



**ΕΘΝΙΚΟ & ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ**

**Ανίχνευση και μερικός χαρακτηρισμός ενδοτοξινών σε  
βακτήρια που ευδοκιμούν σε χώρους φαρμακοβιομηχανίας**

**Φωτοπούλου Εμμανουέλα**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Επιβλέπουσα**

**Αμαλία Καραγκούνη-Κύρτσου**

**Ομότιμη Καθηγήτρια Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ**

**Αθήνα, 2020**

## Περιεχόμενα

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....                                                              | 7  |
| ABSTRACT .....                                                             | 9  |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 .....                                                           | 11 |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....                                                              | 11 |
| 1.1. Ενδοτοξίνες .....                                                     | 11 |
| 1.2. Δομή του κυτταρικού τοιχώματος των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων..... | 11 |
| 1.3. Δομή των λιποπολυσακχαριτών (LPS).....                                | 13 |
| 1.4. Συστατικά των λιποπολυσακχαριτών .....                                | 13 |
| 1.5. Μηχανισμός δράσης ενδοτοξινών. ....                                   | 17 |
| 1.5.1. Μηχανισμός αναγνώριση των LPS από τον υποδοχέα-4. ....              | 18 |
| 1.6. Μολυσματικότητα και τοξική δράση των ενδοτοξινών .....                | 19 |
| 1.7. Βιολογική δράση των λιποπολυσακχαριτών. ....                          | 20 |
| 1.8. Μελέτη της Μεθοδολογίας για την ανίχνευση ενδοτοξινών. ....           | 21 |
| 1.8.1. Μέθοδος Rabbit Pyrogen Test.....                                    | 21 |
| 1.8.2. Μέθοδος Limulus Amebocyte Lysate .....                              | 21 |
| 1.9. Παρουσία ενδοτοξινών στα βιολογικά παρασκευάσματα .....               | 25 |
| 1.9.1. Παρουσία ενδοτοξινών στις βιομηχανίες φαρμάκων. ....                | 25 |
| 1.9.2. Παρουσία ενδοτοξινών στον τομέα της Βιοτεχνολογίας .....            | 26 |
| 1.10. Μέθοδοι απομάκρυνσης ενδοτοξινών από βιολογικά παρασκευάσματα.....   | 27 |
| 1.10.1. Διαχωρισμός οργανικών και υδατικών φάσεων .....                    | 27 |
| 1.10.2. Υπερδιήθηση μορίων ενδοτοξίνης .....                               | 28 |
| 1.10.3. Χρωματογραφία .....                                                | 28 |
| 1.10.4. Διάσπαση ενδοτοξινών με τη χρήση απορρυπαντικών .....              | 28 |
| 1.11. Μέθοδοι εκχύλισης των λιποπολυσακχαριτών.....                        | 29 |

|                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.11.1. Μέθοδος εκχύλισης μέσω φαινόλης- νερού .....                                                | 29 |
| 1.11.2. Μέθοδος εκχύλισης με αιθέρα.....                                                            | 29 |
| 1.11.3. Μέθοδος εκχύλισης με EDTA.....                                                              | 29 |
| 1.11.4. Μέθοδος Μικρο-εκχύλισης (Micro-extraction).....                                             | 30 |
| 1.12. Παρουσία ενδοτοξινών στο νερό.....                                                            | 30 |
| 1.12.1. Μικροβιακή ποικιλότητα στο νερό που προορίζεται για τη χρήση σε φαρμακευτικά προϊόντα ..... | 31 |
| 1.13. Πυρετογόνος ουσίες από Gram θετικά βακτήρια .....                                             | 32 |
| 1.14. Σκοπός της παρούσας εργασίας.....                                                             | 33 |
| ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....                                                                                | 34 |
| 2.1. Δειγματοληψία. ....                                                                            | 34 |
| 2.1.1. Περιγραφή δειγμάτων.....                                                                     | 34 |
| 2.1.2. Δείγματα νερού.....                                                                          | 35 |
| 2.1.2.1. Τρόπος συλλογής δειγμάτων νερού.....                                                       | 35 |
| 2.1.2.2. Συχνότητα συλλογής δειγμάτων.....                                                          | 36 |
| 2.1.2.3. Περιγραφή της μονάδας νερό από όπου συλλέχθηκαν τα προς μελέτη δείγματα νερού.....         | 36 |
| 2.2. Επεξεργασία δειγμάτων.....                                                                     | 37 |
| 2.2.1. Απομόνωση βακτηρίων περιβαλλοντικών δειγμάτων.....                                           | 37 |
| 2.2.2. Απομόνωση βακτηρίων από τα δείγματα νερού.....                                               | 37 |
| 2.2.2.1. Προσδιορισμός του πληθυσμού των μικροοργανισμών σε δείγματα νερού. ....                    | 38 |
| 2.3. Θρεπικά υποστρώματα .....                                                                      | 39 |
| 2.3.1. Tryptone Soya Agar (TSA) .....                                                               | 39 |
| 2.3.2. Luria Broth (LB).....                                                                        | 39 |
| 2.3.3. Nutrient Agar (NA) .....                                                                     | 39 |
| 2.3.4 R2A Agar.....                                                                                 | 39 |

