

Tomasz Chmielewski^{1*}, Stanisława Tylewska-Wierzbanowska¹

¹Samodzielna Pracownia Riketsji, Chlamydii i Krętków Odzwierzęcych,
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

Wpłynęło w styczniu 2017 r.
Zaakceptowano w marcu 2017 r.

1. Wstęp. 2. Hodowla i wzrost *Borrelia burgdorferi* sensu lato w warunkach *in vitro*. 3. Wrażliwość na antybiotyki *Borrelia burgdorferi* *in vitro*. 4. Podsumowanie

Susceptibility of spirochetes *Borrelia burgdorferi* sensu lato to antibiotics *in vitro*

Abstract: Empiric therapy has been applied in the treatment of Lyme disease. This therapy is selected following the sensitivity analysis of the proposed drug in all species of bacteria which can cause a similar type of infection and on the basis of the clinical efficacy of antibiotic treatment. Established schemes based on data collected from many centers in the world, including type of antibiotic, dose and duration of his administration, and the stage and form of Lyme disease have been created. Number of *in vitro* methods of spirochetes susceptibility to antibiotics has been also developed. Unfortunately, the lack of standardization often makes it impossible to compare the results of MIC and MBC. Furthermore, little is known about the interactions of the various antimicrobial substances and spirochetes. There is a need for testing of clinical strains isolated from patients after treatment, which would explain the problems associated with “refractory” cases of Lyme disease. The paper presents the research on the antibiotic-spirochete interactions observed *in vitro*.

1. Introduction. 2. *In vitro* culture and growth of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. 3. *In vitro* susceptibility of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto strains to antimicrobial agents. 4. Summary

Słowa kluczowe: *Borrelia burgdorferi*, antybiotyki

Key words: *Borrelia burgdorferi*, antibiotics

1. Wstęp

W leczeniu boreliozy z Lyme stosowana jest tzw. terapia empiryczna, dobrana na podstawie analizy wrażliwości na proponowany lek wszystkich gatunków bakterii, mogących wywołać podobny typ zakażenia oraz na podstawie oceny skuteczności klinicznej leczenia proponowanym antybiotykiem. Opierając się na danych zebranych z wielu ośrodków na świecie ustalono schematy, obejmujące zarówno rodzaj antybiotyku, dawki i czasokres jego podawania, a także stadium i postać boreliozy z Lyme. Ocena lekowrażliwości krętków *Borrelia burgdorferi* wyhodowanych z materiału pobranego od pacjenta i wprowadzenie tzw. terapii celowanej, zgodnej z profilem wrażliwości na leki wyhodowanego szczepu w boreliozie z Lyme, na dzień dzisiejszy nie jest możliwa. Trudności z oznaczeniem lekowrażliwości *in vitro* krętków *B. burgdorferi* wynikają z kilku przyczyn. Dotychczas opracowano tylko jedno płynne podłoże hodowlane, na którym te krętki rosną, przy czym wzrost jest bardzo powolny, gdyż czas podziału komórki wynosi średnio około 14–16 godzin. Ponadto, rzadko udaje się izolacja szczepu z materiału pochodzącego od chorego,

nawet po kilku miesięcznej hodowli, w związku z czym nie ma możliwości oceny różnorodności jak i lekowrażliwości uzyskiwanych izolatów [1, 10, 11, 12].

Jednak potrzeba określania lekowrażliwości krętków *B. burgdorferi* jest niewątpliwa ze względu na obserwowane niepowodzenia w leczeniu, a w związku z tym często zbyt długie podawanie antybiotyków, prowadzące u leczonych chorych do wystąpienia niepożądanych działań stosowanego leku. Szacuje się, że około 10–20% chorych poddanych 2–4 tygodniowej rekomendowanej antybiotykoterapii, nadal zgłasza objawy choroby, takie jak zmęczenie, bóle mięśni i stawów i inne dolegliwości. Objawy takie mogą występować przez wiele miesięcy po leczeniu i określane są jako zespół po leczeniu boreliozy z Lyme (post-treatment Lyme disease). Niektórzy badacze sugerują możliwość przetrwania krętków w organizmie chorego mimo terapii, ale jak dotychczas nie zostało to udowodnione.

Podjęmowane są coraz częściej próby opracowania metod oznaczenia wrażliwości na antybiotyki *in vitro*, ich standaryzacji i uzyskania porównywalnych wyników, z wykorzystaniem różnych modyfikacji proponowanych technik.

