

MIKROKALORIMETRIE ZUR AKTIVITÄTSBESTIMMUNG VON CHEMOTHERAPEUTIKA

E. Semenitz

Hygiene Institut der Univ. Innsbruck, A-6020  
Innsbruck, Fritz Preglstraße 2, Austria

Microcalorimetry is a method which gives us a new insight into the metabolic properties of bacterial organisms and the influences of different antimicrobial substances.

The microcalorimeter measures those minimal temperature changes which are produced by the multiplication of bacteria or their decreased growth rate after the addition of the antibiotic. The kinetics of temperature production are not expressed in a linear fashion but resemble - according to the diauxic principle - a biphasic pattern.

The methodology and technical supply is described.

In this paper we describe the influences of different concentrations of Cefuroxim on the growth and killing pattern of staphylococci as an expression of their kinetic temperature curve.

Furthermore we are able to show the mode of inactivation of  $\beta$ -lactam antibiotics by  $\beta$ -lactamases.

Antimicrobial agents with influences on the protein metabolism of an organism (e.g. Erythromycin, Chloramphenicol) exhibit a different kinetic pattern of the temperature curve of staphylococci than substances with their mode of action on the cell wall synthesis.

### Einleitung:

Die antibakterielle Aktivität von Chemotherapeutika wird mit Untersuchungsmethoden bestimmt, welche die minimale Konzentration des Chemotherapeutikums ermitteln, die eine Wachstumshemmung auf die Testkeime ausübt oder es werden Testmethoden angewendet, welche die Abnahme an lebenden Individuen oder eine Veränderung der Stoffwechselleistung der Keime (Respirometrie) nach Zugabe des Chemotherapeutikums zum Testnährmedium erfassen.

Vermehren sich Bakterien in einem geeigneten Nährmedium, wird durch die damit verbundenen Stoffwechselleistungen Wärme produziert, die mit einem Mikrokalorimeter gemessen und als Wärme-Zeitkurve dokumentiert werden kann.

Da Chemotherapeutika den Bakterienstoffwechsel beeinflussen, ist es daher möglich diesen Effekt, der konzentrationsabhängig ist, in seinem zeitlichen Ablauf mit dem mikrokalorimetrischen Untersuchungsverfahren graphisch darzustellen.

Dieses Verfahren zur Testung der antibakteriellen Aktivität von Chemotherapeutika wird noch kaum verwendet, daher wird die Versuchsanordnung und die Aussagekraft dieser Testmethode dargelegt.

### Versuchsanordnung:

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir das Mikrokalorimeter der Firma LKB Gerät 2107/210 (Flow System). Der Meßbereich des Gerätes während unserer Versuche war auf 0-30 mV eingestellt. Die Versuchsdurchführung ist auf Fig.1 skizziert.

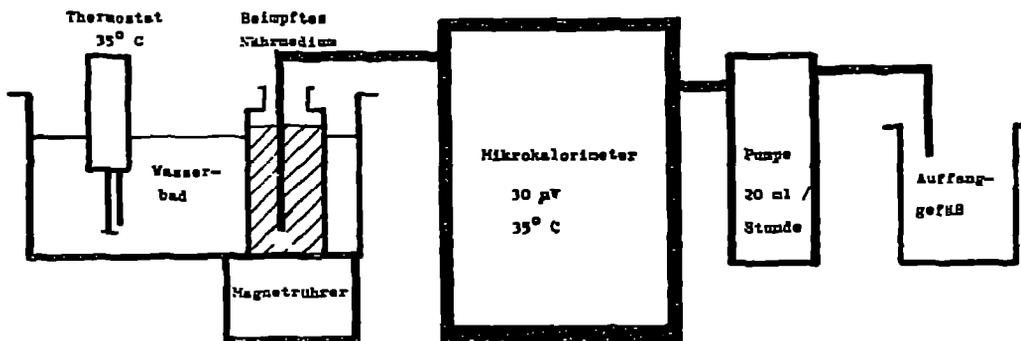


Fig. 1 Schematische Darstellung der Versuchsanordnung.