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| 2.4. Χημικά και ρυθμιστικά διαλύματα.....                          | 40 |
| 2.4.1. Φωσφορικό Νάτριο- $\text{NaPO}_4$ (50mM) .....              | 40 |
| 2.4.2. Οξικό Νάτριο - $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ (5M)..... | 40 |
| 2.4.3. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (5Mm) .....          | 40 |
| 2.4.4. Χλωριούχο Μαγνήσιο - $\text{MgCl}_2$ (20mM).....            | 40 |
| 2.4.5. Tris-HCl (10Mm) .....                                       | 40 |
| 2.4.6. Phosphate-buffered saline (PBS).....                        | 40 |
| 2.4.7. Διάλυμα γλυκερόλης 30% (w/v) .....                          | 40 |
| 2.4.9. Διάλυμα λύσης βακτηριακών κυττάρων- Lysis buffer 25mM ..... | 40 |
| 2.4.10. Διάλυμα TAE (1x).....                                      | 41 |
| 2.4.11. Διάλυμα SDS (Sodium dodecyl sulfate) 10% .....             | 41 |
| 2.4.12. Διάλυμα οξικού καλίου 5M.....                              | 41 |
| 2.4.13. Διάλυμα Βρωμιούχου Αιθιδίου .....                          | 41 |
| 2.4.14. Υδατικό διάλυμα αιθανόλης 70%.....                         | 41 |
| 2.4.15. Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης .....                          | 41 |
| 2.4.16. Διάλυμα Κρυσταλλικού Ιωδίου (Crystal Violet).....          | 41 |
| 2.4.17. Διάλυμα Ιωδίου .....                                       | 41 |
| 2.4.18. Διάλυμα αιθανόλης 99% .....                                | 42 |
| 2.4.19. Διάλυμα Σαφρανίνης .....                                   | 42 |
| 2.4.20. Control Standard Endotoxin (CSE). .....                    | 42 |
| 2.4.21. LAL Reagent .....                                          | 42 |
| 2.4.22. LAL Reagent Water.....                                     | 42 |
| 2.5. Βιοχημικές δοκιμασίες, .....                                  | 42 |
| 2.5.1.1. Σχηματισμός ενδοσπορίων – «θερμικό σοκ» .....             | 43 |
| 2.5.1.2. Χρώση κατά Gram .....                                     | 43 |

|                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.6. Μέθοδος λύσης της κυτταρικής μεμβράνης με υπερήχους (Sonication). ....                                          | 43 |
| 2.7. LAL test gel –clot method. ....                                                                                 | 44 |
| 2.7.1. Ανασύσταση του μάρτυρα ενδοτοξίνης – CSE .....                                                                | 45 |
| 2.7.2 Ανασύσταση αντιδραστήριου LAL .....                                                                            | 46 |
| 2.8. Προετοιμασία δειγμάτων για την μέθοδο ανίχνευσης βακτηριακής ενδοτοξίνης. ....                                  | 47 |
| 2.9. Εκχύλιση και καθαρισμός των LPS. ....                                                                           | 48 |
| 2.9.1. Προετοιμασία των βακτηριακών καλλιεργειών για την εκχύλιση των LPS με τη μέθοδο ζεστής φαινόλης-νερού .....   | 48 |
| 2.9.1.1. Εκχύλιση LPS.....                                                                                           | 48 |
| 2.10. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE). ....                           | 51 |
| 2.10.1. Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με κολλοειδές διάλυμα Coomassie Brilliant Blue .....                        | 52 |
| 2.10.2. Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με διάλυμα νιτρικού αργύρου.....                                            | 53 |
| 2.11. Ταυτοποίηση βακτηρίων. ....                                                                                    | 54 |
| 2.11.1. Απομόνωση ολικού DNA από καθαρή καλλιέργεια βακτηρίου .....                                                  | 54 |
| 2.11.2. Ενίσχυση της αλληλουχίας 16S rRNA και ταυτοποίηση των προϊόντων. ....                                        | 55 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 .....                                                                                                     | 57 |
| ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....                                                                                                   | 57 |
| 3.1. Μελέτη του μικροβιακού φορτίου σε απολυμασμένους ή αποστειρωμένους χώρους της Βιομηχανίας Φαρμάκων. ....        | 57 |
| 3.2. Μελέτη του μικροβιακού πληθυσμού αφού έχει προηγηθεί διήθηση νερού.....                                         | 60 |
| 3.3. Βιοχημικός χαρακτηρισμός των απομονωμένων μικροοργανισμών.....                                                  | 62 |
| 3.4. Παρουσία ενδοτοξινών στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια - Limulus amebocyte lysate test. ....                      | 63 |
| 3.5. Παρουσία λιποπολυσακχαριτών στα απομονωμένα βακτήρια. ....                                                      | 64 |
| 3.5.1. Ανίχνευση της παρουσίας λιποπολυσακχαριτών με τη μέθοδο ζεστής φαινόλης νερού ( hot phenol-water method)..... | 64 |

