



Mathematische Modelle zur Analyse von Antibiotika-Pulsexperimenten einer 3-Spezies Mischkultur

C. Riedele¹, J. K. Schmidt¹, L. Geisler², U. Reichl^{1,2}

¹ Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Lehrstuhl für Bioprozesstechnik, Universitätsplatz 2, 39106 Magdeburg
² Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme, Sandtorstraße 1, 39106 Magdeburg



Hintergrund und Motivation

Bei Patienten mit Cystischer Fibrose (CF) führt ein Gendefekt zu einer persistenten Infektion mit unterschiedlichen bakteriellen Keimen. Aus klinischen Untersuchungen kennt man den Effekt, dass die Antibiotikabehandlung von *Staphylococcus aureus*, ein Keim, der schon in den ersten Lebensjahren der Patienten in der Lunge vorkommt, zu einer früheren Infektion des stärker pathogenen Keims *Pseudomonas aeruginosa* führt [1].

Um derartige Interaktionen verschiedener Bakterienspezies untersuchen zu können, wurde in vorangegangenen Studien ein Chemostat-Modell der klinisch relevanten Mischkultur bestehend aus *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Burkholderia cepacia* etabliert [2]. Die Quantifizierung der speziespezifischen Keimzahl erfolgt über eine eigens für dieses System validierte t-RFLP Methode [2]. In bisherigen Versuchsergebnissen konnte eine Koexistenz von mindestens 2 Mikroorganismen gezeigt werden [2].

Hier präsentieren wir erste Ergebnisse von Antibiotika-Pulsexperimenten einer Mischkultur sowie ein Modell zur Beschreibung der Wachstums- und Abtötungscharakteristik. Das hier gezeigte Modell basiert auf einem logistischen Modellansatz, wie er oft als Grundlage zur Beschreibung von so genannten Time-Kill-Kurven verwendet wird [3, 4]. Durch mathematische Beschreibung von Reinkultur- und Mischkultursergebnissen im Vergleich, beabsichtigen wir Interaktionen der einzelnen Bakterienspezies aufzudecken. Nach unserem Kenntnisstand wurde die Wirkung von Antibiotika in Mischkultur bisher kaum untersucht.

Ergebnisse

Kontrollexperiment

Logistisches Wachstumsmodell

$$\frac{dN_i}{dt} = \mu_i \cdot N_i \cdot \left(\frac{N_{max,i} - N_i}{N_{max,i}} \right)$$

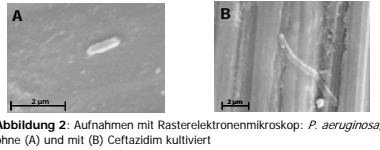


Abbildung 2: Aufnahmen mit Rasterelektronenmikroskop: *P. aeruginosa*, ohne (A) und mit (B) Ceftazidim kultiviert

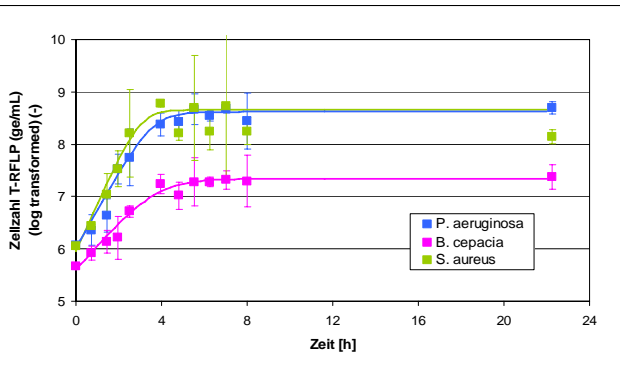


Abbildung 3: Mischkultur, bestehend aus *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus*. Batch-Fermentation im Rührreaktor unter Standardbedingungen (siehe oben). Zellzahlbestimmung mit quantitativer t-RFLP-Methode [2] (siehe oben). (A) Kontrollexperiment (ohne Ceftazidim): alle 3 Keime zeigen exponentielles Wachstum und Sättigungsphase; (B) Antibiotika-Pulsexperiment: Ceftazidimpuls (35 µg/mL) in exponentieller Wachstumsphase: Abtöten von *P. aeruginosa* nach Time-lag, kein messbarer Effekt auf die beiden anderen Mikroorganismen. Fehlerbalken: Standardabweichung einer Doppelbestimmung.