* Autor korespondencyjny: Samodzielna Pracownia Riketsji, Chlamydii i Krętków Odzwierzęcych Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; tel. 22 5421261; e-mail: tchmielewski@pzh.gov.pl

2. Hodowla i wzrost *Borrelia burgdorferi* sensu lato w warunkach *in vitro*

Krętki *B. burgdorferi* sensu lato są bakteriami o bardzo dużych wymaganiach wzrostowych, które nie rosną na żadnych powszechnie stosowanych płynnych i stałych podłożach bakteriologicznych. Można je hodować wyłącznie na bardzo bogatym, płynnym podłożu Barbour-Stonner-Kelly'ego (BSK) i jego modyfikacjach, z dodatkiem surowicy króliczej. Na podłożu tym rosną jednak bardzo wolno, a wynik hodowli uzyskuje się po około 3 miesiącach inkubacji w temperaturze 31–34°C, w warunkach mikroaerofilnych, w atmosferze 5% dwutlenku węgla. W wyższej temperaturze następuje zahamowanie ich wzrostu. Dla uzyskania pojedynczych kolonii płynne podłoże BSK można zestalić agarowo, co jednak nie skraca czasu hodowli. Z tego powodu klasyczne metody oznaczenia lekooporności, stosowane dla innych gatunków bakterii, w tym przypadku nie mają zastosowania [1].

Poza podłożem BSK, istnieje możliwość hodowli *B. burgdorferi* w komórkach linii tkankowych. Wykazano, że krętki mogą rosnąć w komórkach wyprowadzonych zarówno z tkanek kleszczy, jak i ssaków [5, 15, 16]. Obserwowano krętki penetrujące komórki eukariotyczne tj. adhezję bakterii na ich powierzchni, następnie wnikanie do wnętrza komórki i tworzenie wakuoli z części błony komórkowej. Wewnątrzkomórkowe namnażanie się krętków obserwowano zarówno w hodowlanych komórkach kleszczy, jak i ludzkich. Po kilku dniach komórki pękały, a uwolnione krętki przechodziły do przestrzeni międzykomórkowych i wnikały do kolejnych zdrowych komórek [4, 5]. Podczas hodowli w komórkach linii wyprowadzonych z tkanek kleszczy, u krętków obserwowano zmiany białek powierzchniowych oraz spadek liczby plazmidów [15].

3. Wrażliwość na antybiotyki *Borrelia burgdorferi* *in vitro*

Badania wrażliwości krętków *B. burgdorferi* sensu lato *in vitro* były od początku ograniczone z powodu stosowania niejednorodnych procedur badawczych oraz braku standaryzacji metod. W związku z tym, pochodzące z różnych laboratoriów wyniki badań wrażliwości *in vitro* tych bakterii, w tym wartości minimalnego stężenia hamującego (MIC) jak i minimalnego stężenia krętkobójczego (MBC) oraz ich definicje, są często rozbieżne, a dane na temat antybiotykowrażliwości niespójne. Powoduje to, że np. wartość MIC dla penicyliny G waha się od 0,003 µg/ml do 8 µg/ml, a MBC od 0,05 µg/ml do > 50 µg/ml [2, 9, 11, 13, 14, 17]. Dodatkowo, dokładniejsze badania są ograniczone z powodu

małej liczby dostępnych izolatów, szczególnie tych, uzyskanych od chorych niepoddających się leczeniu.

Oznaczenie lekowrażliwości krętków *B. burgdorferi* prowadzone jest w podłożu BSK. Podjęte zostały próby opracowania zarówno metody oznaczenia wartości MIC jak i MBC oraz zobiektywizowania odczytu wyników badań. W tym celu opracowano kolorymetryczne oznaczenie w oparciu o odczyt spektrofotometryczny zmian barwy podłoża na różnych etapach badania [9]. Ponieważ wśród wielu czynników, duży wpływ na uzyskiwane wyniki ma gęstość badanej zawiesiny bakteryjnej, faza jej wzrostu oraz czas inkubacji, przyjęto zakres gęstości stosowanego *inoculum* od 1×10^4 do $2,5 \times 10^7$ krętków/ml, a czas inkubacji od 48 godzin do 10 dni.

