 eine Entzündungsreaktion der Haut mit vorwiegend akraler Lokalisation, später oft in ein atrophisches Stadium übergehend, als eigene Krankheitsentität heraus. Sie führten den Namen *Acrodermatitis chronica atrophicans* ein und beschrieben mit dieser noch heute gültigen Krankheitsbezeichnung die wichtigsten Merkmale dieser kutanen Spätmanifestation der europäischen Lyme-Borreliose. (25) Der Begriff *Erythema migrans* wurde erstmals 1910 vom schwedischen Arzt Afzelius gebraucht. (2) Der Terminus *Lymphadenosis cutis benigna*, neuerdings vielfach auch als Borrelienlymphozytom bezeichnet, wurde 1911 vom Schweizer Jean Louis Burckhardt geprägt. (11) 1941 berichtete der deutsche Neurologe Bannwarth über eine Reihe von Patienten mit charakteristischen neurologischen Symptomen. Diese in Form von Meningoradikuloneuritiden auftretenden Beschwerden wurden später unter dem Begriff *Bannwarth-Syndrom* zusammengefasst. (5)

*Phase 2 (1946-1976):* Diese Periode stand ganz im Zeichen der ersten Therapieansätze. 1946 setzte Nana Svartz als erste Ärztin überhaupt Penicillin bei zwei ACA-Patienten ein, weil sie bei ihnen zuvor eine erhöhte Blutkörperchensenkung festgestellt hatte. Der Versuch war ein Erfolg. (73) 1949 führte der schwedische Mikrobiologe Thyresson die erste größere Studie einer Penicillintherapie gegen ACA durch, welche bei fast allen Patienten deutliche Symptombesserungen zeigte. (75) In den folgenden Jahren wurden zahlreiche weitere Untersuchungen hinsichtlich der Wirksamkeit von Penicillin aber auch von anderen damals bekannten antimikrobiellen Substanzen durchgeführt. (79) In den späten Vierzigern

testete Hollström auch beim Erythema migrans erfolgreich die Effektivität einer Penicillintherapie. (27) Die Lymphadenosis cutis benigna wurde erstmals 1950 durch Bianchi mit Penicillin behandelt. (9) Darauf basierend, postulierte Hauser 1955 erstmals einen Zusammenhang der drei Hautmanifestationen ECM, LACB und ACA sowie eine gemeinsame Ätiologie durch Zeckenstiche. Auch stellte er erstmals die ACA als systemische, nicht auf die Haut beschränkte Erkrankung heraus. (23)

*Phase 3 (seit 1977):* Mehr als zwanzig Jahre später beschrieben Steere et al. eine mögliche Verbindung zwischen dermatologischen, neurologischen und rheumatologischen Symptomen als einzelnen Komponenten einer Multisystemkrankheit, die sie nach einer amerikanischen Kleinstadt mit deutlich gehäuftem Auftreten insbesondere der rheumatologischen Manifestationen *Lyme disease* nannten. (72)

Man vermutete einen bakteriellen Erreger, der von Schildzecken der Gattung *Ixodes* übertragen wird. Willy Burgdorfer untersuchte im Herbst 1981 mehrere adulte Schildzecken der Spezies *Ixodes dammini* (heutige Bezeichnung: *Ixodes scapularis*) und fand auffallend lange Spirochäten, die ihn an den Erreger eines durch Lederzecken übertragenen Rückfallfiebers, *Borrelia duttonii*, erinnerten. (12,13,29) In einem von Kelly 1974 zur Anzucht von *Borrelia hermsii* entwickelten flüssigen Nährmedium, das in den folgenden Jahren von Stoenner und Barbour, den Mitarbeitern Burgdorfers, weiterentwickelt worden war, gelang es 1981 erstmals, die aus Zeckendärmen gewonnenen Spirochäten anzuzüchten, die man später als Borrelien klassifizieren konnte. (7,29) Sie wurden 1984 Willy Burgdorfer zu Ehren mit der Speziesbezeichnung *Borrelia burgdorferi* versehen. (48)

### **1.1.2 Taxonomie**

Taxonomisch gehört *Borrelia burgdorferi* zur Familie der Spirochaetaceae und zum Genus *Borrelia*. (65) Weltweit kennt man heute an die 30 Arten (28), darunter *Borrelia recurrentis*, den von Läusen übertragenen Erreger des Rückfallfiebers, und eben auch die von Schildzecken der Gattung *Ixodes* übertragene Spezies *Borrelia burgdorferi*, die weiter in verschiedene Subtypen (Genospezies) unterteilt wird. Von den elf heute bekannten haben insbesondere die Genospezies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* und *Borrelia burgdorferi* sensu stricto klinische Bedeutung. Diese werden gewöhnlich unter dem Überbegriff *Borrelia burgdorferi* sensu lato zusammengefasst. (56,76)



### 1.1.3 Morphologie

Morphologisch handelt es sich um schraubenförmig gewundene gramnegative Bakterien mit periplasmatischen Flagellen. Die Fortbewegung wird durch Fibrillen ermöglicht, die bei Kontraktion zu einer Rotation des Zellkörpers führen und auch seitliche Bewegungen erlauben. Dadurch kann *Borrelia burgdorferi* gut in Gewebe eindringen und sich schnell ausbreiten. (28,65)

### 1.1.4 Wachstumsbedingungen

Im Vergleich zu vielen anderen Bakterienarten ist *Borrelia burgdorferi* relativ schwierig anzuzüchten. Barbour entwickelte ein spezielles Nährmedium das unter anderem Aminosäuren, Vitamine, anorganische Salze, N-Acetyl-Glucosamin, Serumalbumin und Kaninchenserum enthält. (7,65) Nach ihm und seinen Kollegen Stoenner und Kelly wurde es als Barbour-Stoenner-Kelly-Medium, kurz BSK-Medium, bezeichnet. Um die Bedingungen weiter zu optimieren, wurden im Lauf der Zeit mehrere Modifikationen vorgenommen. Erwähnenswert sind das Modified-Kelly-Medium (MKP) nach Preac-Mursic et al. (66,83) und eine kommerziell vertriebene Version des BSK-Mediums, BSK-H mit 6% Kaninchenserum. (61)

*Borrelia burgdorferi* kann grundsätzlich entweder aus dem Zeckendarm oder Biopsiematerial wie infizierter Haut, Synovia, Blut oder Nervengewebe gewonnen werden. Das Material sollte so schnell wie möglich in eine Puffer- oder Kochsalzlösung gegeben und dann in das Nährmedium verbracht werden. Optimale Wachstumsbedingungen sind bei 30-35° C gegeben. Wegen der langen Generationszeit von *Borrelia burgdorferi* kann eine Inkubationsdauer von drei bis fünf Wochen erforderlich sein. (44,83)

### 1.1.5 Schildzecken der Gattung *Ixodes* als Hauptvektoren in der Erregerübertragung

Um auf Säuger übertragen zu werden, benötigt *Borrelia burgdorferi* einen Vektor. In Europa ist dies in fast allen Fällen *Ixodes ricinus*, der gemeine Holzbock. (54) In Nordamerika sind andere Schildzeckenarten wie *Ixodes scapularis* oder *Ixodes pacificus* in regional unterschiedlichem Maße infiziert.

Zoologisch gehören Zecken zu den Spinnentieren. (54) Ihre saisonale Aktivität beginnt im März und endet Anfang November. (20)

Geographisch sind Zecken der Spezies *Ixodes ricinus* etwa zwischen dem 40. und dem 60. Breitengrad heimisch. Ihr Hauptverbreitungsgebiet ist Europa und erstreckt sich von Skandinavien bis zum Mittelmeer und vom Atlantik bis zur Wolga. (54)

Es gibt etliche Studien darüber wie hoch der Prozentsatz mit Borrelien infizierter Zecken in bestimmten Regionen ist. Während die Infektionsrate bei Larven niedriger ist, liegt sie bei Nymphen und Adulti in Mitteleuropa bei durchschnittlich ca. 20%, in den USA sind es sogar um die 50%. (20,54)

## **1.2 Lyme-Borreliose – eine Multisystemkrankheit**

### **1.2.1 Definition**

Das Center of Disease Control (CDC) in Atlanta hat den Begriff „Lyme-Borreliose“ folgendermaßen definiert:

Eine Lyme-Borreliose liegt dann vor, wenn ein Patient an einem Erythema migrans erkrankt, selbst wenn die Infektion noch nicht serologisch gesichert ist. In den Stadien II und III muss zusätzlich zu den jeweiligen Symptomen ein indirekter oder direkter Erregernachweis mittels serologischer Testung oder Anzüchtung von *Borrelia burgdorferi* sensu lato gelingen. (30)

### **1.2.2 Epidemiologie und Pathogenese**

Die Lyme-Borreliose ist eine weltweit verbreitete Anthropozoonose, deren Prävalenz direkt mit den Verbreitungsgebieten des Vektors, der Schildzeckengattung *Ixodes*, korreliert. Diese erstrecken sich über nahezu alle Regionen innerhalb der gemäßigten Zone der Nordhemisphäre, also USA und südliches Kanada, fast ganz Europa, weite Teile Zentralasiens und Japan. (70)

Interessanterweise folgt die geographische Verteilung der einzelnen Genospezies einem bestimmten Muster: Während *B. burgdorferi* sensu stricto fast ausschließlich in Nordamerika isoliert wurde, sind *B. garinii* und *B. afzelii* aber auch andere Borrelienspezies fraglicher Pathogenität, wie beispielsweise *B. valisiana*, vorwiegend auf dem eurasischen Kontinent beheimatet. (14,76,82) In Japan wurden neben diesen auch andere Genospezies isoliert die nur dort endemisch sind, beispielsweise *B. japonica*. (18,55)

Bemerkenswert hierbei ist vor allem die Tatsache, dass auch die verschiedenen Manifestationen der Lyme-Krankheit ortsabhängig variieren. Diese Beobachtung wurde durch molekulargenetische Untersuchungen von Borrelien aus verschiedenen Biopsien bestätigt: So ist die ACA mit *B. afzelii* assoziiert und kommt fast ausschließlich in Europa vor, während überzufällig häufig *B. garinii* aus dem Liquor cerebrospinalis von Neuroborreliosepatienten in Europa isoliert wurde. *B. burgdorferi* sensu stricto konnte man sowohl aus der Haut als auch extrakutan gewinnen. Bemerkenswert hierbei ist das überzufällig häufige Vorkommen bei der Lyme-Arthritis. (14,56,70,76,82)

Die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung nach einem Zeckenstich für einen gesunden Erwachsenen beträgt rund 1%. (30) Nach Auftreten eines ECM kommt es in etwa 15% der Fälle nach Wochen bis Monaten zu Symptomen des zweiten Stadiums, in ca. 10% nach Monaten oder Jahren zu einer Borreliose des Stadiums III. (31)

### **1.2.3 Krankheitsverlauf**

In Analogie zur Syphilis wird die Lyme-Borreliose als eine stadienhaft verlaufende Erkrankung angesehen, bei der alle drei Stadien in verschiedenen zeitlichen Abständen auftreten können aber nicht notwendigerweise auftreten müssen. (80)

Bei den Manifestationen des ersten Stadiums stehen Hautveränderungen im Vordergrund. Sie treten erstmals wenige Tage nach Zeckenstich auf. Dazu zählen das Erythema migrans sowie die Lymphadenosis cutis benigna. (31,56,71)

Einige Wochen bis Monate später können ein oder mehrere Symptome des zweiten Krankheitsstadiums auftreten. Insbesondere neurologische Erstmanifestationen wie Meningitis, Meningoradikuloneuritis (Bannwarth-Syndrom), Enzephalitis oder Läsionen einzelner Hirnnerven werden beobachtet. Vielfach wurde auch der Befall anderer Organsysteme beschrieben. (31,56,71,80)

Das Stadium III tritt erst Monate, teilweise sogar Jahre später auf. Dazu gehören einerseits die chronischen Verlaufsformen der neurologischen und rheumatologischen Symptome des zweiten Stadiums, andererseits aber auch atrophische Hauterkrankungen, insbesondere die in Europa verbreitete Acrodermatitis chronica atrophicans. (31,56,71)

## **1.2.4 Hautmanifestationen**

Insbesondere in der Dermatologie sieht man sehr häufig Krankheitsbilder, die dem Frühstadium der Lyme-Borreliose zuzurechnen sind, also vor allem das Erythema migrans, seltener auch das Borrelienlymphozytom. Leider werden diese oft verkannt und falsch oder gar nicht therapiert. Richtige Diagnostik und Medikation führen dazu, dass Symptome des zweiten und dritten Krankheitsstadiums erst gar nicht entstehen. Es ist also insbesondere eine Aufgabe der Dermatologie, eine Lyme-Borreliose bereits nach dem Auftreten der ersten Symptome zu erkennen, adäquat zu behandeln und so weiteren Krankheitsverläufen entscheidend vorzubeugen. Daher sind im Folgenden die wichtigsten Hautmanifestationen etwas ausführlicher dargestellt:

### **1.2.4.1 Erythema migrans (EM)**

Es handelt sich hierbei um eine homogene oder ringförmige Hautläsion die sich zentrifugal ausbreitet und vom Erreger *Borrelia burgdorferi* verursacht wird. (78)

Es tritt im Mittel etwa zehn Tage nach einem Zeckenstich auf, an den sich allerdings viele Patienten nicht erinnern können. Prinzipiell kann ein EM am gesamten Integument lokalisiert sein, am häufigsten kommt es jedoch an den unteren Extremitäten vor. Begleitend können regionale Lymphknotenschwellungen und Allgemeinsymptome beobachtet werden. (58)

Die Erkrankungsdauer ist relativ variabel und kann von wenigen Tagen bis zu einem Jahr betragen. Im Durchschnitt heilt ein EM jedoch nach 10 Wochen aus. Ist ein Erythema migrans länger als sechs Monate vorhanden, so kann man nach Lipschütz (1913) von einem Erythema chronicum migrans (ECM) sprechen. (56,58,78)

In den meisten Fällen kann die Diagnose schon durch die typische Anamnese und das klinische Erscheinungsbild gestellt werden. Die klinische Diagnose kann durch ein positives serologisches Ergebnis gestützt, durch eine kulturelle Anzucht oder molekularbiologischen Nachweis der Borrelien gesichert werden. (78)

### **1.2.4.2 Borrelien-Lymphozytom (BL)**

Man rechnet das BL zu den Erstmanifestationen der Lyme-Borreliose, wobei es allerdings wesentlich seltener in Erscheinung tritt als das EM. Gelegentlich wird es aber auch

in der Frühphase des zweiten Stadiums oder als Begleitmanifestation einer Acrodermatitis chronica atrophicans im Stadium III beobachtet. (58)

Beim BL handelt es sich um eine benigne noduläre Hyperplasie von lymphatischem Gewebe, meist in gut durchblutetem Gewebe wie Ohrläppchen, Brustwarzen oder Skrotalhaut. Neben diesen Prädilektionsstellen kann das BL aber auch in anderen Bereichen der Cutis beobachtet werden. Tritt es zusammen mit einem EM auf, so findet es sich häufig im Zentrum der Läsion. (35,56,58)