500 ml Nährmedium - bei unseren Versuchen Columbia Bouillon + 0,2 % Tween 80 wurden in einem Kolben im Wasserbad bei 35 Grad C bebrütet und mit dem Teststamm, der vorher 12 Stunden in 5 ml des-selben Nährmediums kultiviert wurde, beimpft. Mit einer Schlauch-pumpe Leistung 20 ml/Stunde wurde dann dieses beimpfte Nährmedium in dem die Keime sich nun vermehrten durch das Mikrokalorimeter gepumpt. Die Ausgangskeimzahl betrug ca. 1,000.000 Keime/ml. Diese hohe Keimzahl war notwendig, da nur ab dieser eine mikrokalorime-trisch meßbare Aktivität bei der Einstellung 0-30 mV zu beobachten war. Die Einstellung des Mikrokalorimeters auf diesen Meßbereich ergab sich, da nur bei dieser, die von den Bakterien erzeugte Mi-krokalorimetrie-kurve mit dem Schreibgerät während des ganzen Ver-suches ohne Umstellung auf der vorgegebenen Papierbreite erfassbar war. Die Aufheizung der Meßzellen des Mikrokalorimeters erfolgte auf 35 Grad C. Während der Log - Phase des Anwachsens der Bakterien wurde das Chemotherapeutikum dem Nährmedium zugegeben und der Zeit-punkt ist auf den Mikrokalorimetrie-kurven jeweils markiert (Pfeil)

### Ergebnisse:

Wir fanden, daß die verschiedenen Keime typische Mikrokalorime-triekurven beim Anwachsen derselben in Columbia Bouillon ergaben. Fig.2 zeigt die Kurve des Staphylococcus aureus Stammes 13.665 und des Escherichia coli Stammes 3.579.

Das Kurvenbild dieser beiden Stämme ist deutlich verschieden. Die Zwei- bzw. Mehrgipfligkeit wird als Ausdruck der Diauxie aufgefaßt, d.h. daß sich die Mikrokalorimetrie-kurve entsprechend dem Nähr-stoffverbrauch verändert.

Wir wissen, daß von E. coli aus einem Gemisch von Glukose und Sor-bit zuerst Glukose genutzt und dann erst Sorbit als Energiequelle verbraucht wird (Diauxie) (1).

Bei den gezeigten Mikrokalorimetrie-kurven sind auf der Abszisse die Stunden, auf der Ordinate die Eichkurven des Mikrokalori-meters in mA markiert.

Nach den Ergebnissen früherer Untersuchungen (2,3,4,5,6,7,8) ist es mit dem mikrokalorimetrischen Untersuchungsverfahren möglich, die durch Chemotherapeutika gesetzten Veränderungen in der Wachs-tumskinetik der Bakterien graphisch darzustellen.