|                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.5.1.1. Μελέτη της παρουσίας πρωτεϊνικών μολύνσεων με εφαρμογή της μεθόδου ηλεκροφόρησης σε πήκτωμα πολυακριλαμίδης και χρώση με Coomassie Brilliant Blue. .... | 65 |
| 3.5.1.2. Μελέτη ανίχνευσης των LPS με εφαρμογή της μεθόδου ηλεκροφόρησης σε πήκτωμα πολυακριλαμίδης και χρώση με νιτρικό άργυρο.....                             | 66 |
| 3.5.2. Παρουσία λιποπολυσακχαριτών με τη μέθοδο χλωροφορμίου – μεθανόλης.....                                                                                    | 67 |
| 3.5.2.1. Μελέτη της παρουσίας πρωτεϊνικών μολύνσεων με εφαρμογή της μεθόδου ηλεκροφόρησης σε πήκτωμα πολυακριλαμίδης και χρώση με Coomassie Brilliant Blue. .... | 70 |
| 3.5.2.2. Μελέτη ανίχνευσης των LPS με εφαρμογή της μεθόδου ηλεκροφόρησης σε πήκτωμα πολυακριλαμίδης και χρώση με νιτρικό άργυρο.....                             | 70 |
| 3.6. Μοριακή ταυτοποίηση των επιλεγμένων βακτηρίων. ....                                                                                                         | 71 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....                                                                                                                                                  | 73 |
| ΣΥΖΗΤΗΣΗ & ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....                                                                                                                                     | 73 |
| ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....                                                                                                                                         | 82 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....                                                                                                                                                | 83 |

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ενδοτοξίνες είναι το κύριο συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Συντίθενται από υδατάνθρακες, λιπαρά οξέα και φωσφορικά ιόντα. Οι ενδοτοξίνες είναι επίσης γνωστές και ως λιποπολυσακχαρίτες (Lipopolysaccharide-LPS), που, ανάμεσα στα διάφορα είδη και στελέχη μικροβίων, ποικίλουν ανάλογα με το είδος του των υδατανθράκων και λιπών από τις οποίες συντίθενται. Είναι σημαντικοί μολυσματικοί παράγοντες που βρίσκονται σε εμπορικά διαθέσιμες πρωτεΐνες ή βιολογικά δραστικές ουσίες. Στη βιομηχανία φαρμάκων είναι δυνατό να βρεθούν ενδοτοξίνες τόσο στη γραμμή παραγωγής των φαρμάκων όσο και στο τελικό προϊόν. Η ενδοτοξίνη προκαλεί μια ευρεία ποικιλία παθοφυσιολογικών επιδράσεων. Σε περίπτωση που το σώμα εκτίθεται σε LPS συστηματικά, μπορεί να εμφανιστούν πολλαπλές παθοφυσιολογικές αντιδράσεις, όπως πυρετός, σοκ ενδοτοξίνες, βλάβη ιστού και θάνατος.

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη και η προσαρμογή κατάλληλης μεθοδολογίας για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό ενδοτοξινών από αρνητικά κατά Gram βακτήρια στη γραμμή παραγωγής φαρμακευτικών προϊόντων.