#### **1.2.4.3 Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA)**

Da die ACA erst Monate oder Jahre post infectionem auftritt, wird sie der Spätphase zugerechnet, also dem dritten Stadium der Lyme-Borreliose. (58)

Der Krankheitsverlauf findet in zwei Phasen statt:

Nach anfänglicher Hautschwellung mit entzündlicher Rötung (entzündlich-infiltrative Phase) kommt es zu einer langsam fortschreitenden Hautatrophie bevorzugt an den Extremitätenstreckseiten oder über Gelenken, die schließlich zu einer zigarettenpapierartigen Verdünnung und Runzelung der Oberhaut mit begleitenden Teleangiektasien (atrophisches Endstadium) führt. Möglich ist auch die Bildung von Ulnar- oder Tibiastreifen, dermatosklerotischen Platten oder fibrotischen Knoten in Gelenknähe (juxtaartikuläre Knoten). Die Erkrankung schreitet von distal nach proximal fort und kann sogar auf die kontralateralen Extremitäten übergreifen. Begleitend kann es zu regionalen Lymphknotenschwellungen, peripheren Neuropathien mit Sensibilitätsstörungen, Myositiden, Arthralgien sowie zu atrophischen Knochenveränderungen kommen. (4,56,58)

#### **1.2.4.4 Sklerosierende Hautveränderungen**

Auch bei anderen atrophisch-sklerosierenden Dermatosen wird ein kausaler Zusammenhang mit *Borrelia burgdorferi* sensu lato vermutet. Studienergebnisse hierüber sind jedoch sehr widersprüchlich (58)

Erwähnenswert sind in diesem Zusammenhang insbesondere die zirkumskripte Sklerodermie (Morphäa) sowie der Lichen sclerosus et atrophicus. (58,59)

### 1.2.5 Weitere Krankheitsbilder

Die in Nordamerika häufigste und bedeutendste Form einer Sekundärmanifestation der Borreliose ist die Lyme-Arthritis. Meist bietet sich hierbei das Bild der Monarthritis an einem großen Gelenk, wobei am häufigsten das Knie betroffen ist. Die Diagnose wird mittels Serologie und Gelenkpunktat gestellt. Die Prognose ist bei rechtzeitiger Diagnosestellung und antibiotischer Therapie günstig. Übergänge in eine chronische Arthritis sind allerdings möglich. (26,32)

Eine weitere häufige Spätmanifestation ist der Symptomenkomplex der Neuroborreliose. Dazu gehören unter anderem Meningitiden, die Meningopolyneuritis Garin-Bujadoux-Bannwarth (Bannwarth-Syndrom), Ausfälle eines oder mehrerer Hirnnerven, Enzephalitiden aber auch vegetative Störungen, darunter die ohne adäquate Therapie chronisch progressiv verlaufende Borrelienenzephalomyelitis des dritten Krankheitsstadiums. (68) Die Diagnose wird je nach Symptomatik mittels Serologie, Liquorpunktion, elektrophysiologischen Untersuchungen oder Biopsie gestellt. Die Prognose ist im Stadium II als gut, bei chronischen Verlaufsformen allerdings als weniger günstig einzustufen. (80)

Daneben können noch eine Reihe weiterer Krankheitsmanifestationen auftreten: Uveitis, Chorioretinitis, Endo-Myo-Perikarditis, Störungen des Reiz-Leitungs-Systems am Herzen, Hepatitis, Nephritis, interstitielle Pneumonie u.a. Auch hier hängt die Prognose entscheidend von der möglichst raschen Diagnosestellung und Therapieeinleitung ab. (31)

### 1.2.6 Diagnostik

Die im klinischen Alltag am häufigsten verwendete Methode ist die Serologie. Dabei ist jedoch zu beachten, dass am Anfang der Erkrankung, also zum Zeitpunkt des Auftretens eines EM, nur in etwa der Hälfte der Fälle bereits Antikörper nachgewiesen werden können. Umgekehrt können beim Vorhandensein des Rheumafaktors oder nach EBV-Infektion falsch-positive IgM-Titer auftreten. Auch wurden Kreuzreaktionen mit verwandten Erregern wie *Treponema pallidum* beschrieben. (33)

Eine weitere Möglichkeit besteht im direkten Erregernachweis. Wie schon unter 1.1.4 beschrieben, werden die Borrelien aus Blut-, Liquor- oder Gewebematerial angezüchtet und unter dem Dunkelfeldmikroskop, selten auch mittels Lichtmikroskopie nach Giemsa-Färbung morphologisch identifiziert. Problematisch hierbei sind die schwierige Anzucht, die Anfälligkeit der Spirochäten für Störfaktoren wie Verunreinigungen des Nährmediums sowie

die lange Bebrütungsdauer bis zur Nachweisbarkeit von *Borrelia burgdorferi*. Daher hat sich diese Methode viel mehr in der Forschung als in der Routinediagnostik durchgesetzt. (83)

Zur Diagnosesicherung kann bei unklarem serologischem Befund eine Biopsie mit anschließender histologischer Begutachtung notwendig werden. Dies trifft insbesondere auf Krankheitsfälle in weiter fortgeschrittenen Stadien zu. (50)

### 1.2.7 Therapie

Bereits vor Entdeckung des Erregers wurden die Hautmanifestationen der Lyme-Borreliose mit verschiedenen Antibiotika (Penicillinen, Tetracyclinen, Erythromycin u.a.) behandelt, weil man eine bakterielle Ätiologie vermutete. (34, siehe auch 1.1.1)

Die Isolierung und Anzüchtung von *Borrelia burgdorferi* löste dann einen gewaltigen Boom in der weltweiten Borrelienforschung aus. Seitdem wurden zahlreiche *in vitro*- und *in vivo*-Experimente mit den verschiedensten antimikrobiellen Substanzen durchgeführt. Insbesondere die Arbeitsgruppen von Johnson und Preac-Mursic machten in den Jahren nach der Erregerentdeckung viele Sensibilitätstestungen von *Borrelia burgdorferi* auf die unterschiedlichsten antimikrobiellen Substanzen, sowohl *in vitro* als auch im Tierversuch und in klinischen Studien. (44-47,63,64,67)

Dabei stellte sich heraus dass Penicillin G entgegen den damaligen Erwartungen sowohl *in vitro* als auch in klinischen Tests nur ungenügend wirksam war. (46,64) Bessere *in vitro*-Ergebnisse wurden u.a. mit Amoxicillin, Ceftriaxon, Erythromycin oder verschiedenen Tetracyclinen erzielt. (46) Tierexperimentelle Untersuchungen (67) ergaben eine teils deutliche Überlegenheit von neuen Makroliden, insbesondere Azithromycin, gegenüber Erythromycin und auch einigen Penicillinen. Dies konnte sich dann allerdings in klinischen Studien nicht bestätigen. (15,16,43)

In einer weiteren Untersuchung von Preac-Mursic et al. (64) konnten aus Haut oder Liquor von sechs Patienten trotz mehrwöchiger Therapie mit Penicillin, Doxycyclin oder Ceftriaxon Monate später Borrelien isoliert werden.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Hunfeld et al. (39) und Ruzic-Sabljić et al. (69), die ebenfalls auch nach längerer Gabe von in der Borreliose-therapie gängigen Antibiotika noch lebende Spirochäten anzüchten konnten. Entgegen den Erwartungen hatte sich an der Antibiotikasensibilität der Erreger während der antimikrobiellen Therapie nichts geändert, so dass das Überleben von *Borrelia burgdorferi* im menschlichen Organismus nicht allein mit zunehmender Resistenzbildung erklärt werden kann. (39,77)

Heute wird im klinischen Alltag meist folgendermaßen vorgegangen: Im Frühstadium der Erkrankung sollten über zwei bis vier Wochen entweder 200mg Doxycyclin, 4x250mg Tetracyclin oder 3x500mg Amoxicillin täglich per os gegeben werden. Im zweiten und dritten Stadium werden ebenfalls über zwei bis vier Wochen 1x2g Ceftriaxon, alternativ auch 3x2g Cefotaxim oder 20 Millionen I.E. Penicillin G täglich intravenös verabreicht. (34,57,84)

Zur Beurteilung des Therapieerfolgs überprüft man nach abgeschlossener Behandlung mehrmals den Antikörpertiter. Da dieser aufgrund eines hohen Bakterienzerfalls während der Antibiotikagabe anfänglich sogar stark ansteigen kann, sollte sich der Zeitraum der Nachbeobachtung über mindestens ein Jahr erstrecken. (34)

Zur Prävention ist es empfehlenswert, bei Waldspaziergängen entsprechend schützende Kleidung zu tragen, Repellentien wie Bayrepel (z.B. Autan®) zu verwenden, den Kontakt zu Hunden und Katzen zu meiden und die Haut später nach Zecken abzusuchen. (57)

### **1.2.8 Prognose**

Im ersten Krankheitsstadium ist die Prognose relativ günstig. Ohne Therapie entwickeln nur etwa 15% aller Patienten Symptome des zweiten Stadiums, nach korrekter Antibiotikagabe heilt die frühe Lyme-Borreliose in nahezu 100% aller Fälle folgenlos aus. (16,31,56,71,76)

Da auch nach korrekter Therapie in zahlreichen Studien eine Erregerpersistenz nachgewiesen wurde, ist die Prognosestellung insbesondere bei Spätmanifestationen der Lyme-Borreliose jedoch ziemlich schwierig und von zahlreichen Faktoren abhängig. (15,16,43,64)

Grundsätzlich ist zu sagen, dass die Prognose durch die frühzeitige Diagnosestellung günstig beeinflusst werden kann.

### **1.3 Fragestellung**

Betrachtet man die Vielzahl von Publikationen über die Wirksamkeit verschiedenster Antibiotika gegen Enterobakterien oder auch Staphylokokken, so sind die Untersuchungen an *Borrelia burgdorferi* doch ziemlich dünn gesät. Insbesondere mögliche Unterschiede zwischen den einzelnen Genospezies wurden bisher nur selten in ausreichend großen Stichproben untersucht.



Dies ist vor allem deshalb verwunderlich, weil die Lyme-Borreliose weltweit in vielen Ländern, insbesondere auf der nördlichen Hemisphäre, endemisch ist. (70) Dazu kommt die Vielzahl an möglichen chronischen Folgeschäden, die durch eine inadäquate Therapie entstehen können. (31,56,71,80)

Auch zeigt die Widersprüchlichkeit der bisherigen Erkenntnisse, dass bis heute noch kein therapeutischer Königsweg der Lyme-Borreliose gefunden werden konnte. Dies mag auch darauf zurückzuführen sein, dass die Ergebnisse *in vitro* teilweise deutlich von den Resultaten der Tierversuche und klinischer Studien abweichen. (22) So erwiesen sich beispielsweise Ceftriaxon oder Azithromycin *in vivo* nicht wesentlich effektiver als Penicillin oder Doxycyclin, obwohl sie im Laborversuch eine deutlich niedrigere minimale Hemmkonzentration (MHK) aufweisen konnten. (15,16) Hinzu kommt, dass man pharmakokinetische Eigenschaften wie die Liquorgängigkeit beachten muss. So erweist sich Azithromycin als langlebig und sehr gut gewebeängig (21), kann jedoch so gut wie überhaupt nicht in den Liquor eindringen und ist somit für die Therapie einer Neuroborreliose nicht zu empfehlen. (43) Auch Schutzmechanismen der Borrelien gegenüber Umwelteinflüssen wie die Bildung von Zystenformen (10), sowie die hohe Mutationsrate (28) von *Borrelia burgdorferi* erschweren eine erfolgreiche antimikrobielle Therapie.

Vor diesem Hintergrund ist die Fragestellung nach einer optimalen Therapie sowohl hinsichtlich des Krankheitsstadiums als auch des Erregers von entscheidender Bedeutung, gerade auch deshalb weil die drei häufigsten Genospezies ein charakteristisches Verteilungsmuster im Hinblick sowohl auf ihre Verbreitungsgebiete als auch auf bestimmte Krankheitsbilder aufweisen. (14,56,76,82; siehe auch Kapitel 1.2.2)

Es stellt sich deshalb die Frage ob es je nach Erreger unterschiedliche Therapierichtlinien geben sollte. Hierüber existieren bislang nur wenige, teils widersprüchliche Studien. (6,24,37,42,63) Falls es deutliche Differenzen in der Antibiotikasensibilität der einzelnen Genospezies gibt, muss man folgerichtig auch darüber nachdenken, ob beispielsweise die Acrodermatitis chronica atrophicans anders behandelt werden muss als die Lyme-Arthritis, oder, global gedacht, ob man für Nordamerika und für Europa unterschiedliche Therapieempfehlungen geben sollte.

In der bislang gängigen klinischen Praxis richtet sich die Therapie ausschließlich nach dem jeweiligen Krankheitsstadium. (siehe Kapitel 1.2.7) Weder der geographische Aspekt noch die vorhandenen Krankheitsmanifestationen werden dabei berücksichtigt. Dies liegt wohl vor allem daran, dass man noch so gut wie keine Erkenntnisse darüber hat, ob die

verschiedenen Genospezies des Erregers der Lyme-Borreliose Unterschiede in ihrer Sensibilität auf die jeweils eingesetzten Antibiotika aufweisen.

Diese experimentelle Studie soll nun dazu beitragen zu klären, ob es zwischen den drei klinisch besonders wichtigen Subspezies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* und *Borrelia burgdorferi* sensu stricto signifikante Sensibilitätsunterschiede auf die vier häufig verwendeten antimikrobiellen Substanzen Azithromycin, Amoxicillin, Ceftriaxon und Doxycyclin gibt.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Isolate

Untersucht wurden insgesamt 24 Isolate der Spezies *Borrelia burgdorferi* sensu lato, wobei auf eine gleichmäßige Verteilung auf die drei humanpathogenen Genospezies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* und *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (jeweils n=8) geachtet wurde.

Ein Teil der Borrelien stammt von Patienten, die an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, behandelt wurden. Eine weitere Anzahl von Isolaten wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. med. A. Vogt, Universitätsklinikum Freiburg, zur Verfügung gestellt. Alle Isolate der beiden Genospezies *Borrelia afzelii* und *Borrelia garinii* sowie sieben von acht Isolaten der Subspezies *Borrelia burgdorferi* sensu stricto sind europäischen Ursprungs: Sie wurden entweder aus der Haut europäischer Patienten oder aus in Europa lebenden Schildzecken gewonnen. Lediglich „B31“ ist ein internationales Referenzisolat, das von Burgdorfer et al. aus dem Darm einer nordamerikanischen Schildzecke isoliert und anschließend kultiviert wurde und mittlerweile als Referenzstamm weltweit verbreitet ist. „PKO“ wurde im Max-von-Pettenkofer-Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München kultiviert und uns dankenswerterweise überlassen. Alle Isolate, ausgenommen „B31“ und „PKO“, waren sogenannte „low-passage-Isolate“, d.h. sie wurden bislang nicht öfter als zehnmal subkultiviert.

Die eigenen Isolate sind Ergebnis einer vorhergehenden Arbeit (81,82), die 1993 von Wienecke et al. an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt worden ist. Die dabei aus Hautbiopsien von ECM-Patienten gewonnenen, mittels PCR identifizierten, klassifizierten und anschließend tiefgefrorenen Isolate konnten nach Auftauen bei Raumtemperatur zum Großteil in BSK-H-Nährmedium bei einer Inkubationstemperatur von 33°C neu angezchtet und subkultiviert werden.