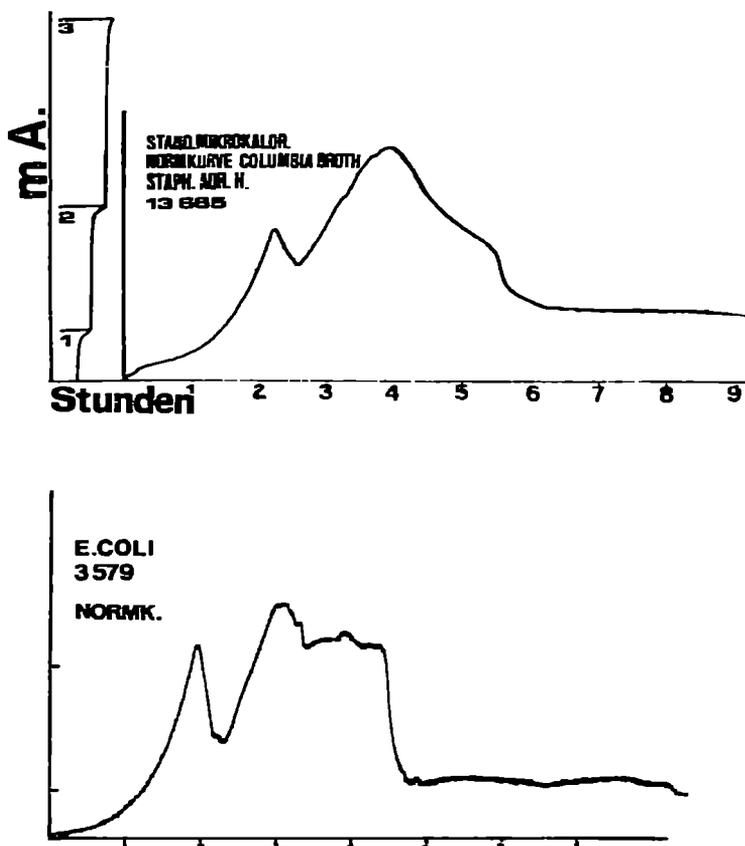


Fig. 2 Mikrokalorimetrie Kurven der Bakterienstämme:  
Staphylococcus aur. häm. 13.665 u. E. coli 3.579

Dies wird beispielsweise in den folgenden Abbildungen der Fig. 3 belegt, welche die Veränderungen der Staphylococcus aureus Mikrokalorimetrie Kurve des Stammes 13.665 nach Zugabe von Cefuroxim zum Nährmedium, in dem sich der Keim vermehrt, zeigt.

Cefuroxim 0,2  $\mu\text{g/ml}$  Nährmedium verändert die Mikrokalorimetrie Kurve nur sehr geringfügig im Vergleich zur Normkurve. Hingegen bewirken 0,6  $\mu\text{g/ml}$  Nährmedium bereits eine sehr deutliche Abflachung des zweiten Aktivitätsgipfels. Diese Art der Beeinflussung verstärkt sich bei der Zugabe der folgenden Dosierungen von 1, 2.5, 5 bzw. 10  $\mu\text{g}$  Cefuroxim/ml Nährmedium.