Η επίτευξη του στόχου της Διπλωματικής Εργασίας, αρχικά πραγματοποιήθηκε με ανίχνευση των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων που μπορούν να αναπτυχθούν τόσο στη γραμμή παραγωγής φαρμάκων και απιονισμένου νερού χρησιμοποιώντας βιοχημικές μεθόδους. Έπειτα με τη χρήση υπερήχων πραγματοποιήθηκε λύση της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηριακών στελεχών και απελευθέρωση των LPS. Με τη μέθοδο Limulus Amebocyte Lysate (LAL)-gel clot έγινε η ανίχνευση των βακτηρίων με δυνατότητα απελευθέρωσης ενδοτοξίνης όπου τα βακτήρια αυτά ταυτοποιήθηκαν μοριακά μέσω ανάλυσης της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA. Ακολούθησαν δύο πρωτόκολλα εκχύλισης και καθαρισμού των LPS. Το πρώτο πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε αφορά τη μέθοδο εκχύλισης ζεστής φαινόλης-νερού και το δεύτερο τη μέθοδο χλωροφορμίου-μεθανόλης προκειμένου να γίνει η επιλογή αυτού που δίνει πιο καθαρά LPS χωρίς την παρουσία νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών στο τελικό προϊόν. Η καθαρότητα των εκχυλισθέντων LPS εκτιμήθηκε με χρώση νιτρικού αργύρου και χρώση με Coomassie Brilliant Blue ύστερα από SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση των πηκτωμάτων.

Τα αποτελέσματα της εργασίας έδειξαν ότι υπάρχει η δυνατότητα ανίχνευσης βακτηριακών στελεχών στη γραμμή παραγωγής φαρμάκων και απιονισμένου νερού, τα

οποία απελευθερώνουν ενδοτοξίνες ενώ πιο αποτελεσματική μέθοδος για την εκχύλιση και τον καθαρισμό των LPS αποδείχθηκε η μέθοδος ζεστής φαινόλης-νερού καθώς έδωσε LPS χωρίς πρωτεϊνικά κατάλοιπα. Τέλος φάνηκε η δυνατότητα ανίχνευσης πεπτιδογλυκάνης που απελευθερώνεται από θετικά κατά Gram βακτήρια μέσω της δοκιμασίας LAL-gel clot μεθόδου.

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** Ενδοτοξίνες, Limulus Amebocyte Lysate (LAL), Εκχύλιση και καθαρισμός, SDS-PAGE



## ABSTRACT

Endotoxins are the main component of the outer membrane of the Gram-negative bacteria. They are composed of carbohydrates, fatty acids and phosphate. Endotoxins, which are also known as Lipopolysaccharide (LPS), amongst all the different types and stems of microbes, can vary based on the type of carbohydrates and fatty acids from which are composed. They are the determining factor to the transmission of infections, through commercially available proteins or biologically effective substances. It is possible for the pharmaceuticals industry, for endotoxins to be found in the line of the production of the medicine, as well as the final product itself. An endotoxin can cause a series of patho-physiological reactions, such as fever, endotoxin shock, tissue damage, and death.

The aim of this research is the development and the adaptation of the proper methodology so as to detect and characterize the endotoxins of Gram-negative bacteria in the line of production of pharmaceuticals.

In order for the goal to be achieved, initially there was a discovery of Gram-negative bacteria in the line of the production, as well as in purified water, through biochemical methods. Consequently, through the use of ultrasounds, the dissolution of the cellular membrane of the bacterial stem and the release of LPS was achieved. Through the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) - gel clot method, it was possible to detect the bacteria that can release endotoxins then, by analyzing the 16S rRNA gene sequence, we proceeded to the cellular identification. After that, there were two extraction and purification protocols for the LPS that were followed. The first one is about the extraction of warm phenol-water and the second is about the chloroform-methanol method, so as to indicate the one with a clearer image of the LPS, without any nucleic acid or proteins present in the final product. The purity of the LPS was based on the nitrate solution staining and on the Coomassie Brilliant Blue staining, following a SDS-PAGE gel electrophorises.