## 2.2 Antibiotika

Um ein möglichst breites Spektrum der heute in der Behandlung der Lyme-Borreliose üblichen Antibiotika (34,57) abzudecken, wurden Substanzen aus vier verschiedenen Stoffklassen gewählt: Das Makrolid Azithromycin wurde uns freundlicherweise von der Firma Pfizer (New York, Vereinigte Staaten von Amerika) zur Verfügung gestellt. Für die Bereitstellung des Breitspektrum-Penicillins Amoxicillin, des Cephalosporins Ceftriaxon und des Tetracyclins Doxycyclin bedanken wir uns bei der Firma Sigma (München, Deutschland).

Die wichtigsten pharmakologischen Kenndaten gemäß Herstellerangaben sind in Tabelle 1 zusammengefasst:

Antibiotikum	Azithromycin	Amoxicillin	Ceftriaxon	Doxycyclin
Substanzklasse	Makrolid	Penicillin	Cephalosporin	Tetracyclin
Wirkungsweise	bakteriostatisch	bakterizid	bakterizid	bakteriostatisch
Angriffspunkt	Proteinsynthese	Zellwandsynthese	Zellwandsynthese	Proteinsynthese
Verabreichung	oral, i.v.	oral, i.m., i.v.	i.v., i.m.	oral, i.v.
Bioverfügbarkeit (%)	37	72 - 94	100	90
c max (mg/l)	0,4 - 0,45	9 - 14	123,2	3 - 5,3
T max (h)	2,5 - 2,6	1	nach Injektion	1 - 2
t 1/2 (h)	14 - 48	1	6 - 8	16
Elimination	vorw. hepatisch	vorw. renal	vorw. renal	vorw. intestinal
Gewebeaffinität	sehr gut	gut	gut	gut
Liquorgängigkeit	schlecht	mäßig	gut	schlecht

Tabelle 1: Pharmakologische Kenndaten der verwendeten Antibiotika.

Hierbei ist die Bioverfügbarkeit derjenige Anteil des Antibiotikums, der nach Verabreichung per os resorbiert wird und in die Blutbahn gelangt. Im Fall von Ceftriaxon, das ausschließlich parenteral verabreicht wird, ist die Verfügbarkeit logischerweise 100 Prozent.

c max gibt die maximale Serumkonzentration wieder, die jeweils zu einer bestimmten Zeit T max nach Gabe einer therapeutischen Standarddosis erreicht wird. Im Fall von Azithromycin und Amoxicillin war diese Dosis 500 mg, bei Ceftriaxon 1 g und bei Doxycyclin 200 mg. t 1/2 ist die Halbwertszeit in der Eliminationsphase, also die Zeit, nach der die Hälfte der Substanz metabolisiert oder unverändert ausgeschieden worden ist.

## 2.3 Nährmedium

Verwendet wurde ein bereits industriell vorgefertigtes BSK-H-Medium der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland), das nachträglich mit 6% Kaninchenserum versetzt wurde. Bestandteile und Mengenangaben können der entsprechenden Literatur entnommen werden. (61)

## 2.4 Herstellung der Verdünnungsreihen

Die Werte für die Verdünnungsreihen wurden so gewählt, dass sie zu erwartenden Ergebnissen im Hinblick auf frühere Untersuchungen entsprechen.

(3,6,17,37,38,42,45,47,52,62,63,67) Dies waren für Amoxicillin, Azithromycin und Ceftriaxon Konzentrationen in einem Bereich von 0,002 µg/ml – 0,5 µg/ml. Für Doxycyclin waren höhere Konzentrationen von 0,125 µg/ml – 16 µg/ml sinnvoll. Wie bei Verdünnungsreihen üblich, stiegen die Konzentrationen von Stufe zu Stufe jeweils um das Doppelte des Ausgangswertes an, also

0,002 – 0,004 – 0,008 – 0,015 – 0,03 – 0,06 – 0,125 – 0,25 – 0,5 µg/ml

für die ersten drei Antibiotika und

0,06 – 0,125 – 0,25 – 0,5 – 1 – 2 – 4 – 8 – 16 µg/ml

für Doxycyclin.

Alle vier Antibiotika wurden in Form eines Pulvers geliefert. Dabei mußte beachtet werden, dass nur das Ceftriaxonpräparat 100% Wirkstoff enthielt. Laut Herstellerangaben war der Wirkstoffgehalt bei Amoxicillin 87,1%, bei Azithromycin 94,5% und bei Doxycyclin 98,17%. Die Herstellung der Verdünnungsreihen erfolgte für jedes Antibiotikum getrennt:

Amoxicillin: 11,5 mg (entspricht 10 mg Wirkstoff) wurden in 10 ml Wasser gelöst. Daraus resultierte eine Konzentration von 1 mg/ml. Aus dieser Suspension wurden 0,1 ml in 0,9 ml BSK-H-Medium pipettiert, was zu einer Verdünnung auf 100 µg/ml führte. Dazu wurde ein weiterer Milliliter Medium gegeben, um auf 50 µg/ml zu kommen. Davon wurde die Hälfte der Menge, also 1 ml zu einem weiteren ml BSK-H gegeben woraus eine Konzentration von 25 µg/ml resultierte. Diese Verdünnungen auf die Hälfte der jeweils vorherigen Konzentration wurden solange fortgesetzt bis ein Wert von 0,2 µg/ml erreicht war. Diese neun Stufen von 50 µg/ml bis 0,2 µg/ml wurden anschließend jeweils auf ein Hundertstel verdünnt, indem je 0,5 ml zu 49,5 ml BSK-H-Medium gegeben wurden. Die

daraus resultierenden Konzentrationen entsprechen oben genannter Verdünnungsreihe.

Azithromycin: Es wurden 10,6 mg (entspricht 10 mg Wirkstoff) in 10 ml 96%igem Ethanolalkohol gelöst. Die weitere Vorgehensweise ist analog zu Amoxicillin.

Ceftriaxon: 10 mg wurden zu 10 ml Wasser gegeben. Auch hier wurde so verfahren wie bei den oben beschriebenen Substanzen.

Doxycyclin: 32,5 mg des Pulvers (32 mg Wirkstoff) wurden in 10 ml Wasser gelöst was zu einer Konzentration von 3200 µg/ml führte. Diese wurde auf 1600 µg/ml halbiert, indem 1 ml der Lösung zu 1 ml BSK-H pipettiert wurde. Die Verdünnungsreihe wurde erstellt, indem die Konzentrationen analog zu oben beschriebener Verfahrensweise schrittweise bis zu einem Wert von 0,6 µg/ml halbiert wurden. Danach wurden die einzelnen Lösungen wie bei den anderen Antibiotika auf ein Hundertstel ihrer Ausgangskonzentration verdünnt, was zur oben dargestellten Verdünnungsreihe für Doxycyclin führt.

## 2.5 Mikroskopie

Die heutige Standardmethode für den Direktnachweis von *Borrelia burgdorferi* ist die Dunkelfeldmikroskopie. Der Vorteil gegenüber der gewöhnlichen Auflichtmikroskopie liegt darin, dass keine Fixierung oder Färbung des zu untersuchenden Materials notwendig ist. Da Borrelien sehr empfindlich auf äußere Einflüsse reagieren, könnte das zu numerischen oder morphologischen Veränderungen führen. (83)

Um die Konzentration der Spirochäten in einer bestimmten Menge BSK-H-Medium zu bestimmen, wurde ihre Anzahl in zehn verschiedenen Blickfeldern ermittelt und daraus ein Durchschnittswert errechnet. Dieser wurde in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Borrelienzahl pro ml} = \frac{\text{Anzahl der Zellen pro Blickfeld} \times \text{Deckglasgröße}}{\text{Blickfeldgröße} \times \text{Mediummenge pro Deckglas}}$$

Dabei betrug die Deckglasgröße 400 mm<sup>2</sup>, ein Blickfeld hatte laut Herstellerangaben eine Größe von 0,159 mm<sup>2</sup> und die Menge an BSK-H-Medium die auf den Objektträger pipettiert wurde, betrug bei jeder Untersuchung 5 µl.

Da drei der vier Größen in der oben beschriebenen Formel konstant sind, kann sie noch weiter vereinfacht werden:

**Borrelienzahl pro ml = Anzahl der Zellen pro Blickfeld x 503144,65**

Es besteht also eine direkt proportionale Beziehung zwischen der Borrelienkonzentration im Reagenzglas und den im Mittel gezählten Bakterien pro Blickfeld des Mikroskops. Der Proportionalitätsfaktor  $k$  ist hierbei 503144,65.

## **2.6 Bestimmung von MHK und MBK**

### **2.6.1 Definitionen**

Die MHK (= minimale Hemmkonzentration) ist definiert als die niedrigste Konzentration einer antimikrobiellen Substanz, ab der keine Bakterienvermehrung mehr beobachtet werden kann.

Unter der MBK (= minimal bakterizide Konzentration) versteht man die geringste Konzentration einer antimikrobiellen Substanz die man benötigt, um alle Erreger langfristig abzutöten.

### **2.6.2 Bestimmung der MHK**

Zur Bestimmung der MHK wurden jeweils 2,5 ml der vorbereiteten Verdünnungsstufen (siehe 2.4) in kleinere Reagenzgläser umgefüllt und mit borrelienhaltigem BSK-H-Medium versetzt. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde jeweils soviel Medium gewählt, daß die Ausgangskonzentration überall annähernd  $10^5$  Zellen / ml betrug.

Dies wurde für jedes der vier Antibiotika in Kombination mit jedem der 24 Isolate im Dreifachtest durchgeführt. Es ergab sich daraus eine Anzahl von 288 Versuchsreihen. Als Kontrolle wurde jeweils ein Reagenzglas mit antibiotikafreiem Medium verwendet.

In den meisten Fällen stimmten die Ergebnisse der jeweils drei Versuchsreihen überein. Andernfalls wurde diejenige niedrigste Konzentration als minimale Hemmkonzentration definiert, bei der in keiner der drei Testungen bakterielles Wachstum festgestellt werden konnte.

Folgerichtig ergab sich für jedes Isolat in Kombination mit jedem getesteten Antibiotikum ein eindeutiger MHK-Wert, also insgesamt 96 Werte. Diese verteilten sich

gleichmäßig auf die drei Subtypen *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* und *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, da sie jeweils mit acht Isolaten vertreten waren.

Sämtliche Testreihen wurden für 72 Stunden bei einer Temperatur von 33°C in einem Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden aus jedem einzelnen Teströhrchen 5µl Medium auf einen Objektträger pipettiert und im Dunkelfeldmikroskop betrachtet. Die Bakterienkonzentration wurde mit Hilfe oben beschriebener Formel bestimmt. (siehe 2.5) Dabei war die MHK diejenige Konzentration, bei der sich die Ausgangskonzentration von 10<sup>5</sup> Borrelien / ml nicht erhöht hatte.

### **2.6.3 Bestimmung der MBK**

Da die MBK logischerweise nicht niedriger sein kann als die MHK, wurden im Anschluss nur aus allen Röhrchen, die Antibiotika einer Konzentration oberhalb oder gleich der MHK enthielten, jeweils 50 µl Medium pipettiert und zu 2,5 ml antibiotikafreiem BSK-H gegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen bei 33°C wurden die Testreihen erneut unter dem Dunkelfeldmikroskop untersucht. Die minimal bakterizide Konzentration war dabei die niedrigste Konzentration bei der keine vitalen Spirochäten mehr entdeckt werden konnten.

## **2.7 Statistik**

Die statistische Datenauswertung erfolgte in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Aus oben beschriebenen Dreifachtestungen wurde jeweils ein Mittelwert gebildet, so dass für jedes Isolat in Kombination mit jedem Antibiotikum ein Wert existiert, und zwar jeweils für die MHK- als auch für die MBK-Testungen. Eine Testreihe ergibt sich also aus den jeweils acht MHK- bzw. MBK-Werten der acht Isolate einer Genospezies in Kombination mit jeweils einem der vier Antibiotika.

Mit Hilfe der Statistikfunktion des Datenverarbeitungsprogramms Microsoft Excel® 2000 wurden für jede Datenreihe der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Mit diesen Daten wurde jeweils das 95%ige Konfidenzintervall ( $\alpha = 0,05$ ) bestimmt und graphisch dargestellt (Grafiken 9-16).



Überlappen sich die Konfidenzintervalle zweier Messreihen, so gibt es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen ihnen. Überlappen sie sich nicht, so kann man von einem Unterschied mit dem Signifikanzniveau  $\alpha \leq 0,05$  sprechen.

Zur Absicherung der statistischen Analyse wurde zusätzlich für sämtliche Testreihen der Rangsummentest nach Wilcoxon durchgeführt, der sich insbesondere für Stichproben mit kleinen Fallzahlen eignet. Dabei wurde das Statistikprogramm SPSS® for Windows, Version 11.0, verwendet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Minimale Hemmkonzentrationen (MHK)

Alle MHK-Werte von 24 Isolaten in Kombination mit vier Antibiotika sind in Tabelle 2 zusammengefasst:

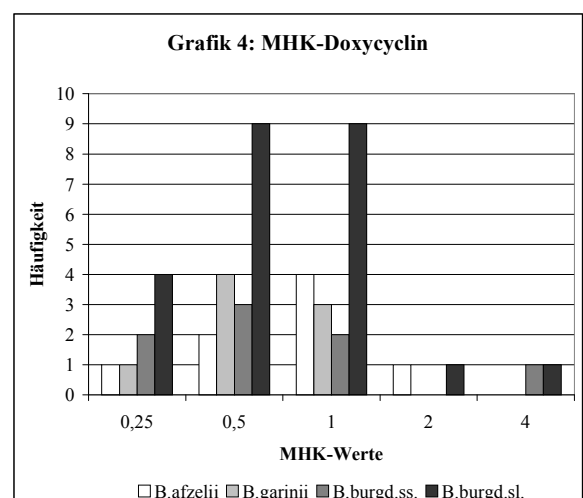
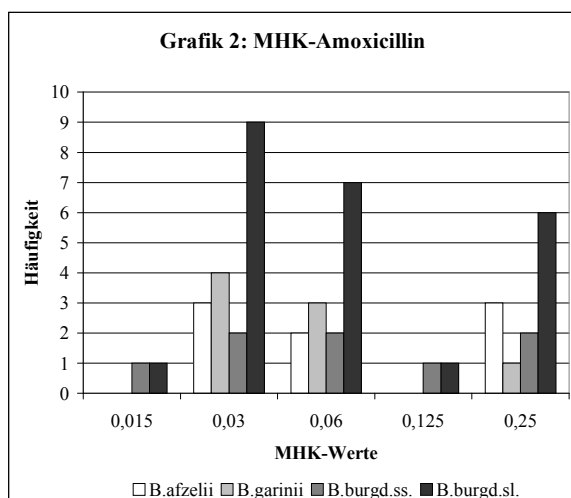
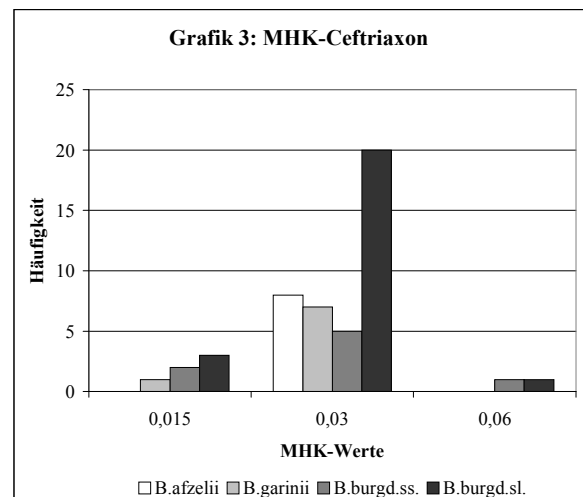
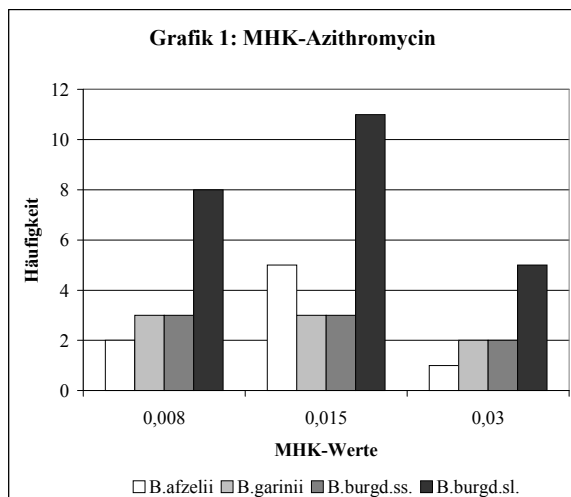
<i>Genospezies</i>	<i>Isolat</i>	<i>Azithromycin</i>	<i>Amoxicillin</i>	<i>Ceftriaxon</i>	<i>Doxycyclin</i>
<i>B. afzelii</i>	A-1	0.015	0.06	0.03	1
<i>B. afzelii</i>	A-2	0.008	0.03	0.03	0.5
<i>B. afzelii</i>	A-3	0.015	0.25	0.03	0.25
<i>B. afzelii</i>	A-4 (=PKO)	0.008	0.25	0.03	0.5
<i>B. afzelii</i>	A-5	0.015	0.03	0.03	1
<i>B. afzelii</i>	A-6	0.015	0.03	0.03	1
<i>B. afzelii</i>	A-7	0.03	0.06	0.03	1
<i>B. afzelii</i>	A-8	0.015	0.25	0.03	2
<i>B. garinii</i>	G-1	0.015	0.03	0.015	0.25
<i>B. garinii</i>	G-2	0.008	0.25	0.03	1
<i>B. garinii</i>	G-3	0.008	0.06	0.03	0.5
<i>B. garinii</i>	G-4	0.03	0.03	0.03	0.5
<i>B. garinii</i>	G-5	0.008	0.03	0.03	0.5
<i>B. garinii</i>	G-6	0.015	0.06	0.03	0.5
<i>B. garinii</i>	G-7	0.015	0.06	0.03	1
<i>B. garinii</i>	G-8	0.03	0.03	0.03	1
<i>B. burgd. ss.</i>	S-1 (=B31)	0.03	0.06	0.03	0.5
<i>B. burgd. ss.</i>	S-2	0.015	0.25	0.03	1
<i>B. burgd. ss.</i>	S-3	0.03	0.03	0.015	0.25
<i>B. burgd. ss.</i>	S-4	0.008	0.03	0.015	0.5
<i>B. burgd. ss.</i>	S-5	0.008	0.125	0.03	4
<i>B. burgd. ss.</i>	S-6	0.015	0.015	0.03	1
<i>B. burgd. ss.</i>	S-7	0.008	0.06	0.03	0.5
<i>B. burgd. ss.</i>	S-8	0.015	0.25	0.06	0.25

Tabelle 2: Minimale Hemmkonzentrationen (MHK) der vier Antibiotika Azithromycin, Amoxicillin, Ceftriaxon und Doxycyclin bei Anwendung gegen die drei Genospezies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* und *Borrelia burgdorferi* sensu stricto nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden bei einer Temperatur von 33°C.

Unterschiede zwischen den drei getesteten Genospezies innerhalb eines Antibiotikums waren aus der Tabelle nicht ersichtlich.

Zur besseren Veranschaulichung der Ergebnisse wurden die Häufigkeitsverteilungen der jeweiligen MHK-Werte graphisch dargestellt. Sie ermöglichen eine Aussage darüber, wie oft ein bestimmter Wert in einer bestimmten Versuchsreihe vorgekommen ist. Dies wurde jeweils getrennt nach Antibiotika und Genospezies durchgeführt.

In den Grafiken 1-4 sind die Häufigkeitsverteilungen als Balkendiagramme dargestellt. Die Höhe eines Balkens wird durch die Häufigkeit eines Werts bestimmt. Kam also die Konzentration 0,03 µg/ml bei einer Messreihe doppelt so häufig vor wie 0,015 µg/ml, dann ist der Balken dementsprechend doppelt so hoch.



Grafiken 1-4: Häufigkeitsverteilungen der MHK-Werte von vier Antibiotika bei Anwendung gegen die drei Genospezies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* und *Borrelia burgdorferi* sensu stricto.

Vergleicht man die Messreihen für *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* und *Borrelia burgdorferi* sensu stricto untereinander, so lassen sich bei den MHK-Werten keine auffälligen Unterschiede im Verteilungsmuster feststellen.

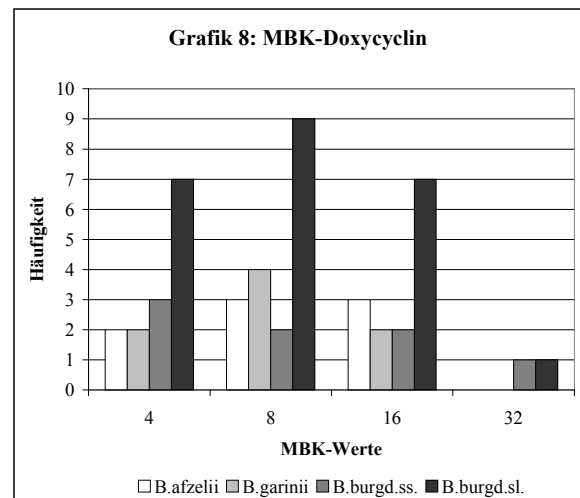
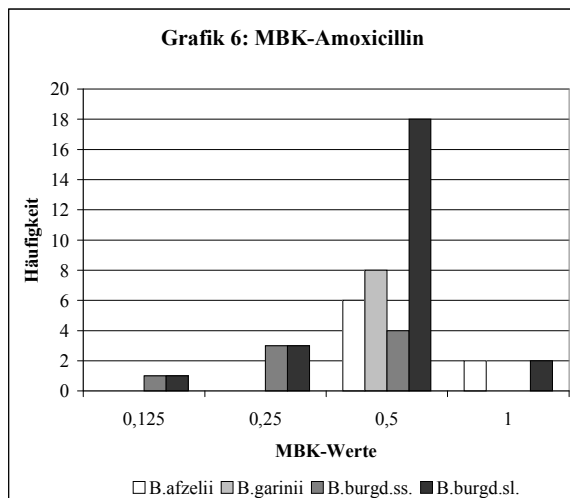
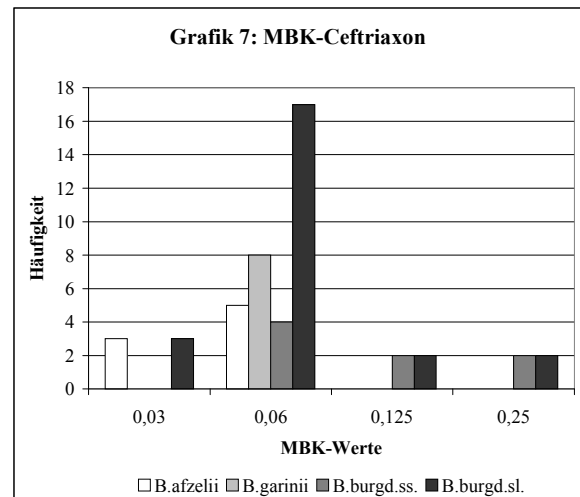
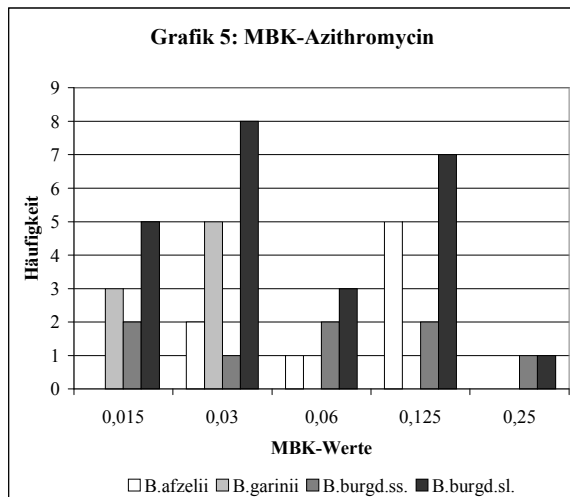
### 3.2 Minimal bakterizide Konzentrationen (MBK)

Auch hier ergaben sich insgesamt 96 Werte, für jede Genospezies-Antibiotika-Kombination einer. Die Resultate finden sich in Tabelle 3:

Genospezies	Isolat	Azithromycin	Amoxicillin	Ceftriaxon	Doxycyclin
<i>B. afzelii</i>	A-1	0.125	0.5	0.06	16
<i>B. afzelii</i>	A-2	0.06	0.5	0.03	8
<i>B. afzelii</i>	A-3	0.03	0.5	0.03	4
<i>B. afzelii</i>	A-4 (=PKO)	0.125	1	0.06	8
<i>B. afzelii</i>	A-5	0.03	0.5	0.03	4
<i>B. afzelii</i>	A-6	0.125	0.5	0.06	16
<i>B. afzelii</i>	A-7	0.125	0.5	0.06	8
<i>B. afzelii</i>	A-8	0.125	1	0.06	16
<i>B. garinii</i>	G-1	0.03	0.5	0.06	16
<i>B. garinii</i>	G-2	0.015	0.5	0.06	8
<i>B. garinii</i>	G-3	0.015	0.5	0.06	4
<i>B. garinii</i>	G-4	0.03	0.5	0.06	16
<i>B. garinii</i>	G-5	0.015	0.5	0.06	8
<i>B. garinii</i>	G-6	0.03	0.5	0.06	4
<i>B. garinii</i>	G-7	0.03	0.5	0.06	8
<i>B. garinii</i>	G-8	0.03	0.5	0.06	8
<i>B. burgd. ss.</i>	S-1 (=B31)	0.25	0.125	0.06	8
<i>B. burgd. ss.</i>	S-2	0.03	0.25	0.25	16
<i>B. burgd. ss.</i>	S-3	0.125	0.5	0.06	4
<i>B. burgd. ss.</i>	S-4	0.06	0.5	0.125	4
<i>B. burgd. ss.</i>	S-5	0.015	0.25	0.125	32
<i>B. burgd. ss.</i>	S-6	0.015	0.25	0.06	16
<i>B. burgd. ss.</i>	S-7	0.125	0.5	0.06	8
<i>B. burgd. ss.</i>	S-8	0.06	0.5	0.25	4

Tabelle 3: Minimal bakterizide Konzentrationen (MBK) der vier Antibiotika Azithromycin, Amoxicillin, Ceftriaxon und Doxycyclin bei Anwendung gegen die drei Genospezies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* und *Borrelia burgdorferi* sensu stricto nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen bei einer Temperatur von 33°C.

Um festzustellen ob die einzelnen Antibiotika jeweils unterschiedlich starke Effekte auf die einzelnen Subspezies haben, ist es sinnvoll, die Häufigkeitsverteilungen wie schon bei den MHK-Bestimmungen graphisch darzustellen. Sie sind in den Grafiken 5-8 wiedergegeben:



Grafiken 5-8: Häufigkeitsverteilungen der MBK-Werte von vier Antibiotika bei Anwendung gegen die drei Genospezies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* und *Borrelia burgdorferi sensu stricto*.

Grafik 5 stellt die Wirksamkeit von Azithromycin dar. Es fällt auf, dass bei *Borrelia garinii* alle Werte in den unteren Bereichen von 0,015 und 0,03 µg/ml liegen, während die Mehrzahl der *Borrelia afzelii*-Isolate erst bei 0,125 µg/ml wirkungsvoll abgetötet sind. *Borrelia burgdorferi sensu stricto* dagegen ist relativ gleichmäßig über das ganze Konzentrationsspektrum verteilt.

In Grafik 6 sind die minimal bakteriziden Konzentrationen von Amoxicillin wiedergegeben. Während alle acht Isolate von *Borrelia garinii* bei einem Wert im mittleren Bereich des Spektrums liegen, streuen die Ergebnisse bei *Borrelia burgdorferi sensu stricto* eher nach unten, bei *Borrelia afzelii* eher nach oben. 18 (75%) der Borrelienisolat werden bei einer Amoxicillinkonzentration von 0,5 µg/ml abgetötet.

Auch in Grafik 7, die die MBK von Ceftriaxon darstellt, ist die Streubreite gering: 17 der 24 Isolate insgesamt liegen bei einer bakteriziden Konzentration von 0,06 µg/ml. Diesmal ist es interessanterweise *Borrelia afzelii*, das mit mehreren Isolaten nach unten abweicht, während ein Teil der *Borrelia burgdorferi sensu stricto*-Isolate höhere Konzentrationen benötigt. Wie schon bei Amoxicillin liegen alle acht Messwerte von *Borrelia garinii* genau beim Mittelwert.

Grafik 8 zeigt die MBK-Werte von Doxycyclin. Hier sind, anders als bei den Grafiken 5-7, keine auffälligen Unterschiede der drei Genospezies zu erkennen.

### 3.3 Statistische Analyse

Um all diese Ergebnisse werten zu können und einen sinnvollen Vergleich mit den Resultaten anderer Arbeiten auf diesem Gebiet zu bekommen, müssen die Daten einer statistischen Analyse unterzogen werden.

Alle verwendeten statistischen Größen wurden bereits in Kapitel 2.7 erläutert. Sie wurden für jede Datenreihe separat ermittelt, wobei eine Datenreihe jeweils der Kombination aus einem Antibiotikum und einer Genospezies entspricht. Die Anzahl der Stichproben  $n$  pro Datenreihe ist jeweils acht und ist identisch mit den acht getesteten Isolaten pro Genospezies. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in den Tabellen 4 und 5 aufgeführt. Es wurde für jede Reihe ein 95%iges Konfidenzintervall ermittelt, um eine anschauliche Vergleichsmöglichkeit zu haben. Diese Intervalle sind in den Grafiken 11 bis 16 dargestellt.

Liegen die gemessenen Werte eng beieinander, so wird das Intervall sehr klein. Im Idealfall werden alle acht Isolate einer Genospezies bei der gleichen Konzentration eines Antibiotikums gehemmt bzw. abgetötet. Alle acht Stichproben der Messreihe haben dann denselben Wert und das Konfidenzintervall wird zu einem Punkt. Ein Beispiel hierfür ist die MHK von Ceftriaxon gegen *Borrelia afzelii* in Grafik 11.