MIC krętków można oznaczać klasyczną metodą rozcieńczeń w probówkach lub na sterylnych płytkach mikrotitracyjnych. Płytki zapewniają dużą oszczędność stosowanych odczynników. Antybiotyków rozcieńcza się w podłożu BSK i kolejne rozcieńczenia nakłada do probówek lub studzienek na płytce. Do podłoża z antybiotykiem dodaje się tę samą objętość zawiesiny krętków, zawierającą ściśle określoną liczbę komórek bakteryjnych. Ruchliwość krętków kontrolowana jest co 24 godziny [11].

W przypadku MBC postępowanie jest podobne jak w przy oznaczeniu MIC, jednak konieczne jest badanie sprawdzające żywotność [przeżycie] krętków po inkubacji z antybiotykiem. Utratę żywotności krętków po inkubacji z danym antybiotykiem określa się na 50% lub 90%. Na wynik ma wpływ zarówno stężenie badanej substancji, jak i czas inkubacji [17].

Wyniki badań wrażliwości *B. burgdorferi* na antybiotyki *in vitro*, wykazują szeroki zakres wartości MIC, a szczególnie wartości MBC. Oprócz wcześniej wymienionych czynników, na wynik badania wrażliwości krętków na antybiotyki wpływ ma surowica wzbogacająca podłoże hodowlane, która może powodować utratę aktywności bakteriobójczej niektórych antybiotyków, szczególnie, że dla określenia MBC konieczna jest kilku tygodniowa inkubacja krętków. Poza tym, antybiotyki mają najwyższą aktywność przeciwbakteryjną w czasie logarytmicznej fazy wzrostu bakterii. [10].

Heterogenność izolatów *B. burgdorferi* pod względem wrażliwości na antybiotyki *in vitro* była wykazywana przez wielu badaczy. Tabela I przedstawia wyniki oznaczenia wrażliwości szeregu szczepów izolowanych od chorych z rumieniem wędrującym (EM), przed i po leczeniu antybiotykami stosowanymi rutynowo jako leki pierwszego wyboru, które wykonano w jednym laboratorium [11, 12]. Hodując krętki *B. burgdorferi* w podłożu BSK, po 72 godzinach stwierdzano niewielkie różnice w wartościach MIC i MBC zastosowanych antybiotyków dla szczepów izolowanych przed i po leczeniu (Tabela I). Należy jednak zaznaczyć, że

Tabela I
Średnie wartości MIC dla 5 szczepów *B. burgdorferi* izolowanych od chorych z rumieniem wędrującym przed i po leczeniu antybiotykami [11]

Antybiotyk	Średnie wartości MIC w µg/ml (zakresy) dla szczepów izolowanych:	
	przed leczeniem	po leczeniu
Azytromycyna	0,0019 (0,0002–0,0039)	0,001 (0,0004–0,0019)
Amoksycylina	0,5 (0,0156–2)	0,625 (0,5–0,625)
Cefuroksym	0,125 (0,0312–0,125)	0,125 (0,0312–0,125)
Ceftriakson	0,0625 (0,0078–0,0625)	0,0312 (0,0156–0,0312)
Doksycyklina	0,25 (0,125–0,25)	0,25 (0,125–0,25)

Tabela II
Wartości MIC i MBC szczepów *B. burgdorferi* sensu lato izolowanych od chorych

Antybiotyk	Średnie wartości MIC i MBC w µg/ml (zakresy) dla izolowanych szczepów*	
	MIC	MBC
Doksycyklina	0,25 (0,0625–0,5)	16,0 (2,0–32,0)
Erytromycyna	0,0312 (0,0079–0,0625)	4,0 (1,0–>4,0)
Klarytromycyna	0,0079 (0,001–0,0156)	1,0 (0,25–4,0)
Amoksycylina	2,0 (0,125–4,0)	> 16,0 (2,0–> 16,0)
Cefuroksym	0,25 (≤0,063–0,25)	> 8,0 (1,0–> 8,0)
Ceftriakson	0,0625 (0,0156–0,125)	4,0(0,25–4,0)

* zbadano 18 szczepów, w tym: 10 szczepów *B. spielmanii*, 2 szczepy *B. burgdorferi* sensu stricto, 3 szczepy *B. afzelii* i 3 szczepy *B. garinii* [14].