# 13665 CEFUROXIM

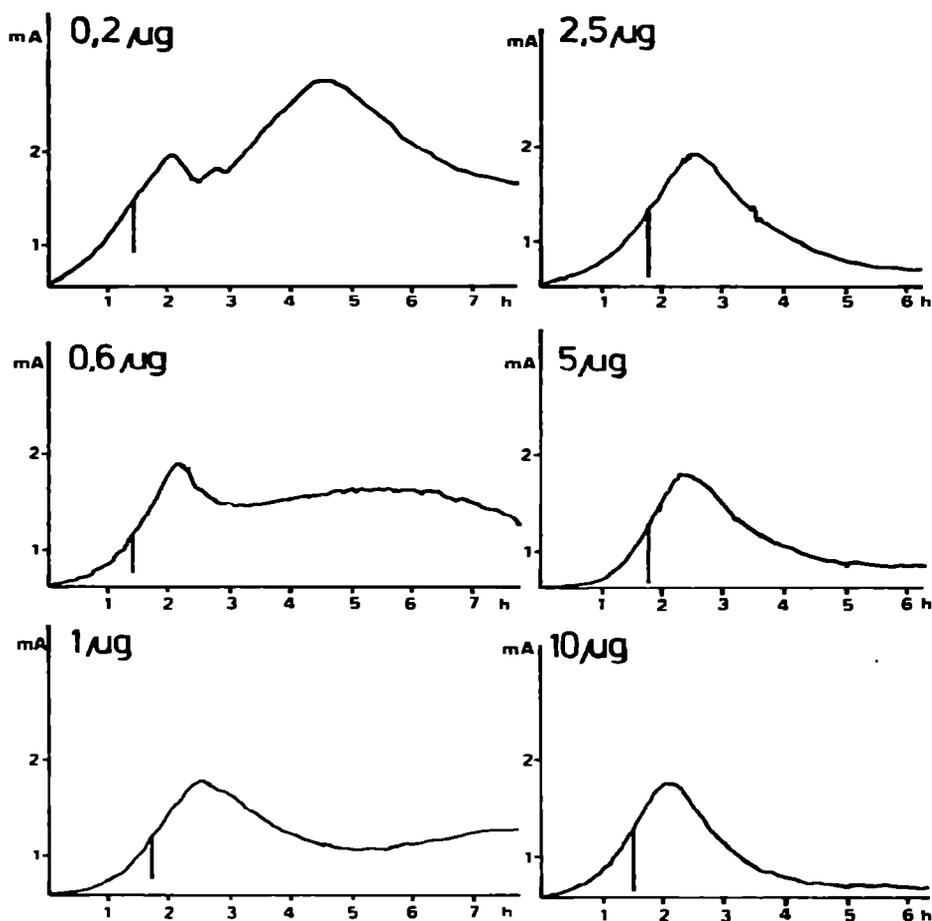


Fig.3 Veränderungen der Mikrokalorimetrie kurven des Staph.aur.häm.Stammes 13.665 nach Zugabe (Markierung) von 0.2, 0.6, 1, 2.5, 5, und 10 µg Cefuroxim. Vergleiche Normkurve Fig.1.

Weiters ermöglicht das Untersuchungsverfahren der Mikrokalorimetrie bei Substanzen welche durch Beta-Laktamasen zerstört werden den Zeitpunkt zu erfassen, bei dem die Hemmwirkung der Substanz beendet ist, da der Beta-Laktamring des Chemotherapeutikums

gespalten wurde und dadurch eine Inaktivierung der biologischen Aktivität erfolgte.

Dies veranschaulichen die nächsten Abbildungen (Fig. 4). Nach Zusatz von 20 Eh Na-Penicillin G zum Nährmedium wird das Wachstum des *Staphylococcus aureus* Stammes 13.665 so lange gehemmt bis durch die gebildeten Beta-Laktamasen dieses Staphylokokken Stammes das Penicillin Molekül zerstört wurde.