<i>Genospezies</i>	<i>statistische Größe</i>	<i>Azithromycin</i>	<i>Amoxicillin</i>	<i>Ceftriaxon</i>	<i>Doxycyclin</i>
<i>B.afzelii</i>	Median	0,015	0,06	0,03	1
	Mittelwert	0,015125	0,12	0,03	0,90625
	Standardabweichung	0,006352903	0,101365675	0	0,499022482
	Konfidenz	0,004402254	0,070241495	0	0,345798372
	<b>untere Intervallgrenze</b>	<b>0,010722746</b>	<b>0,049758505</b>	<b>0,03</b>	<b>0,560451628</b>
	<b>obere Intervallgrenze</b>	<b>0,019527254</b>	<b>0,190241495</b>	<b>0,03</b>	<b>1,252048372</b>
<i>B.garinii</i>	Median	0,015	0,06	0,03	0,5
	Mittelwert	0,016125	0,06875	0,028125	0,65625
	Standardabweichung	0,008565009	0,069899481	0,004960784	0,277756076
	Konfidenz	0,005935136	0,04843695	0,003437582	0,192471486
	<b>untere Intervallgrenze</b>	<b>0,010189864</b>	<b>0,02031305</b>	<b>0,024687418</b>	<b>0,463778514</b>
	<b>obere Intervallgrenze</b>	<b>0,022060136</b>	<b>0,11718695</b>	<b>0,031562582</b>	<b>0,848721486</b>
<i>B.burgd.ss.</i>	Median	0,015	0,06	0,03	0,5
	Mittelwert	0,016125	0,1025	0,03	1
	Standardabweichung	0,008565009	0,090691786	0,012990381	1,165922382
	Konfidenz	0,005935136	0,062845008	0,009001704	0,80792765
	<b>untere Intervallgrenze</b>	<b>0,010189864</b>	<b>0,039654992</b>	<b>0,020998296</b>	<b>0,19207235</b>
	<b>obere Intervallgrenze</b>	<b>0,022060136</b>	<b>0,165345008</b>	<b>0,039001704</b>	<b>1,80792765</b>
<i>B.burgd.sl.</i>	Median	0,015	0,06	0,03	0,5
	Mittelwert	0,015791667	0,097083333	0,029375	0,854166667
	Standardabweichung	0,007910853	0,090817086	0,00807678	0,763478425
	Konfidenz	0,00316494	0,036333712	0,003231324	0,305449187
	<b>untere Intervallgrenze</b>	<b>0,012626726</b>	<b>0,060749622</b>	<b>0,026143676</b>	<b>0,548717479</b>
	<b>obere Intervallgrenze</b>	<b>0,018956607</b>	<b>0,133417045</b>	<b>0,032606324</b>	<b>1,159615854</b>

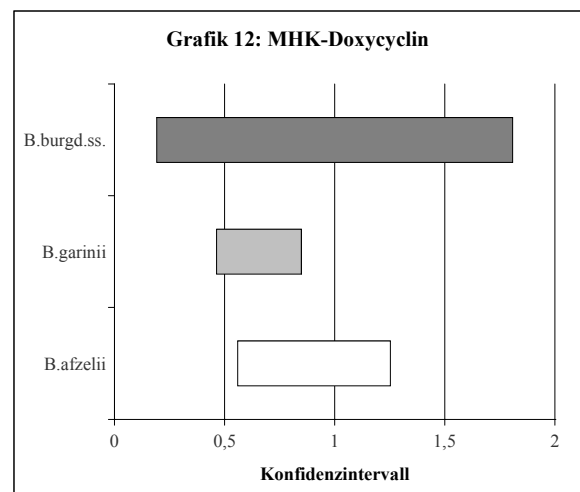
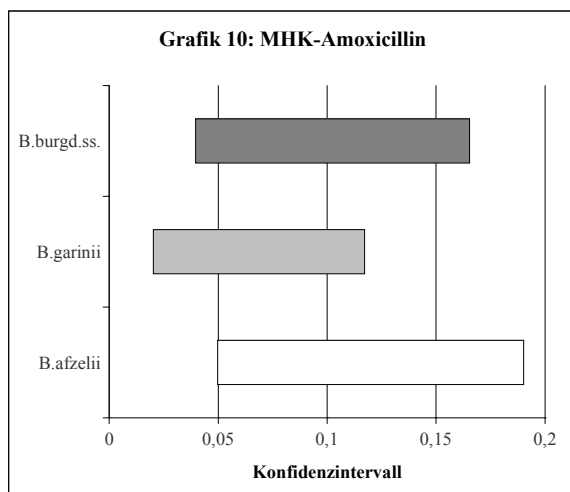
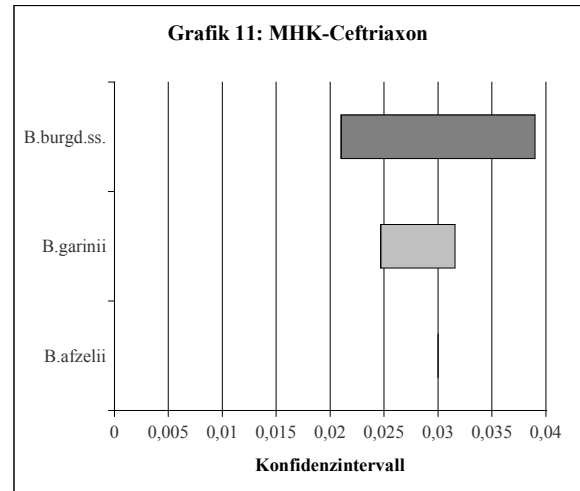
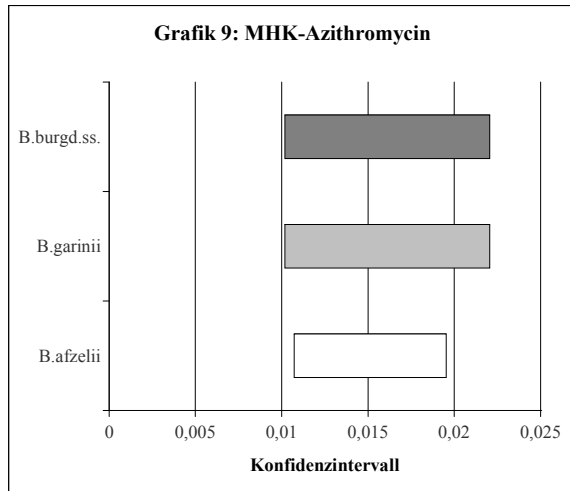
Tabelle 4: Statistische Analyse der MHK-Werte der vier Antibiotika Azithromycin, Amoxicillin, Ceftriaxon und Doxycyclin bei Anwendung gegen die drei Genospezies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* und *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (Anzahl der Stichproben je Testreihe n = 8; Signifikanzniveau  $\alpha \leq 0,05$ ).

Umgekehrt nimmt ein Konfidenzintervall dann einen großen Wert an, wenn die Streubreite der einzelnen Stichproben sehr hoch ist wie beispielsweise in Grafik 16 bei der MBK von Doxycyclin gegen *Borrelia burgdorferi* sensu stricto.

Zwei Testreihen unterscheiden sich dann mit statistischer Signifikanz voneinander, wenn sich ihre Konfidenzintervalle nicht überlappen. Dies ist umso wahrscheinlicher, je kleiner die Intervalle und je unterschiedlicher die Werte zweier Messreihen im Mittel sind.

Zusätzlich zu diesem Verfahren wurde für alle Testreihen der Wilcoxon-Rangsummentest durchgeführt, der die unten aufgeführten statistisch signifikanten Unterschiede bestätigte.

Verglichen wurden jeweils die drei Konfidenzintervalle der getesteten Genospezies, getrennt nach Antibiotika und MHK (Grafiken 9 – 12) bzw. MBK (Grafiken 13 – 16):



Grafiken 9-12: 95%ige Konfidenzintervalle der MHK-Werte von vier Antibiotika bei Anwendung gegen die drei Genospezies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* und *Borrelia burgdorferi* sensu stricto.

Bei den MHK-Testungen überlappen sich die drei zu vergleichenden Intervalle bei jedem getesteten Antibiotikum. Es gibt also weder für Azithromycin, Amoxicillin, Ceftriaxon noch für Doxycyclin statistisch signifikante Unterschiede bei Anwendung gegen die drei häufigsten Genospezies von *Borrelia burgdorferi*. Dies bestätigt die Beobachtungen bei den Häufigkeitsverteilungen (Grafiken 1 – 4), die keine bemerkenswerten Unterschiede erkennen ließen.



<i>Genospezies</i>	<i>statistische Größe</i>	<i>Azithromycin</i>	<i>Amoxicillin</i>	<i>Ceftriaxon</i>	<i>Doxycyclin</i>
<i>B.afzelii</i>	Median	0,125	0,5	0,06	8
	Mittelwert	0,093125	0,625	0,04875	10
	Standardabweichung	0,042051865	0,216506351	0,014523688	4,898979486
	Konfidenz	0,029139903	0,150028398	0,010064211	3,394755129
	<b>untere Intervallgrenze</b>	<b>0,063985097</b>	<b>0,474971602</b>	<b>0,038685789</b>	<b>6,605244871</b>
	<b>obere Intervallgrenze</b>	<b>0,122264903</b>	<b>0,775028398</b>	<b>0,058814211</b>	<b>13,39475513</b>
<i>B.garinii</i>	Median	0,03	0,5	0,06	8
	Mittelwert	0,024375	0,5	0,06	9
	Standardabweichung	0,007261844	0	0	4,358898944
	Konfidenz	0,005032105	0	0	3,020505513
	<b>untere Intervallgrenze</b>	<b>0,019342895</b>	<b>0,5</b>	<b>0,06</b>	<b>5,979494487</b>
	<b>obere Intervallgrenze</b>	<b>0,029407105</b>	<b>0,5</b>	<b>0,06</b>	<b>12,02050551</b>
<i>B.burgd.ss.</i>	Median	0,06	0,375	0,0925	8
	Mittelwert	0,085	0,359375	0,12375	11,5
	Standardabweichung	0,074582169	0,145740298	0,077570532	9,04157066
	Konfidenz	0,051681825	0,100990956	0,053752616	6,265369851
	<b>untere Intervallgrenze</b>	<b>0,033318175</b>	<b>0,258384044</b>	<b>0,069997384</b>	<b>5,234630149</b>
	<b>obere Intervallgrenze</b>	<b>0,136681825</b>	<b>0,460365956</b>	<b>0,177502616</b>	<b>17,76536985</b>
<i>B.burgd.sl.</i>	Median	0,03	0,5	0,06	8
	Mittelwert	0,0675	0,494791667	0,0775	10,16666667
	Standardabweichung	0,058327381	0,185682744	0,056273143	6,529846008
	Konfidenz	0,023335369	0,074287159	0,022513519	2,6124329
	<b>untere Intervallgrenze</b>	<b>0,044164631</b>	<b>0,420504507</b>	<b>0,054986481</b>	<b>7,554233767</b>
	<b>obere Intervallgrenze</b>	<b>0,090835369</b>	<b>0,569078826</b>	<b>0,100013519</b>	<b>12,77909957</b>

Tabelle 5: Statistische Analyse der MBK-Werte der vier Antibiotika Azithromycin, Amoxicillin, Ceftriaxon und Doxycyclin bei Anwendung gegen die drei Genospezies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* und *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (Anzahl der Stichproben je Testreihe n = 8; Signifikanzniveau  $\alpha \leq 0,05$ ).

Anders verhält es sich jedoch bei den minimal bakteriziden Konzentrationen:

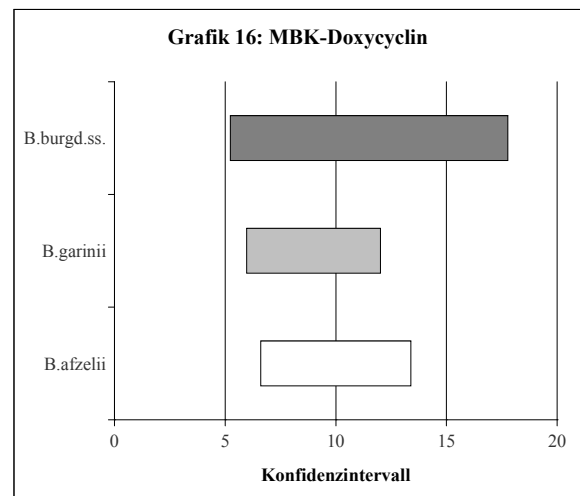
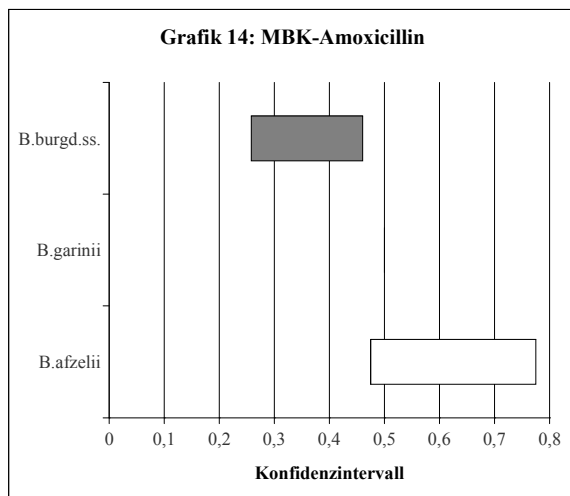
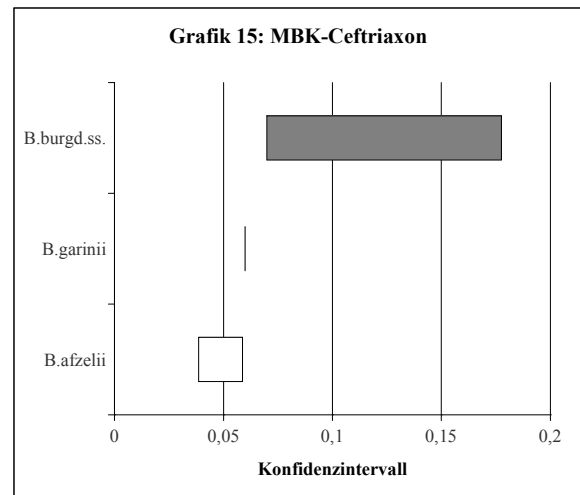
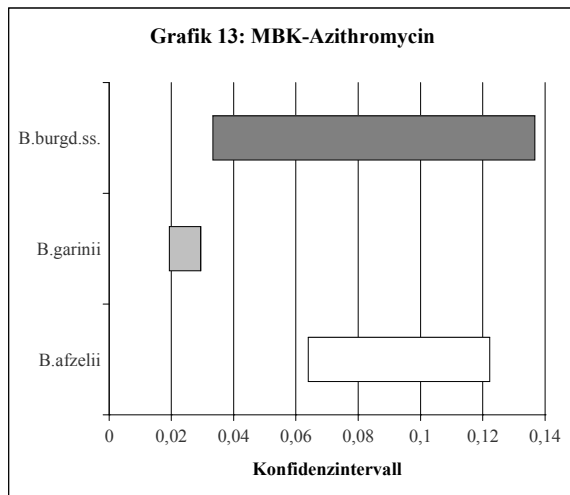
In Grafik 13 ( MBK von Azithromycin) ist zu sehen, dass das Konfidenzintervall von *Borrelia garinii* signifikant niedrigere Werte aufweist als die Messreihen der beiden anderen Genospezies, die sich jedoch nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Grafik 14 verdeutlicht, dass die MBK von Amoxicillin für *Borrelia burgdorferi* sensu stricto signifikant niedriger ist als für die beiden anderen Genospezies, wengleich das Intervall für *Borrelia garinii* aufgrund acht gleicher Werte minimal ist.