mieściły się one w zakresach przyjętych dla szczepów wrażliwych. Wartości MIC dla amoksycyliny, doksycykliny, ceftriaksonu i cefuroksymu, a więc podstawo-

wych antybiotyków stosowanych w leczeniu różnych stadiów boreliozy z Lyme, były podobne do oznaczeń uzyskanych w innych laboratoriach [7, 8, 11]. Natomiast w tych samych badaniach (Tabela II), wartości MIC dla azytromycyny (0,027–0,22 mg/ml) były wyższe w porównaniu z MIC dla innych szczepów, badanych w Europie oraz w Stanach Zjednoczonych [11, 14]. Obserwowano także różnice wrażliwości na antybiotyki izolatów należących do różnych genogatunków. Wartości MIC i MBC amoksycyliny były znamienne wyższe dla szczepów *B. afzelii* niż dla *B. garinii* [7]. Generalnie stwierdzono, że szczepy *B. garinii* wykazują większą wrażliwość na wiele antybiotyków w porównaniu ze szczepami *B. afzelii*.

Nowe grupy fluorochinolonów (klasa III i IV) są szeroko stosowane u dorosłych w leczeniu wielu zakażeń jako alternatywa dla antybiotyków β-laktamowych. Niektóre fluorochinolony o szerokim spektrum działania, mogą być skuteczne w leczeniu niektórych postaci boreliozy z Lyme, jak rumień wędrujący czy *Lyme arthritis*. Różnica zakresu wartości MIC pomiędzy pefloksacyną i gemifloksacyną jest niebagatelna i wynosi odpowiednio 4–64 i 0,03–0,25 µg/ml (Tabela III). Podobne różnice obserwowano w wartościach MBC poszczególnych klas tych antybiotyków dla wielu szczepów *B. burgdorferi* sensu stricto [13].

Penicilina G i ceftriakson są aktywne przeciw krętkom *B. burgdorferi* hodowanym w podłożu aksenicznym, natomiast tracą swoją skuteczność, gdy krętki są hodowane w linii komórkowej Vero [3]. Wskazuje to, że hodowla krętków w linii komórkowej chroni je przed działaniem antybiotyków. Nie jest to jednak cecha

Tabela III
Aktywność fluorochinolonów *in vitro* przeciw szczepom *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Klasa	Nazwa	Średnie wartości MIC i MBC w µg/ml (zakresy)*	
		MIC	MBC
I	Norfloksacyna	8,0 (1,0–16,0)	>64,0 (8,0–> 64,0)
	Pefloksacyna	32,0 (4,0–64,0)	>64,0 (16,0–> 64,0)
II	Fleroksacyna	> 16,0 (4,0–> 16,0)	>16,0 (16,0–> 16,0)
	Ofloksacyna	8,0 (1,0–16,0)	>16,0 (8,0–> 16,0)
	Ciprofloksacyna	2,0 (0,25–8,0)	>16,0 (4,0–> 16,0)
III	Lewofloksacyna	4,0 (0,5–8,0)	16,0 (4,0–> 16,0)
	Sparfloksacyna	1,0 (0,06–8,0)	8,0 (2,0–> 16,0)
	Grepafloksacyna	0,5 (0,06–2,0)	8,0 (2,0–> 16,0)
IV	Gatifloksacyna	1,0 (0,25–2,0)	16,0 (4,0–16,0)
	Trowafloksacyna	1,0 (0,25–2,0)	16,0 (1,0–16,0)
	Moksyfloksacyna	2,0 (0,25–2,0)	16,0 (4,0–16,0)
	Clinafloksacyna	1,0 (0,25–4,0)	8,0 (1,0–16,0)
	Sitafloksacyna	0,50 (0,06–4,0)	8,0 (1,0–16,0)
	Gemifloksacyna	0,12 (0,03–0,25)	4,0 (0,25–16,0)

* zbadano 11 szczepów izolowanych na terenie Stanów Zjednoczonych, Niemiec i Szwajcarii [13].

dotycząca wszystkich antybiotyków, bowiem liczba krętków rosnących w linii komórkowej w obecności erytromycyny i doksycykliny ulegała znacznej redukcji [3].

Krętki wnikając do komórek eukariotycznych, namnażają się w nich i przeżywają [4, 5]. Jeżeli zatem do hodowli dodawane są antybiotyki słabo przenikające do tkanek i komórek gospodarza, to nie będą one skutecznie niszczyły krętków, gdyż ich stężenie wewnątrz komórek będzie zbyt małe. Do tej grupy należą penicylina i ceftriakson. Czynniki decydującymi o zdolności przenikania do tkanek jest: lipofilowość cząsteczki antybiotyku, stopień wiązania z białkami krwi, pH w miejscu docelowym i wiele innych. Do antybiotyków łatwo przenikających do komórek gospodarza należą erytromycyna i doksycyklina.