Tabelle 1: optimierte Parameterwerte des Kontrollexperimentes (fminsearch, Matlab® 7.4)

	μ_i [h ⁻¹]	$N_{max,i}$ × 10 ⁸ [ge·mL ⁻¹]	N_0 × 10 ⁵ [ge·mL ⁻¹]	S_r [-]
<i>P. aeruginosa</i>	1,67	4,18	10,0	0,294
<i>B. cepacia</i>	1,08	0,22	4,0	0,237
<i>S. aureus</i>	2,08	4,57	9,1	0,492

^a Parameterwert aus Kontroll-experiment übernommen
^b keine Parameterbestimmung, da kein messbares Abtöten
^c Signifikant höhere Zellzahl (vgl. Tab. 3 und 4)
^d Niedrigere Zellzahl (vgl. Tab. 3 und 4)

Experimentelle Methoden

Rührreaktor: DasGip fedbatch-pro® (DasGip, Deutschland)
 Arbeitsvolumen: $V_L = 200$ mL Begasung: $F = 0,5$ L·h⁻¹ (Luft)
 Rührer: $N = 300$ rpm Temperatur: $T = 37$ °C

Medium: definiertes Vollmedium

Antibiotikum: Ceftazidim (CAZ): Cephalosporin, bakterizid, unterschiedliche Empfindlichkeiten der 3 Keime (siehe Tabelle 4)

Speziespezifische Zellzahlquantifizierung: t-RFLP-Methode [2] (siehe Abbildung 1)

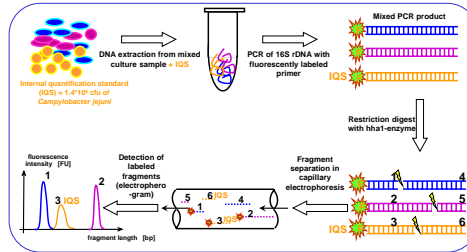


Abbildung 1: Prozessschema der quantitativen t-RFLP Methode (terminaler Restriktions-Fragment-längen-Polymorphismus). In Kombination mit Ceftazidim wurde die Methode noch nicht auf Zellzahlen [cfu/mL] aus Plattenausstrichen kalibriert und wird daher vorläufig in [ge/mL] genome equivalents angegeben.

Antibiotika-Pulsexperiment

Logistisches Wachstum + Abtötungsrate

$$\frac{dN_i}{dt} = \mu_i \cdot N_i \cdot \left(\frac{N_{max,i} - N_i}{N_{max,i}} \right) - k_{CAZ} \cdot N_i$$

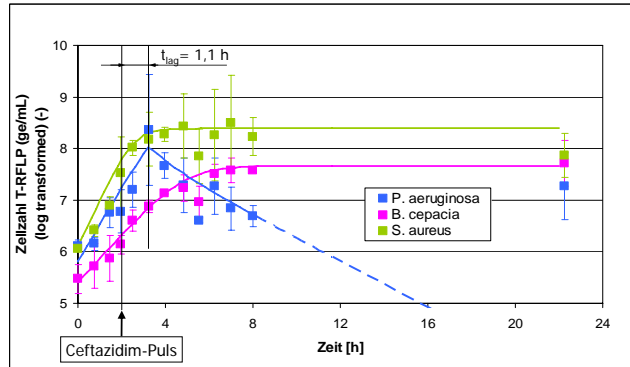


Tabelle 2: optimierte Parameterwerte des Pulsexperimentes (fminsearch, Matlab® 7.4)