Grafik 15 zeigt statistische Unterschiede zwischen allen Genospezies: Die minimal bakterizide Konzentration von Ceftriaxon ist für *Borrelia afzelii* am niedrigsten, gefolgt von

*Borrelia garinii* und *Borrelia burgdorferi* sensu stricto mit den bei relativ großer Streubreite höchsten Messwerten.

Grafik 16 (MBK – Doxycyclin) läßt keine Unterschiede von statistischer Signifikanz erkennen.



Grafiken 13-16: 95%ige Konfidenzintervalle der MBK-Werte von vier Antibiotika gegen die drei Genospezies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* und *Borrelia burgdorferi* sensu stricto.

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Interpretation der Ergebnisse

#### 4.1.1 Allgemeines

Neben den Sensibilitätsunterschieden bei den drei getesteten Genospezies gibt es noch einige weitere erwähnenswerte Beobachtungen, die eine Reihe von Rückschlüssen zulassen:

Auffällig ist der Unterschied zwischen den minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) und den minimal bakteriziden Konzentrationen (MBK): während bei erstgenannten in keinem einzigen Fall statistische Unterschiede in der Wirksamkeit eines der untersuchten Antibiotika auf die drei Subspezies von *Borrelia burgdorferi* sensu lato festzustellen war, zeigten sich bei den MBK-Werten in sieben von zwölf möglichen Genospeziesvergleichen statistisch signifikante Unterschiede. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die Unterschiede in der Wirkungsweise erst nach mehreren Zellteilungen (man beachte die lange Generationszeit von *Borrelia burgdorferi*) zum Tragen kommen. Auch sind alle vier Substanzen bakteriostatisch, nicht alle sind jedoch zusätzlich bakterizid. Auch chemische Eigenschaften der antimikrobiellen Stoffe wie die Halbwertszeit könnten eine Rolle dabei spielen.

Vergleicht man die vier Antibiotika, gemessen an ihrem durchschnittlichen Effekt auf *Borrelia burgdorferi* *in vitro* untereinander, so kann man folgende Reihung von gut wirksam nach schlecht wirksam vornehmen: Azithromycin, Ceftriaxon, Amoxicillin, Doxycyclin. Dies bezieht sich selbstverständlich nur auf die Wirksamkeit *in vitro*. Die beiden erstgenannten Stoffe liegen dabei sehr nahe beieinander, während das Tetracyclin sehr deutlich mit mehreren Potenzen nach oben hin abweicht. Dies war jedoch schon vorher aus der einschlägigen Literatur bekannt. (6,37,38,52) Sieht man sich die Häufigkeitsverteilungen näher an, so ist nicht nur die höhere Wirksamkeit von Azithromycin und Ceftriaxon daraus abzulesen, sondern auch eine jeweils deutlich geringere Streubreite als bei den anderen beiden antimikrobiellen Substanzen. Insbesondere bei Ceftriaxon kommt die Streuung einer Gaußschen Normalverteilung ziemlich nahe. Ein Großteil der Werte befindet sich somit im mittleren Bereich, bei nur sehr geringer Abweichung. Die beiden erstgenannten Antibiotika hemmen das bakterielle Wachstum also zuverlässiger bei einer relativ genau vorhersagbaren

Konzentration, während insbesondere bei Doxycyclin teilweise annähernd zufällige Verteilungsmuster auftreten.

Auch im Genospeziesvergleich fällt eine hohe Streubreite auf, nämlich bei den Messwerten von *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, insbesondere in Kombination mit Doxycyclin. Im Gegensatz dazu liegen die Werte der beiden europäischen Genospezies, insbesondere *B. garinii*, wesentlich dichter beieinander. Diese Beobachtung könnte für eine höhere Heterogenität der Sensu stricto-Isolate sprechen, was der bisherigen Annahme einer starken Homogenität innerhalb dieser Genospezies (14,28,76,82) widersprechen würde.

#### 4.1.2 MHK-Werte

Wie bereits erwähnt, ergaben die MHK-Testungen hinsichtlich des Genospeziesvergleichs keine statistisch signifikanten Ergebnisse, auch wenn die minimale Hemmdosis der einzelnen getesteten Antibiotika auf *Borrelia burgdorferi* teilweise deutlich voneinander abwich. Dies bestätigt die Resultate der Studie von Baradaran-Dilmaghani et al. (6), zumindest hinsichtlich der minimalen Hemmkonzentrationen.

#### 4.1.3 MBK-Werte

Wie nach der Betrachtung von Tabelle 3 nicht anders zu erwarten, waren auch bei den minimal bakteriziden Konzentrationen die Werte für Doxycyclin mit Abstand am höchsten, gefolgt von Amoxicillin, Ceftriaxon und schließlich Azithromycin.

Weiterhin interessant ist die Steigerung der Dosis, die nötig ist um von der Hemmkonzentration auf eine bakterizide Konzentration zu kommen. Während bei Azithromycin und Ceftriaxon durchschnittlich nur eine Verdünnungsstufe zwischen MHK und MBK lag, betragen die Unterschiede bei Amoxicillin und Doxycyclin drei bzw. vier Verdünnungen. Bei den beiden erstgenannten Substanzen war also nur eine Verdopplung der Konzentration notwendig um Bakterizidie zu erreichen, bei letzteren mußte man die Dosis mit dem Faktor 8 bzw. 16 multiplizieren. Amoxicillin und Doxycyclin scheinen also *in vitro* weniger effektiv bakterizid zu sein als die anderen beiden getesteten Antibiotika.

Vergleicht man die drei Genospezies untereinander, so fällt auch hier wieder auf, dass die Werte bei *Borrelia burgdorferi* sensu stricto die größte Variationsbreite haben, während sie insbesondere bei *Borrelia garinii* sehr konstant sind.

Im Gegensatz zu den Hemmkonzentrationen lassen sich bei den minimal bakteriziden Konzentrationen sehr wohl signifikante Unterschiede feststellen, die man in den Grafiken 13-16 ablesen kann:

Azithromycin scheint besonders effektiv gegen *Borrelia garinii* zu sein, während die Werte für *Borrelia afzelii* und *Borrelia burgdorferi sensu stricto* höher liegen. Letztere weisen eine auffällig große Streubreite auf. Ähnliches wurde bereits von Hunfeld et al. beschrieben. (37)

Amoxicillin hatte interessanterweise eine signifikant bessere Wirkung auf *Borrelia burgdorferi sensu stricto* als auf die anderen beiden Isolate. Es ist auch das einzige getestete Antibiotikum mit einem relativ schmalen Konfidenzintervall, also einer geringen Streubreite innerhalb dieser Genospezies.

Bei Ceftriaxon gab es zwischen allen drei Genospezies Unterschiede von statistischer Signifikanz: Die niedrigsten Konzentrationen waren zur Abtötung von *Borrelia afzelii* nötig, gefolgt von *Borrelia garinii* und schließlich *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. Daraus folgt, dass Ceftriaxon am effektivsten gegen *Borrelia afzelii* wirkte.

Doxycyclin, in der heute üblichen klinischen Praxis das Standardantibiotikum (34,57,84) in der Therapie der frühen Lyme-Borreliose, hatte keine signifikant unterschiedlichen Wirkungen auf die drei getesteten Genospezies. Vielmehr waren *in vitro* bei allen Stämmen vergleichsweise hohe Dosen erforderlich, um alle Borrelien effektiv abzutöten.

## 4.2 Schlussfolgerungen

Kennt man einerseits das geographische Verteilungsmuster der drei Genospezies mit dem Überbegriff *Borrelia burgdorferi sensu lato* (14,76,82; siehe auch 1.2.2) und andererseits die unterschiedlichen Wirkungen verschiedener Antibiotika auf die jeweiligen Subspezies, so liegt es nahe, eventuelle neue Therapiekonzepte daraufhin auszurichten:

*Borrelia afzelii* erwies sich als besonders sensibel auf Ceftriaxon. Da aus der Drittstadienerkrankung Acrodermatitis chronica atrophicans bislang nahezu ausschließlich diese Genospezies isoliert wurde, liegt es nahe, hier mit diesem Cephalosporin zu therapieren. Dies deckt sich mit der heute üblichen klinischen Praxis. (34,57,84)

*Borrelia garinii* wurde besonders effektiv vom Makrolidantibiotikum Azithromycin eradiziert. Da diese Genospezies überzufällig häufig bei Vorliegen einer Neuroborreliose aus

Liquor isoliert wurde, könnte Azithromycin hier als sinnvolle Therapie betrachtet werden. Das Problem ist allerdings die fehlende Liquorgängigkeit dieser Substanz. (43) Wieder einmal wird hier die Diskrepanz von *in vitro*- und *in vivo*-Resultaten deutlich.

*Borrelia burgdorferi* sensu stricto, die in Nordamerika nahezu ausschließlich vertretene Variante, hatte bei fast allen Testungen die größte Streubreite und damit sehr heterogene Resultate vorzuweisen. Amoxicillin erwies sich jedoch als sehr effektiv bei der Abtötung dieser Genospezies. Vielleicht wäre es eine Überlegung wert, dieses Penicillin in den nordamerikanischen Endemiegebieten der Lyme-Borreliose vermehrt einzusetzen. Auch die Lyme-Arthritis, überzufällig häufig mit dieser Genospezies vergesellschaftet (14,82) und ebenso überdurchschnittlich häufig in den USA anzutreffen (32,70,76,82), könnte damit vielleicht sinnvoll behandelt werden.

#### 4.3 Kritische Anmerkungen

Von einer einzelnen Studie auf einen völlig neuen Sachverhalt oder gar auf eine Revolutionierung der gültigen Therapierichtlinien schließen zu wollen, ist natürlich sehr gewagt und auch wenig sinnvoll. Dafür ist allein schon die Anzahl der Stichproben viel zu gering. Auch können in einem einzelnen Labor nicht einmal annähernd weltweit gültige Bedingungen simuliert werden.

Die meisten zu dieser Thematik durchgeführten Studien beschränken sich leider immer noch auf Antibiotikatestungen gegen *Borrelia burgdorferi* sensu lato, ohne die Unterschiede der einzelnen Genospezies zu berücksichtigen. (3,17,36,38,40,41,45,47,52,53, 62,67) Dies wurde bislang nur in einer äußerst überschaubaren Anzahl an Arbeiten (6,24,37,42,63) getan. Dabei waren die Ergebnisse leider höchst widersprüchlich:

So fanden sich bei Baradaran-Dilmaghani et al. keine signifikanten Unterschiede in der Sensibilität der 30 getesteten Isolate auf Amoxicillin, Azithromycin, Cefotaxim, Ceftriaxon, Doxycyclin und Penicillin G. (6)

Henneberg et al. konnten bei 24 Isolaten Unterschiede mit leichter statistischer Signifikanz feststellen: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto erwies sich als besonders sensibel auf Erythromycin, während bei *Borrelia garinii* eine gute Penicillinsensibilität nachgewiesen werden konnte. (24) Dies deckt sich nicht mit den Ergebnissen unserer Arbeit, in der die gute Wirksamkeit des Penicillins Amoxicillin eher bei *Borrelia burgdorferi* sensu stricto

festgestellt wurde, während *Borrelia garinii* am besten vom Makrolid Azithromycin eradiziert wurde.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Hunfeld et al.: Bei insgesamt 11 getesteten Isolaten war die Genospezies *Borrelia garinii* vergleichsweise sensibel auf Penicillin. Es wurde zudem ein insgesamt erhöhtes Ansprechen dieser Genospezies auf antimikrobielle Substanzen im allgemeinen festgestellt. (37)

Auch Preac-Mursic et al. fanden bei ihrer vergleichenden Studie von jeweils 10 Isolaten der Genospezies *Borrelia garinii* und *Borrelia afzelii* eine insgesamt höhere Sensibilität ersterer Subspezies gegen die Antibiotika Amoxicillin, Azithromycin, Cefotaxim, Ceftriaxon, Doxycyclin und Penicillin G. (63)

Janovská et al. stellten dagegen bei Ihrer Studie eine erhöhte Antibiotikaresistenz von *Borrelia garinii* gegenüber 5 getesteten Substanzen fest. Einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Genospezies bei insgesamt 5 Isolaten konnten sie freilich nicht nachweisen. (42)

Auffällig bei all diesen Untersuchungen ist erstens die zumindest teilweise Widersprüchlichkeit der Ergebnisse sowie die jeweils niedrige Anzahl an getesteten Isolaten, die ein Ergebnis von statistischer Signifikanz oft deutlich erschwert. Grund für diese Tatsache ist wohl die äußerst schwierige Anzucht und Vermehrung von *Borrelia burgdorferi* in vergleichsweise teuren Nährmedien, was dazu führt, dass kaum ein Labor über eine sehr große Anzahl an kultivierbaren Isolaten verfügt.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die spezielle Überlebensstrategie von *Borrelia burgdorferi* im befallenen Organismus. Dies trägt wesentlich dazu bei, dass eine nachgewiesene antimikrobielle Wirksamkeit im Labor noch lange keinen eindeutigen Rückschluss auf die Fähigkeit eines Antibiotikums zur Krankheitsbekämpfung geben kann: (77)

*Borrelia burgdorferi* bildet keine Sporen (65), ist aber in der Lage unter ungünstigen Bedingungen, insbesondere nach Antibiotikagabe, Zystenformen anzunehmen. (10,49,65) Inwieweit dies einen Einfluss auf die Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Substanzen hat, ist noch weitgehend ungeklärt.

Auch wurde beschrieben, dass *Borrelia burgdorferi* unter dem Einfluss von Fibroblasten, wie sie auch in der menschlichen Haut vorkommen, wesentlich resistenter ist als gegen das gleiche Antibiotikum *in vitro*. (19)

Die antigene Oberflächenstruktur ist sehr variabel, was bei europäischen Borrelienisolaten stärker ausgeprägt ist als bei nordamerikanischen. Die Mutationsanfälligkeit

innerhalb eines Stammes ist sehr hoch. (28) Dies könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass *Borrelia burgdorferi* unter Umständen über Jahre im menschlichen Organismus überleben kann, da es sehr schwierig für das Immunsystem ist, sich den neuen Gegebenheiten immer wieder anzupassen.