The results of this project demonstrated that there is a possibility of detection of bacterial strains that can actively release endotoxins, in the line of the production of the pharmaceuticals and in purified water. The most effective approach for the extraction and purification of the LPS was proven to be the warm phenol-water method, which produced LPS without any protein residues. In conclusion, this project presented the possibility of

detection of Gram-negative bacteria that release peptidoglycan, through testing and eventually succeeding in the LAL-gel clot method.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Ενδοτοξίνες

Οι ενδοτοξίνες, που ονομάζονται επίσης λιποπολυσακχαρίτες (Lipopolysaccharide-LPS), είναι σημαντικοί μολυσματικοί παράγοντες που βρίσκονται σε εμπορικά διαθέσιμες πρωτεΐνες ή βιολογικά δραστικές ουσίες. Η παρουσία μικρών ποσοτήτων ενδοτοξίνης σε φαρμακευτικά αλλά και άλλα βιολογικά παρασκευάσματα, μπορεί να προκαλέσει στον οργανισμό του ξενιστή παρενέργειες, όπως πυρετό, τοξικό σοκ ακόμα και θάνατο. Λόγω αυτών των αντιδράσεων, είναι απαραίτητο να εντοπίζονται και να αφαιρούνται από φάρμακα, ενέσιμα σκευάσματα και άλλα βιολογικά και φαρμακευτικά προϊόντα.

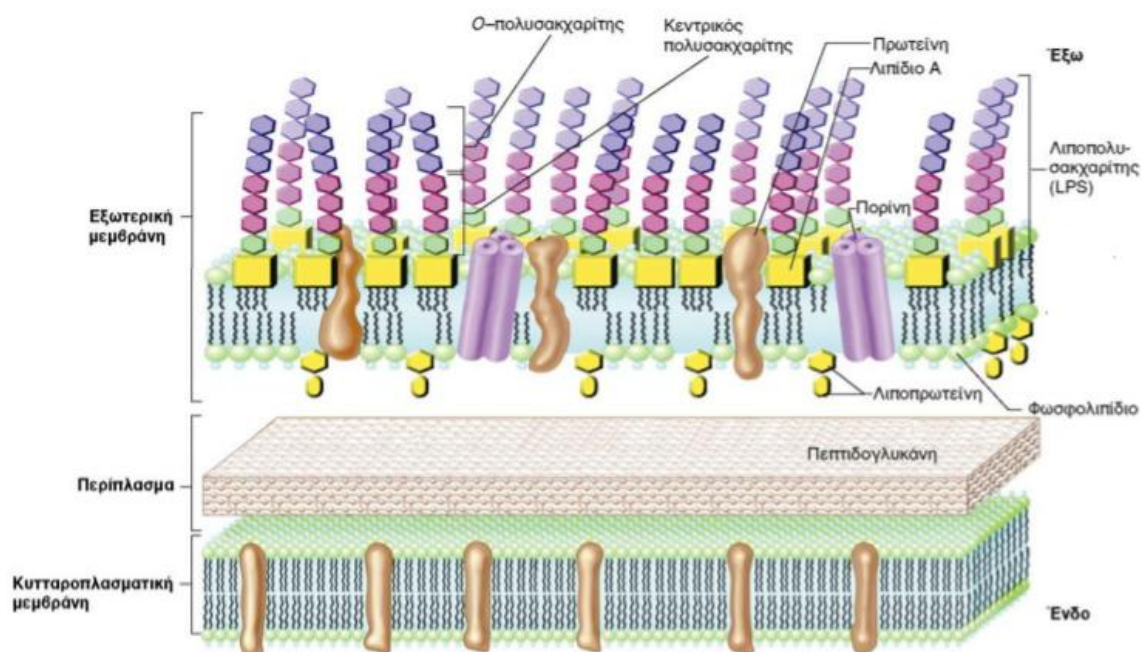
Οι ενδοτοξίνες είναι το κύριο συστατικό της εξωτερικής μεμβράνης των περισσότερων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων όπως η *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Neisseria* και *Vibrio*. Παρόλο που οι ενδοτοξίνες είναι συνενδεδιμένες με το κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου, έχουν τη δυνατότητα να απελευθερώνονται στο περιβάλλον. Η απελευθέρωσή τους δεν συμβαίνει μόνο κατά τον κυτταρικό θάνατο, αλλά και κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και διαίρεσης τους (Todar, 2012). Οι λιποπολυσακχαρίτες είναι σημαντικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και είναι ζωτικής σημασίας για την ακεραιότητα και την άμυνα των βακτηριακών κυττάρων όταν αυτά βρεθούν σε οξειδωτικό στρες (Holtje, 1998).