	μ_i [h ⁻¹]	$N_{max,i}$ × 10 ⁸ [ge·mL ⁻¹]	N_0 × 10 ⁵ [ge·mL ⁻¹]	k_{CAZ} [h ⁻¹]	t_{lag} [h]	S_r [-]
<i>P. aeruginosa</i>	Kontrollexp. ^a	Kontrollexp. ^a	6,3	2,19	1,12	0,223
<i>B. cepacia</i>	Kontrollexp. ^a	0,45	2,5	- ^b	- ^b	0,205
<i>S. aureus</i>	Kontrollexp. ^a	2,10	15,6	- ^b	- ^b	0,457

Schlussfolgerungen - Ausblick

B. cepacia profitiert (erhöhtes $N_{max,B}$) vom Abtöten von *P. aeruginosa*.

Hypothese zum Mechanismus:

Ceftazidim tötet *P. aeruginosa* → unverbrauchte, freierwerdende (Zellyse) Substrate können von *B. cepacia* nicht von *S. aureus*, in zusätzliche Zellzahl (Genomäquivalente) umgewandelt werden. Dies ist möglich, da *B. cepacia* gegen die eingesetzte Antibiotikakonzentration relativ ($\approx 1 \times$ MHK) unempfindlich ist.

P. aeruginosa wurde durch Ceftazidim effektiv abgetötet (Time-lag $\approx 1,1$ h, Ceftazidimkonz. $\approx 18 \times$ MHK, siehe Tabelle 4). Hinweise auf weitere Wachstumsphase nach Antibiotikazugabe → vermutlich Resistenzbildung

Fazit:

- Speziesinteraktion beschränkt sich auf Substratkonkurrenz
- Die Mischkulturdynamik wird durch individuelle Speziesigenschaften bestimmt (Wachstumscharakteristik, Antibiotikaempfindlichkeit)

Offene Fragen

- Welchen Einfluss hat die Startzusammensetzung der Mischkultur auf Wachstum und die Reaktion auf einen Antibiotikakapsel?
- Welchen Einfluss hat die Antibiotikakonzentration? → weitere Experimente

Ausblick:

Weiterentwicklung der Modelle:

- Modellierung der 2. Wachstumsphase nach bestehenden Modellansätzen [5, 6] für das Aktivieren von Resistenzmechanismen
- Einbeziehung des speziespezifischen Substratverbrauchs → daraus Entwicklung eines Chemostat-Modell

Experimentell:

- Antibiotika-Pulsexperimente im Chemostat
- ermöglicht Beobachtung der Resistenzmechanismen anhand weiterer Wachstumsphasen
- ermöglicht pharmakokinetische und pharmacodynamische Untersuchungen

Tabelle 3: Zeichenerklärung

μ_i	[h ⁻¹]	Wachstumsrate (speziespezifisch)
k_{CAZ}	[h ⁻¹]	Sterberate durch Ceftazidim
N	[ge·mL ⁻¹]	Genomäquivalente (speziespezifisch)
$N_{max,i}$	[ge·mL ⁻¹]	max. Genomäquivalente (speziespezifisch)
S_r	[-]	Reststandardabweichung

Literatur:

- Ratjen F., Döring G.; Lancet (2003); 361: 681-689
- Schmidt J.K., et al.; Biotechnology and Bioengineering (2007); 96(4): 738-756
- Yano, et al.; Journal of Pharmaceutical Sciences (1998); 87 (10): 1177-1183
- Csajka, Verotta; Pharmacokinetic - Pharmacodynamic Modelling: History and Perspectives (2006); 33 (3): 227 - 279
- Treyaprasert, et al.; International Journal of Antimicrobials Agents (2007); 29: 263 - 270
- Chung, et al.; Antimicrobial Agents and Chemotherapy (2006); 50 (9): 2957 - 2965