Eine weitere Untersuchung ergab, dass die Oberflächenstruktur insbesondere von *Borrelia afzelii* über sogenannte CRASPs (complement regulator-acquiring surface proteins) verfügt, die die Komplementaktivierung im menschlichen Immunsystem hemmen und damit der bakteriellen Abtötung vorbeugen können. (51)

Schließlich führen die lange Überlebensdauer der Spirochäten im menschlichen Organismus (65) sowie die lange Generationszeit dazu, dass Antibiotika länger verabreicht werden müssen als bei den meisten anderen Bakterien, um einen ausreichenden Effekt zu erzielen. (77)

Diese notwendigerweise lange Applikationsdauer führt allerdings häufig zu Resistenzbildungen, die bei *Borrelia burgdorferi* glücklicherweise noch die Ausnahme sind, aber bereits beschrieben wurden. (74)

Neben der Überlebensstrategie von *Borrelia burgdorferi* selbst wird die Therapie der Lyme-Borreliose aber auch durch Pharmakokinetik und Pharmakodynamik der verwendeten Antibiotika erschwert:

So reagiert *Borrelia burgdorferi* beispielsweise auf das Makrolidantibiotikum Roxithromycin *in vitro* hoch sensibel. Beim Versuch am Patienten blieb der gewünschte Therapieerfolg jedoch aus. (22) Eine mögliche Ursache hierfür ist die mangelhafte gastrointestinale Resorption und damit schlechte Bioverfügbarkeit, was für Makrolide typisch ist.

Azithromycin, ein Makrolid das bei *in vitro*-Testungen exzellente Ergebnisse erzielte, verfügt zwar über eine ausgezeichnete Gewebeaffinität und eine lange Halbwertszeit, erwies sich aber als so gut wie nicht liquorgängig und ist damit in der Therapie der Neuroborreliose unbrauchbar. (43) Auch ist die maximale Serumkonzentration die niedrigste aller vier getesteten Antibiotika.

Penicilline wie Amoxicillin werden gerne und erfolgreich in der Borreliosetherapie eingesetzt. (57) Sie verfügen über eine relativ hohe Bioverfügbarkeit und erreichen eine in Relation zu anderen Substanzklassen hohe Serumkonzentration. Jedoch ist die Halbwertszeit von nur einer Stunde sehr kurz, was eine längerfristige Gabe notwendig macht.

Ceftriaxon ist von den untersuchten Substanzen das einzige rein parenteral verabreichte Antibiotikum und verfügt damit logischerweise über die beste Bioverfügbarkeit



und eine sehr kurze Dauer bis zum Erreichen der maximalen Konzentration im Serum. Es ist gut liquorgängig und damit das Therapeutikum der Wahl bei der Neuroborreliose. Nach neueren Untersuchungen genügt bereits eine fünftägige Therapie zur hundertprozentigen Eradikation von *Borrelia burgdorferi*. Nachteile sind die hohen Kosten und der meist notwendige stationäre Aufenthalt auf Grund der ausschließlich intravenösen Verabreichung.

Doxycyclin ist Mittel der Wahl bei der Lyme-Borreliose im frühen Krankheitsstadium. (34,57,84) Trotz durchgängig schlechter Testresultate *in vitro* (6,37,42,63) sind die Erfolge beim Patienten nicht von der Hand zu weisen. Eine mögliche Erklärung könnte die vergleichsweise gute Pharmakokinetik mit einer Bioverfügbarkeit von über 90 Prozent, dem Erreichen der maximalen Serumkonzentration bereits nach ein bis zwei Stunden sowie der überaus langen Halbwertszeit von ca. 16 Stunden liefern.

Die Möglichkeit, von *in vitro*-Testungen und Tierversuchen Rückschlüsse auf die tatsächlichen Verhältnisse beim Menschen zu ziehen, ist also begrenzt. (22,77) So könnte man aus den Ergebnissen dieser Arbeit schließen, dass insbesondere Ceftriaxon bahnbrechende Erfolge in der Borreliosetherapie bringen müsste, während Doxycyclin im Vergleich zu den anderen drei Substanzen mit Abstand am unwirksamsten ist. Nun ist aber gerade letztgenannte Substanz seit Jahren das am häufigsten eingesetzte Antibiotikum in der Therapie der Frühborreliose - meist mit guten Therapieergebnissen. (34,57,84)

All diese Faktoren mindern natürlich die Aussagekraft unserer *in vitro*-Testungen enorm. Auch ist die Anzahl der hier getesteten Isolate relativ gering. Die Ergebnisse unserer kleinen experimentellen Studie rechtfertigen es deshalb noch nicht, die Therapie der Lyme-Borreliose grundsätzlich zu revidieren. Zieht man allerdings die immer noch bestehenden Behandlungsschwierigkeiten, insbesondere der Spätmanifestationen der Borreliose, in Betracht, so könnten die hier vorgelegten Ergebnisse doch einen Stein des Anstoßes für weitere Untersuchungen liefern, um die Therapie der Lyme-Borreliose in Zukunft besser auf das Krankheitsbild, epidemiologische Aspekte und auf die individuelle Situation des Patienten abzustimmen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Lyme-Borreliose ist eine Multisystemkrankheit, die durch Spirochäten der Spezies *Borrelia burgdorferi* sensu lato hervorgerufen wird.

Der Krankheitsverlauf ist stadienhaft und kann, insbesondere nach unzureichender Therapie, noch nach Jahren zu Beschwerden führen.

Die Verbreitung der drei klinisch sehr wichtigen Subspezies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii* und *Borrelia burgdorferi* sensu stricto weist sowohl in geographischer Hinsicht als auch bei den einzelnen Krankheitsmanifestationen charakteristische Unterschiede auf.

Die Diagnostik erfolgt heute meist mittels serologischer Methoden. Als Therapie der Wahl gelten oral zu verabreichende Tetracycline oder Penicilline im ersten, Cephalosporine der dritten Generation (z.B. Cefotaxim, Ceftriaxon) oder hochdosierte Penicilline intravenös verabreicht im zweiten oder dritten Stadium. Vor allem bei den Spätmanifestationen ist der Therapieerfolg noch stark verbesserungswürdig. Diese Tatsache stellt den Ausgangspunkt unserer Studie dar.

Ziel der Arbeit war es, einen möglichen Unterschied der Wirkungsweise der vier häufig klinisch verwendeten Antibiotika Amoxicillin, Azithromycin, Ceftriaxon und Doxycyclin auf die drei Genospezies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, und *Borrelia burgdorferi* sensu stricto nachzuweisen.

Verwendet wurden 24 Isolate, jeweils acht pro Genospezies, die vorher mittels molekulargenetischer Verfahren einwandfrei identifiziert worden waren. Diese wurden aufsteigenden Verdünnungsstufen der oben beschriebenen Antibiotika beigelegt, sodass die minimale Hemmkonzentration und die minimal bakterizide Konzentration als Parameter für die Wirksamkeit der antimikrobiellen Substanzen bestimmt werden konnten.

Es ergaben sich für die MHK-Testungen keine statistisch signifikanten Unterschiede. Bei den MBK-Testungen jedoch wiesen insgesamt sieben von zwölf möglichen Vergleichen zwischen den Testreihen mit einem Signifikanzniveau  $\alpha \leq 0,05$  statistisch belegte Unterschiede auf.

Amoxicillin erwies sich als besonders effektiv gegen *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, Azithromycin erzielte besonders gute Werte bei *Borrelia garinii*, während *Borrelia afzelii* insbesondere auf Ceftriaxon hochsensibel reagierte. Doxycyclin schnitt bei diesem *in vitro*-Test deutlich schlechter ab und hatte zudem von allen Antibiotika die höchste Streubreite an Testwerten.

Diese *in vitro*-Resultate sind auf eine fragliche Wirksamkeit im lebenden Organismus nur bedingt übertragbar. Allerdings kann diese Arbeit im Zusammenspiel mit zahlreichen anderen experimentellen und klinischen Studien dazu beitragen, dass die Therapie der Lyme-Borreliose in naher Zukunft effektiver gestaltet werden könnte.

## 6. LITERATUR

1. Adam T, Neubert U, Göbel UB (1992) Detection and classification of *Borrelia burgdorferi* by direct sequencing of 16srRNA amplified after reverse transcription. Med Microbiol Lett 1:120-126
2. Afzelius A (1910) Verhandlungen der Dermatologischen Gesellschaft zu Stockholm, 28.Oct.1909. Arch Dermatol Syph 101:404
3. Agger WA, Callister SM, Jobe DA (1992) *In Vitro* Susceptibilities of *Borrelia burgdorferi* to Five Oral Cephalosporins and Ceftriaxone. Antimicrob Agents Chemother 36:1788-1790
4. Asbrink E, Hovmark A, Weber K (1993) Acrodermatitis Chronica Atrophicans. Weber K, Burgdorfer W (Hrsgb.): Aspects of Lyme Borreliosis 1:193-204, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
5. Bannwarth A (1941) Chronische lymphozytäre Meningitis, entzündliche Polyneuritis und "Rheumatismus". Arch Psychiatr Nervenkr 117:284-376
6. Baradaran-Dilmaghani R, Stanek G (1996) *In Vitro* Susceptibility of Thirty *Borrelia* Strains from Various Sources against Eight Antimicrobial Chemotherapeutics. Infection 24:60-63
7. Barbour AG: Isolation and Cultivation of Lyme Disease Spirochetes (1984) Yale J Biol Med 57:521-525
8. Barbour AG, Burgdorfer W, Hayes SF, Péter O, Aeschlimann A (1983) Isolation of a cultivable spirochete from Ixodes Ricinus Ticks of Switzerland. Curr Microbiol 8:123-126
9. Bianchi GE (1950) Die Penicillinbehandlung der Lymphocytoeme. Dermatologica 100:270-273

10. Brorson Ø, Brorson S-H (1999) An *in vitro* study of the susceptibility of mobile and cystic forms of *Borrelia burgdorferi* to metronidazole. *APMIS* 107:566-576
11. Burckhardt JL (1911) Zur Frage der Follikel- und Keimzentrenbildung in der Haut. *Frankf Z Pathol* 6:352-359
12. Burgdorfer W (1993) The historical road to the discovery of *Borrelia burgdorferi*. Weber K, Burgdorfer W (Hrsgb.): *Aspects of Lyme Borreliosis* 1:21-28, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
13. Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP (1982) Lyme-Disease – A Tick-Borne Spirochetosis? *Science* 216:1317-1319
14. van Dam AP, Kuiper H, Vos K, Widjojokusumo A, de Jongh BM, Spanjaard L, Ramselaar ACP, Kramer MD, Dankert J (1993) Different Genospecies of *Borrelia burgdorferi* are Associated with Distinct Clinical Manifestations of Lyme Borreliosis. *CID* 17:708-717
15. Dattwyler RJ, Halperin JJ, Volkman DJ, Luft BJ (1988) Treatment of Late Lyme Borreliosis – Randomised Comparison of Ceftriaxone and Penicillin. *Lancet* 5:1191-1194
16. Dattwyler RJ, Luft BJ, Kunkel MJ, Finkel MF, Wormser GP, Rush TJ, Grunwaldt E, Agger WA, Franklin M, Oswald D, Cockey L, Maladorno D (1997) Ceftriaxone Compared with Doxycycline for the Treatment of Acute Disseminated Lyme Disease. *N Engl J Med* 337:289-294
17. Dever LL, Jorgensen JH, Barbour AG (1992) *In Vitro* Antimicrobial Susceptibility Testing of *Borrelia burgdorferi*: a Microdilution MIC Method and Time-Kill Studies. *J Clin Microbiol* 30:2692-2697
18. Fujita H, Yamada K, Kurita T, Masuzawa T, Yanagihara Y (1995) *In Vitro* and *In Vivo* Antibiotic Susceptibility of Lyme Disease *Borrelia* Isolated from the Ixodic Tick in Japan. *J Dermatol* 22:935-938

19. Georgilis K, Peacocke M, Klempner MS (1992) Fibroblasts Protect the Lyme Disease Spirochete, *Borrelia burgdorferi*, from Ceftriaxone *In Vitro*. JID 166:440-444
20. Gern L, Burgdorfer W, Aeschlimann A, Krampitz HE (1993) The Ecology of Lyme Borreliosis in Europe. Weber K, Burgdorfer W (Hrsgb.): Aspects of Lyme Borreliosis 1:59-69, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
21. Girard AE, Girard D, English AR, Gootz TD, Cimochowski CR, Faiella JA, Haskell SL, Retsema JA (1987) Pharmacokinetic and *In Vivo* Studies with Azithromycin (CP-62,993), a New Macrolide with an Extended Half-Life and Excellent Tissue Distribution. Antimicrob Agents Chemother 31:1948-1954
22. Hansen K, Hovmark A, Lebech A-M, Lebech K, Olsson I, Halkier-Sørensen L, Olsson E, Åsbrink E (1992) Roxithromycin in Lyme Borreliosis: Discrepant Results of an *In Vitro* and *In Vivo* Animal Susceptibility Study and a Clinical Trial in Patients with Erythema Migrans. Acta Derm Venerol 72:297-300
23. Hauser W (1955) Zur Kenntnis der Acrodermatitis chronica atrophicans. Arch Dermatol Syph 199:350-393
24. Henneberg JP, Neubert U (2002) *Borrelia burgdorferi* Group: *In Vitro* Antibiotic Sensitivity. Orv Hetil 143:1195-8
25. Herxheimer K, Hartmann K (1902) Über Acrodermatitis chronica atrophicans. Arch Dermatol Syph 61:255-300
26. Herzer P (1993) Joint Manifestations. Weber K, Burgdorfer W (Hrsgb.): Aspects of Lyme Borreliosis 1:168-184, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
27. Hollström E (1951) Successful Treatment of Erythema migrans Afzelius. Acta Derm Venerol 31:235-243
28. Horst H (1997) Eigenschaften des Erregers *Borrelia burgdorferi* und Abwehrreaktionen des Körpers. Horst H (Hrsgb.): Einheimische Zeckenborreliose