Chociaż leczenie boreliozy z Lyme w większości przypadków jest skuteczne, szczególnie jeżeli zostanie zastosowane we wczesnej fazie choroby, pewna grupa chorych, jak już wcześniej wspomniano, cierpi z powodu zespołu po-boreliozowego, występującego po leczeniu boreliozy z Lyme. Mechanizm tego zjawiska jest niejasny. Niektórzy badacze sugerują, że część populacji krętków *B. burgdorferi* nabiera oporności na podawane antybiotyki. Nie ma jednak, jak dotychczas jednoznacznych wyników badań. Ostatnio wykazano, możliwość izolacji DNA *B. burgdorferi* od pacjenta z objawami zespołu po-boreliozowego, wskazującego na utrzymywanie się krętków w organizmie gospodarza, mimo podawania antybiotyków. Podobnie, w badaniach prowadzonych na myszach, obserwowano ponowne wykrycie DNA *B. burgdorferi* po 12 miesiącach od podawania antybiotyków. W tkankach tych myszy, mimo niemożności izolacji krętków, wykazano transkrypcję RNA wielu genów tych krętków [7].

Wyniki te sugerują, że *B. burgdorferi* stale może utrzymywać się w organizmie zakażonego człowieka mimo antybiotykoterapii. Wskazuje to, że obecnie stosowany schemat leczenia boreliozy z Lyme nie eliminuje całkowicie opornych szczepów *B. burgdorferi* (*B. burgdorferi* persists), chociaż z drugiej strony, nie ma dowodów wskazujących na obecność żywych bakterii w organizmie tych chorych.

Z biblioteki leków amerykańskiej Agencji Żywności i Leków (FDA – Food and Drug Administration), zawierającej 1524 substancje działające na stacjonarną fazę *B. burgdorferi*, wybrano 27 leków mających znacznie wyższą aktywność niż najważniejsze antybiotyki stosowane w leczeniu boreliozy z Lyme, jak doksycyklina i amoksycylina [6]. Zaobserwowano, że antybiotyki te są aktywne i działają bójczo tylko na krętki namnażające się w fazie logarytmicznego wzrostu, natomiast w fazie stacjonarnej mają niewielką aktywność. W fazie stacjonarnej krętki te tracą spiralną morfologię i przybierają kształt owalny bądź pałeczkowaty oraz tworzą agregaty komórek w formie mikrokolonii. Stwierdzono,

że w warunkach *in vitro* dautomycyna i daptomycyna są aktywne przeciw hodowiom *B. burgdorferi* w fazie stacjonarnej tworzącej mikrokolonie. Dodanie tych antybiotyków, obok doksycykliny i cefuroksymu, do hodowli *B. burgdorferi* o strukturze biofilmu, powoduje całkowitą jego eliminację [8]. Nie można osiągnąć tego efektu działając tylko doksycyklina, cefuroksymu i ceftriaksonem ponieważ jest to grupa antybiotyków działających na krętki tylko w młodych hodowlach, będących w logarytmicznej fazie wzrostu [7, 8].

4. Podsumowanie

Chociaż nastąpił znaczący postęp wiedzy na temat wrażliwości *in vitro* szczepów *B. burgdorferi* sensu lato nadal niewiele wiadomo na temat wzajemnego oddziaływania leków przeciwbakteryjnych i krętków. Nieznane są również mechanizmy, które te bakterie mogłyby wykorzystywać, aby uniknąć działania antybiotyku w warunkach *in vivo*. Obecnie istnieje potrzeba dalszych badań szczepów klinicznych, izolowanych od chorych po zakończeniu terapii, co pozwoliłoby wyjaśnić zagadnienia związane z „opornymi na leczenie” przypadkami boreliozy z Lyme. Zadanie to jest trudne do realizacji ponieważ wykrycie patogenu i izolacja szczepu z próbek materiału klinicznego – pochodzących ze zmian skórnych nie przekracza 40–70% przypadków, 20% w neuroboreliozie i mniej niż 1% w *Lyme arthritis* [1].

Jednak w świetle wzrastającej liczby zachorowań, a w konsekwencji rosnących kosztów leczenia boreliozy z Lyme, zagadnienie to staje się narastającym, ważnym problemem zdrowia publicznego.