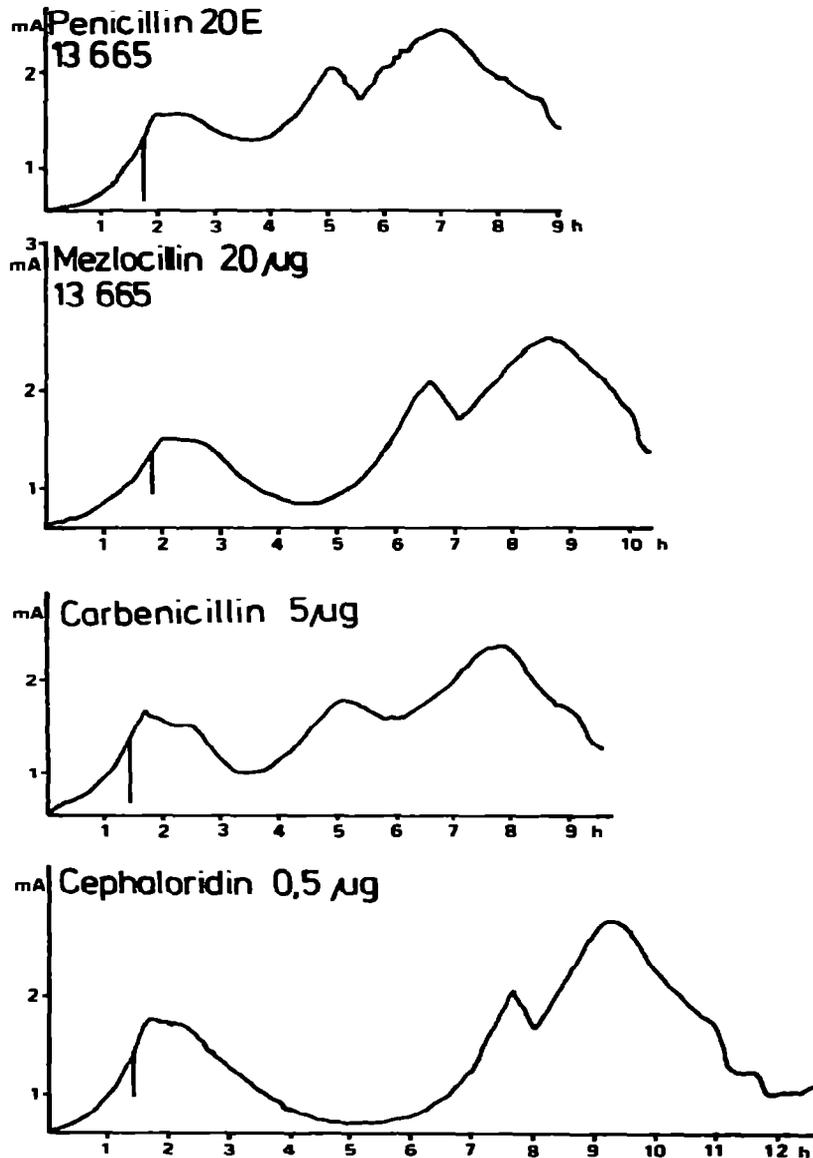


Fig. 4 Mikrokalorimetrie kurven des *Staph.aur.häm.* Stammes 13.665 nach Zugabe (Markierung) von Penicillin 20 Eh, Mezlocillin 20 µg, Carbenicillin 5 µg und Cephaloridin 0.5 µg.

In der Folge entwickelte sich dann die Mikrokalorimetriekurve entsprechend der Normkurve. Als weitere Beispiele werden die Mikrokalorimetriekurven des Stammes 13.665 nach Zusatz von 20  $\mu\text{g}$  Mezlocillin, 5  $\mu\text{g}$  Carbenicillin und 0,5  $\mu\text{g}$  Cephaloridin gezeigt. Gleich wie Penicillin werden auch Mezlocillin, Carbenicillin und Cephaloridin von den Beta-Lactamasen des Stammes 13.665 zerstört und gleich wie früher entwickelt sich nach der Wachstumshemmung wieder die Staphylokokken Normkurve nach kürzerer oder längerer Zeit.

Weiters fanden wir, daß Substanzen, die auf den Proteinstoffwechsel der Bakterien hemmend einwirken die mikrokalorimetrische Aktivität dieser Keime anders beeinflussen als Chemotherapeutika, welche die Zellwand zerstören.

Als Beispiel hierfür werden Mikrokalorimetriekurven des Staphylococcus aureus Stammes 13.665 nach Zusatz von Chloramphenicol bzw. Erythromycin (Proteinstoffwechselhemmer) und zum Vergleich die Kurven nach Zusatz von Oxacillin bzw. HR 756\*ein Cephalosporin, welche die Zellwand der Bakterien angreifen, dargestellt.