- (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier 3:22-30, Demeter-Verlag im Spitta-Verlag Balingen
29. Horst H (1997) Entdeckungsgeschichte der Lyme-Krankheit und des Erregers *Borrelia burgdorferi*. Horst H (Hrsgb.): Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier 3:15-21, Demeter-Verlag im Spitta-Verlag Balingen
  30. Horst H (1997) Epidemiologie. Horst H (Hrsgb.): Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier 3:48-54, Demeter-Verlag im Spitta-Verlag Balingen
  31. Horst H (1997) Klinik der *Borrelia burgdorferi*-Infektionen – allgemeiner Überblick. Horst H (Hrsgb.): Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier 3:55-59, Demeter-Verlag im Spitta-Verlag Balingen
  32. Horst H (1997) Lyme-Arthritis. Horst H (Hrsgb.): Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier 3:116-121, Demeter-Verlag im Spitta-Verlag Balingen
  33. Horst H (1997) Serodiagnostik. Horst H (Hrsgb.): Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier 3:128-135, Demeter-Verlag im Spitta-Verlag Balingen
  34. Horst H (1997) Therapie. Horst H (Hrsgb.): Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier 3:156-161, Demeter-Verlag im Spitta-Verlag Balingen
  35. Hovmark A, Asbrink E, Weber K, Kaudewitz P (1993) Borrelial Lymphocytoma. Weber K, Burgdorfer W (Hrsgb.): Aspects of Lyme Borreliosis 1:122-130, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
  36. Hunfeld K-P, Kraiczy P, Kekoukh E, Schafer V, Brade V (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.33:125-37
37. Hunfeld K-P, Kraiczy P, Wichelhaus TA, Schäfer V, Brade V (2000) Colorimetric *In Vitro* Susceptibility Testing of Penicillins, Cephalosporins, Macrolides, Streptogramins, Tetracyclines, and Aminoglycosides against *Borrelia burgdorferi* Isolates. *Int J Antimicrob Agents* 15:11-17
  38. Hunfeld K-P, Kraiczy P, Wichelhaus TA, Schäfer V, Brade V (2000) New Colorimetric Microdilution Method for *In Vitro* Susceptibility Testing of *Borrelia burgdorferi* against Antimicrobial Substances. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19:27-32
  39. Hunfeld K-P, Ruzic-Sabljić E, Norris DE, Kraiczy P, Strle F (2005) *In Vitro* Susceptibility Testing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato Isolates Cultured from Patients with Erythema Migrans before and after Antimicrobial Chemotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 49:1294-301
  40. Hunfeld K-P, Weigand J, Wichelhaus TA, Kekoukh E, Kraiczy P, Brade V (2001) *In Vitro* Activity of Mezlocillin, Meropenem, Aztreonam, Vancomycin, Teicoplanin, Ribostamycin and Fusidic Acid against *Borrelia burgdorferi*. *Int J Antimicrob Agents* 17:203-8
  41. Hunfeld K-P, Wichelhaus TA, Rodel R, Acker G, Brade V, Kraiczy P (2004) Comparison of *In Vitro* Activities of Ketolides, Macrolides, and an Azalide against the Spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob Agents Chemother* 48:344-7
  42. Janovská D, Hulínská D, Godová D (2001) Sensitivity of *Borrelia burgdorferi* Strains Isolated in the Czech Republic. *Cent Eur J Publ Health* 9:38-40
  43. Jaruratanasirikul S, Hortiwakul R, Tantisarasart T, Phuenpathom N, Tussanasunthornwong S (1996) Distribution of Azithromycin into Brain Tissue, Cerebrospinal Fluid, and Aqueous Humor of the Eye. *Antimicrob Agents Chemother* 40:825-826



44. Johnson RC (1989) Isolation Techniques for Spirochetes and Their Sensitivity to Antibiotics *In Vitro* and *In Vivo*. *Rev Infect Dis* 11, Suppl.6:1505-1510
45. Johnson RC, Kodner CB, Jurkovich PJ, Collins JJ (1990) 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
46. Johnson RC, Kodner CB, Russel M (1984) *In Vitro* and *In Vivo* susceptibility of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, to four antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 31:164-167
47. Johnson RC, Kodner CB, Russell M, Girard D (1990) *In Vitro* and *In Vivo* Susceptibility of *Borrelia burgdorferi* to Azithromycin. *J Antimicrob Chemother* 25, Suppl.A:33-38
48. Johnson RC, Schmidt GP, Hyde FW, Steigerwalt AG, Brenner DJ (1984) *Borrelia burgdorferi*, sp.nov.: Etiologic Agent of Lyme disease. *Int J Syst Bacteriol* 34:496-497
49. Kersten A, Poitschek C, Rauch S, Aberer E (1995) Effects of Penicillin, Ceftriaxone, and Doxycycline on Morphology of *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob Agents Chemother* 39:1127-1133
50. de Koning J, Duray PH (1993) Histopathology of Human Lyme Borreliosis. Weber K, Burgdorfer W (Hrsgb.): *Aspects of Lyme Borreliosis* 1:70-92, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
51. Kraiczy P, Skerka C, Kirschfink M, Zipfel PF, Brade V (2002) Immune Evasion of *Borrelia burgdorferi*: Insufficient Killing of the Pathogens by Complement and Antibody. *Int J Med Microbiol* 291, Suppl.33:141-6
52. Levin JM, Nelson JA, Segreti J, Harrison B, Benson CA, Strle F (1993) *In Vitro* Susceptibility of *Borrelia burgdorferi* to 11 Antimicrobial Agents. *Antimicrob Agents Chemother* 37:1444-1446

53. Li M, Masuzawa T, Wang J, Kawabata M, Yanagihara Y (2000) *In Vitro* and *In Vivo* Antibiotic Susceptibilities of Lyme disease *Borrelia* Isolated in China. *J Infect Chemother* 6:65-7
  
54. Liebisch A, Liebisch G (1997) *Biologie und Ökologie der Zecken*. Horst H (Hrsgb.): *Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier* 3:31-47, Demeter-Verlag im Spitta-Verlag Balingen
  
55. Masuzawa T, Yamada K, Kawabata H, Yanagihara Y (1994) *In Vitro* Antibiotic Susceptibilities of *Borrelia* Isolates from Erythema Migrans Lesion of Lyme Disease Patients in Japan. *Microbiol Immunol* 38:399-402
  
56. Neubert U (1996): *Borrelia burgdorferi*-Infektionen. Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH (Hrsgb.): *Dermatologie und Venerologie* 4:162-172, Springer Verlag Berlin Heidelberg
  
57. Neubert U (1998) *Borreliosen-Therapie 1998*. Plewig G, Wolff H (Hrsgb.): *Fortschritte der praktischen Dermatologie und Venerologie 1998* 16:497-505, Springer Verlag Berlin Heidelberg
  
58. Neubert U (2003) *Hautmanifestationen*. Horst H (Hrsgb.): *Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier* 4:62-91, Demeter-Verlag im Spitta-Verlag Balingen
  
59. Neubert U, Aberer E, Rufli T (1993) *Localized Scleroderma and Lichen Sclerosus et Atrophicus: Manifestations of a Borrelia burgdorferi Infection?* Weber K, Burgdorfer W (Hrsgb.): *Aspects of Lyme Borreliosis* 1:240-247, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
  
60. Pavia C, Inchiosa MA, Wormser GP (2002) *Efficacy of short-course Ceftriaxone Therapy for Borrelia burgdorferi Infection in C3H Mice*. *Antimicrob Agents Chemother* 46:132-4

61. Pollack RJ, Telford SR, Spielman A (1993) Standardization of medium for culturing Lyme disease spirochetes. *J Clin Microbiol* 31:1251-1255
62. Preac-Mursic V (1993) Antibiotic Susceptibility of *Borrelia burgdorferi* *In Vitro* and *In Vivo*. Weber K, Burgdorfer W (Hrsgb.): *Aspects of Lyme Borreliosis* 1:301-311, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
63. Preac-Mursic V, Marget W, Busch U, Pleterksi Rigler D, Hagl S (1996) Kill Kinetics of *Borrelia burgdorferi* and Bacterial Findings in Relation to the Treatment of Lyme Borreliosis. *Infection* 24:9-16
64. Preac-Mursic V, Weber K, Pfister HW, Wilske B, Gross B, Baumann A, Prokop J (1989) Survival of *Borrelia burgdorferi* in antibioticly treated patients with Lyme Borreliosis. *Infection* 17:355-359
65. Preac-Mursic V, Wilske B (1993) Biology of *Borrelia burgdorferi*. Weber K, Burgdorfer W (Hrsgb.): *Aspects of Lyme Borreliosis* 1:44-58, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
66. Preac-Mursic V, Wilske B, Schierz G (1986) European *Borrelia burgdorferi* Isolated from Humans and Ticks – Culture Conditions and Antibiotic Susceptibility. *Zbl Bakt Hyg* 263:112-118
67. Preac-Mursic V, Wilske B, Schierz G, Süß E, Groß B (1989) Comparative Antimicrobial Activity of the New Macrolides against *Borrelia burgdorferi*. *Eur J Clin Microbiol* 8:651-653
68. Reimers CD (1997) Neurologische Manifestationen der *Borrelia burgdorferi*-Infektionen. Horst H (Hrsgb.): *Einheimische Zeckenborreliose (Lyme-Krankheit) bei Mensch und Tier* 3:87-100, Demeter-Verlag im Spitta-Verlag Balingen
69. Ruzic-Sabljić E, Podreka T, Maraspin V, Strle F (2005) Susceptibility of *Borrelia afzelii* Strains to Antimicrobial Agents. *Int J Antimicrob Agents* 25:474-8

70. Stanek G, Satz N, Strle F, Wilske B (1993) Epidemiology of Lyme Borreliosis. Weber K, Burgdorfer W (Hrsgb.): Aspects of Lyme Borreliosis 1:358-370, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
71. Steere AC (1989) Lyme Disease. N Engl J Med 321:586-594
72. Steere AC, Malawista SE, Hardin JA, Rudy S, Askenase PW, Andiman WA (1977) Erythema chronicum migrans and Lyme arthritis: The enlarging clinical spectrum. Ann intern Med 86:685-698
73. Svartz N (1946) Penicillinbehandling vid dermatitis atrophicans Herxheimer. Nord Med 32:2783
74. Terekhova D, Sartakova ML, Wormser GP, Schwartz I, Cabello FC (2002) Erythromycin Resistance in *Borrelia burgdorferi*. Antimicrob Agents Chemother 46:3637-40
75. Thyresson N (1949) The penicillin treatment of Acrodermatitis chronica atrophicans (Herxheimer). Acta Derm Venerol 29:572-621
76. Weber K (2001) Aspects of Lyme Borreliosis in Europe. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 20:6-13
77. Weber K, Marget W (1993) Critical Remarks on Antibiotic Therapy. Weber K, Burgdorfer W (Hrsgb.): Aspects of Lyme Borreliosis 1:352-357, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
78. Weber K, Neubert U, Büchner SA (1993) Erythema Migrans and Early Signs and Symptoms. Weber K, Burgdorfer W (Hrsgb.): Aspects of Lyme Borreliosis 1:105-121, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
79. Weber K, Pfister H-W (1993) History of Lyme Borreliosis in Europe. Weber K, Burgdorfer W (Hrsgb.): Aspects of Lyme Borreliosis 1:1-20, Springer-Verlag Berlin Heidelberg

80. Weber K, Pfister H-W, Reimers CD (1993) Clinical Overview. Weber K, Burgdorfer W (Hrsgb.): Aspects of Lyme Borreliosis 1:93-104, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
81. Wienecke R, Koch OM, Neubert U, Göbel UB, Volkenandt M (1993) Detection of subtype-specific gene segments by analysis of conformational polymorphisms of cRNA molecules. Med Microbiol Lett 2:239-246
82. Wienecke R, Zöchling N, Neubert U, Schlüpen E-M, Meurer M, Volkenandt M (1994) Molecular Subtyping of *Borrelia burgdorferi* in Erythema Migrans and Acrodermatitis Chronica Atrophicans. J Invest Dermatol 103:19-22
83. Wilske B, Preac-Mursic V (1993) Microbiological Diagnosis of Lyme Borreliosis. Weber K, Burgdorfer W (Hrsgb.): Aspects of Lyme Borreliosis 1:267-299, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
84. Wormser GP, Nadelman RB, Dattwyler RJ, Dennis DT, Shapiro ED, Steere AC, Rush TD, Rahn DW, Coyle PK, Persing DH, Fish D, Luft BJ (2000) Practice Guidelines for the Treatment of Lyme Disease. CID 31, Suppl.1:1-14

## 7. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

ACA	Acrodermatitis chronica atrophicans
B.	<i>Borrelia</i>
<i>B.burgd.ss.</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu stricto
<i>B.burgd.sl.</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato
BL	Borrelienlymphozytom
BSK-Medium	Barbour-Stoenner-Kelly-Medium
ca.	circa
CDC	Center of Disease Control (engl.: Centrum für Krankheitskontrolle)
ECM	Erythema chronicum migrans
EM	Erythema migrans
et al.	et alii (lat.: und andere)
I.E.	internationale Einheiten
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
LACB	Lymphadenosis cutis benigna
MBK	minimal bakterizide Konzentration
MHK	minimale Hemmkonzentration
MKP-Medium	modifiziertes Kelly-Medium nach Preac-Mursic et al.
PCR	polymerase chain reaction (engl.: Polymerasekettenreaktion)
u.a.	unter anderem
vorw.	vorwiegend
z.B.	zum Beispiel

## **8. DANKSAGUNGEN**

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. hc. mult. G. Plewig für die Möglichkeit, an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität zu promovieren.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. U. Neubert für die Auswahl der Thematik, die umfassende Einarbeitung, die hervorragende Betreuung und die konstruktive Kritik beim Entstehen dieser Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an die medizinisch-technischen Assistentinnen der Abteilungen Bakteriologie und Elektronenmikroskopie, insbesondere Frau J. Laude und Frau G. Weishar, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Zu guter Letzt bedanke ich mich auch bei meiner Familie und meinen engsten Freunden für Ablenkung und moralische Unterstützung während besonders anstrengender Phasen meiner Arbeit.

## 9. LEBENSLAUF

### Angaben zur Person

Name: Martin Sicklinger  
Wohnort: Innstr.10  
83278 Traunstein  
Tel.: 0861 / 14105  
Geburtstag und -ort: 15.06.1976, München  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

09.1983 – 07.1987 Grundschule (Schule an der Rosenheimerstrasse,  
Traunstein)  
09.1987 – 06.1996 Gymnasium (Chiemgau-Gymnasium, Traunstein)  
28.06.1996 Abitur (Note: 1,6)

### Wehrdienst

09.1996 – 06.1997 Sanitätssoldat in Kempten, Traunstein und  
Pocking

### Studium

11.1997 – 08.1999 Vorklinisches Studium an der LMU München  
30.08.1999 Physikum (Note: 2,6)  
09.1999 – 03.2003 Klinisches Studium an der LMU München  
22.03.2001 1.Staatsexamen (Note: 3,0)  
21.03.2003 2.Staatsexamen (Note: 3,0)  
29.04.2004 3.Staatsexamen (Note: 2,0; Gesamtnote: 2,6)



## **Praktika**

08.2000 – 09.2000	Famulatur an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU München
08.2001 – 09.2001	Famulatur am Community Hospital of Seventh Day Adventists, Port of Spain, Trinidad and Tobago
03.2002	Famulatur bei Dr. med. Christoph Hundemer, Facharzt für Allgemeinmedizin, Sportmedizin, H-Arzt-Verfahren, München-Pasing
04.2003 – 03.2004	Praktisches Jahr:
04.2003 – 08.2003	Wahlfach Dermatologie an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU München
08.2003 – 11.2003	Innere Medizin am Princess Alexandra Hospital, Brisbane, Queensland, Australien
11.2003 – 03.2004	Chirurgie am Städtischen Krankenhaus München-Harlaching

## **Publikation**

Sicklinger M, Wienecke R, Neubert U (2003) *In Vitro* Susceptibility Testing of Four Antibiotics against *Borrelia burgdorferi*: a Comparison of Results for the Three Genospecies *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, and *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. J Clin Microbiol 41:1791-1793

## **Berufliche Laufbahn**

seit 11.2004	Facharztweiterbildung in der Schlossklinik Abtsee, Fachklinik für Venenkrankheiten, Laufen, Oberbayern
--------------	--

## **Persönliche Interessen**

Fremdsprachen:

Englisch: fließend in Wort und Schrift

Latein: Grundkenntnisse

Spanisch: Grundkenntnisse

Computerkenntnisse:

gute Kenntnisse in Word, Excel, Powerpoint,

Corel Draw

Kultur:

Reisen, Konzerte, Theater

Politik:

Beisitzer im Traunsteiner Ortsvorstand der

Jungen Union Bayern

Sport:

Fußball, Laufen, Fahrradfahren, Schwimmen