5. Piśmiennictwo

1. Aguero-Rosenfeld M.E., Wang G., Swartz I., Wormer G.P.: Diagnosis of Lyme borreliosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 484–509 (2005)
2. Ates L., Hansen-Hübner C., Norris D.E., Richter D., Kraiczy P., Hunfeld K.-P.: Comparison of *in vitro* activities of tigecycline, doxycycline, and tetracycline against the spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Ticks Tick Borne Dis.* **1**, 30–34 (2010)
3. Brouqui P., Badiaga S., Raoult D.: Eucaryotic cells protect *Borrelia burgdorferi* from the action of penicillin and ceftriaxone but not from the action of doxycycline and erythromycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 1552–1554 (1996)
4. Chmielewski T., Tylewska-Wierzbanowska S.: Interaction between *Borrelia burgdorferi* and mouse fibroblasts. *Pol. J. Microbiol.* **59**, 157–160 (2010)
5. Comstock L.E., Thomas D.D.: Penetration of endothelial cell monolayers by *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* **57**, 1626–1628 (1989)
6. Feng J., Wang T., Shi W., Zhang S., Sullivan D., Auwaerter P.G., Zhang Y.: Identification of novel activity against *Borrelia burgdorferi* persisters using an FDA approved drug library. *Emerg. Microbes Infect.* **3**, e49 (2014)

7. Feng J., Auwaerter P.G., Zhang Y.: Drug combination against *Borrelia burgdorferi* persists in vitro: eradication achieved by using daptomycin, cefoperazone and doxycycline. *PLoS ONE*, **10**, e0117207 (2015)
8. Feng J., Zhang S., Shi W., Zhang Y.: Ceftriaxone pulse dosing fails to eradicate bio-like microcolony *B. burgdorferi* persists which are sterilized by daptomycin/doxycycline/cefuroxime without pulse dosing. *Front. Microbiol.* **7**, 1744 (2016)
9. Hunfeld K.-P., Kraiczy P., Wichelhaue T.A., Schäfer V., Brade V.: Colorimetric in vitro susceptibility testing of penicillins, cephalosporins, macrolides, streptogramins, tetracyclines, and aminoglycosides against *Borrelia burgdorferi* isolates. *Intern. J. Med. Microbiol.* **15**, 11–17 (2000)
10. Hunfeld K.-P., Brade V.: Antimicrobial susceptibility of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: what we know, what we don't know, and what we need to know. *Wien. Klin. Wochenschr.* **22**, 659–668 (2006)
11. Hunfeld K.-P., Ruzic-Subljic E., Norris D. E., Kraiczy P., Strle F.: In vitro susceptibility testing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates cultured from patients with erythema migrans before and after antimicrobial chemotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1294–1301 (2005)
12. Hunfeld K.-P., Ruzic-Subljic E., Norris D. E., Kraiczy P., Strle F.: Risk of culture-confirmed borrelial persistence in patients treated for erythema migrans and possible mechanisms of resistance. *Intern. J. Med. Microbiol.* **296** Suppl. **40**, 233–241 (2006)
13. Kraiczy P., Weigand J., Wichelhaus T. A., Heising P., Backes H., Schafer V., Acker G., Brade V., Hunfeld K.-P.: In vitro activities of fluoroquinolones against the spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2486–2494 (2001)
14. Morgenstern K., Bajler G., Norris D. E., Kraiczy P., Hanssen-Hübner C., Hunfeld K.-P.: In vitro susceptibility of *Borrelia spielmanii* to microbial agents commonly used for treatment of Lyme disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 1281–1284 (2009)
15. Obonyo M., Munderloch U. G., Fingerle V., Wilske B., Kurtti T.J.: *Borrelia burgdorferi* in tick cell culture modulates expression of outer surface proteins A and C in response to temperature. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 2137–2141 (1999)
16. Tylewska-Wierzbanowska S., Chmielewski T.: The isolation of *Borrelia burgdorferi* spirochetes from clinical material in cell line cultures. *Zbl. Bakt.* **286**, 363–370 (1997)
17. Veinovic G., Cerar T., Strle F., Lotric-Furlan S., Maraspin V., Cimperman J., Ruzic-Subljic E.: In vitro susceptibility of European human *Borrelia burgdorferi* sensu stricto strains to antimicrobial agents. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **41**, 288–291 (2013)