Es wurden jeweils gleich wirksame Konzentrationen gewählt, bei

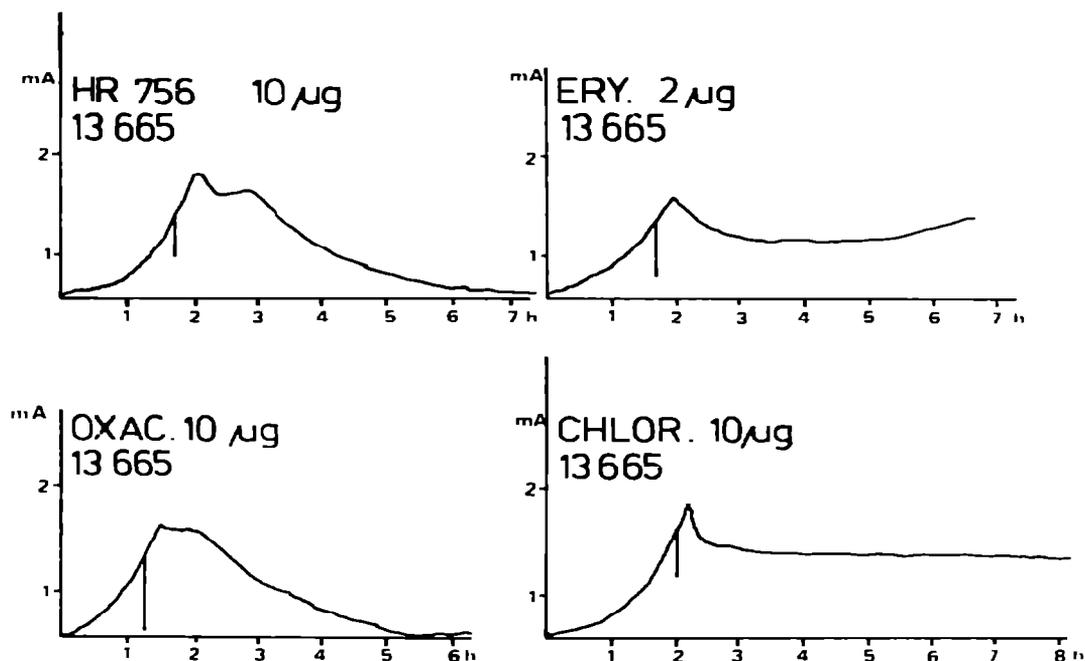


Fig.5 Mikrokalorimetriekurven des Staph.aur.häm.Stammes 13.665 nach Zugabe (Markierung) von HR 756 = Cefotaxim 10  $\mu\text{g}$ , Oxacillin 10  $\mu\text{g}$ , Erythromycin 2  $\mu\text{g}$  und 10  $\mu\text{g}$  Chloramphenicol.

denen eine Keimvermehrung nicht mehr erfolgt. (Fig. 5)

Bei den Chemotherapeutika, die die Zellwand zerstören kommt es angedeutet zu einer zweigipfeligen oder wie bei Cefuroxim und anderen Cephalosporinen zu einem abgerundeten über fast eine Stunde gleichbleibenden Aktivitätsgipfel. Hingegen zeigen Proteinsynthesehemmer sehr rasch nach Zugabe des Chemotherapeutikums einen steilen Abfall der Aktivität. Dieses Phänomen war bis jetzt bei allen geprüften Substanzen dieser beiden Kollektive festzustellen.

Nach den Ergebnissen der von uns durchgeführten mikrokalorimetrischen Untersuchungen eignet sich dieses Verfahren die minimale Konzentration des Chemotherapeutikums zu ermitteln, welche in der Lage ist in den Zellstoffwechsel einzugreifen ohne daß eine totale Wachstumshemmung erfolgt. Weiters kann der Zeitpunkt, ab dem die Wirksamkeit einer Substanz inaktiviert ist graphisch erfaßt werden.

Zusätzlich ist auf Grund der Veränderungen der Mikrokalorimetrie-kurve durch das zugesetzte Chemotherapeutikum auch ein Hinweis auf den Angriffspunkt möglich. Ein Umstand der bei der Testung von Kombinationen der Chemotherapeutika auf ihre antibakterielle Aktivität von Bedeutung ist, da es mit dieser Methode ermöglicht wird Rückschlüsse auf die Art der Wirkung, ob diese eine Eigenständige ist, oder ob die gesetzten Veränderungen der mikrokalorimetrischen Aktivität der einen oder anderen Substanz entsprechen, zu ziehen (8).

#### Literaturverzeichnis:

- Wildführ G., Wildführ W.: Medizinische Mikrobiologie Immunologie und Epidemiologie. Georg Thieme Vlg. Leipzig 1976.
- Semenitz E., Tiefenbrunner F.: Mikrokalorimetrische Untersuchungen zur Bestimmung der antibakteriellen Aktivität von Chemotherapeutika. Arzneim.Forsch./Drug Res. 27 2247 - 2251 (1977)
- Semenitz E., Tiefenbrunner F.: Characterization of the mode of action of tetracyclines using microcalorimetry Application of Calorimetry in Life Sciences Walter de Gruyter Vlg. Berlin - New York 1977

- Semenitz, E.: The antibacterial activity of oleandomycin and erythromycin. A comparative investigation using microcalorimetry and MIC determination. J. Antim. Chemoth. 4, 455 (1978)
- Semenitz, E.: Über die antibakterielle Wirksamkeit von Diphenhydramin. Wien. klin. Wochenschr. 90, 710-714 (1978)
- Semenitz, E.: Mikrokolorimetrische Untersuchungen zur Untersuchung der antibakteriellen Wirksamkeit von Chemotherapeutika. Immun. u. Infektion 6, 260-266 (1978)
- Semenitz, E.: Mikrokolorimetrische Untersuchungen zur Charakterisierung der antibakteriellen Aktivität von Cefoxitin: Infektion 7 (1979) Suppl.1 68-70
- Semenitz, E.: Mikrokolorimetrische Testung der antibakteriellen Aktivität von Doxycyclin und Gentamycin und deren Kombination Zbl.Bakt.Hyg., I. Abt.Orig. A 243, 372-380 (1979)