### 1.2. Δομή του κυτταρικού τοιχώματος των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων

Στα Gram αρνητικά βακτήρια, μια από τις σημαντικότερες συνιστώσες είναι οι ενδοτοξίνες, οι οποίες υπάρχουν στην εξωτερική μεμβράνη του τοιχώματος του κυττάρου. Το κυτταρικό τοίχωμα των Gram αρνητικών βακτηρίων συνιστάται από την εσωτερική μεμβράνη (Inner Membrane-IM), την πεπτιδογλυκάνη (murein) και την εξωτερική μεμβράνη (Outer Membrane-OM) (Raetz και Whitfield, 2001).

Η IM είναι διπλοστοιβάδα αμφωφοσφολιπιδίων (amphospholipids), είναι παρόμοια με την πλασματική μεμβράνη των ευκαριωτικών κυττάρων και είναι διαπερατή σε λιπόφιλες

ενώσεις. Ήδη από το 1892, ο Richard Pfeiffer first όρισε την ενδοτοξίνη ως τοξική ουσία, σταθερή στη θερμοκρασία που απελευθερώνεται κατά τη διάσπαση των βακτηριακών τοιχωμάτων (Beutler και Rietschel, 2003). Πολυάριθμες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες και περιφερειακές μεμβρανοπρωτεΐνες είναι κυρίως υπεύθυνες για τη μεταφορά, τη κυτταρική σηματοδότηση και τις μεταβολικές λειτουργίες του κυττάρου (Harald, 2001). Το περίπλασμα που βρίσκεται μεταξύ της εξωτερικής και της εσωτερικής μεμβράνης, περιέχει τα ένζυμα για την κατανομή των θρεπτικών ουσιών καθώς και τις πρωτεΐνες για τη διευκόλυνση της μεταφοράς των θρεπτικών συστατικών σε ολόκληρη τη IM. Η πεπτιδογλυκάνη, στον περιπλασματικό χώρο, αποτελείται από εναλλασσόμενα σάκχαρα (GlcNac) και ακετυλομουραμικό οξύ (acetylmuramic acid- MurNac) που συνδέονται με πεπτιδικούς δεσμούς και διατηρούν τη δομή των κυττάρων (Holtje, 1998). Η εξωτερική μεμβράνη υπάρχει μόνο στα Gram αρνητικά βακτήρια και ο ρόλος της είναι να διατηρεί και να προστατεύει τη δομή του κυττάρου. Τα LPS που υπάρχουν στην εξωτερική μεμβράνη, είναι διατεταγμένα σε μια συμπαγή δομή, ισχυρά συνδεδεμένα πάνω στη μεμβράνη (Sampath, 2015).



**Εικόνα 1.1.** Δομή του κυτταρικού τοιχώματος των Gram αρνητικών βακτηρίων.

### 1.3. Δομή των λιποπολυσακχαριτών (LPS)

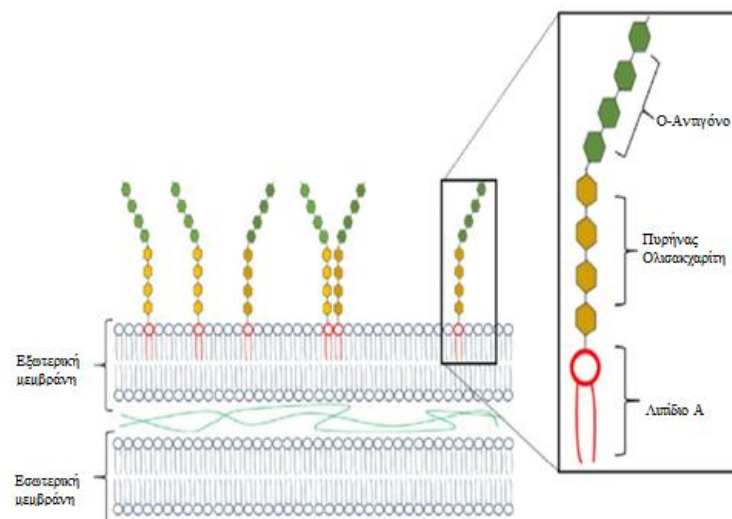
Ο όρος ενδοτοξίνη αναφέρεται σε σχετική με το κύτταρο τοξίνη που με βάση τις εσωτερικές ενώσεις της αναφέρεται και ως λιποπολυσακχαρίτης (LPS). Τα LPS αποτελούνται από δύο κύρια συστατικά, το υδρόφοβο λιπίδιο A και τον υδρόφιλο πολυσακχαρίτη (περιοχή – O). Αυτά τα δύο συστατικά είναι σημαντικά για τη βιολογική δράση της ενδοτοξίνης. Η τοξικότητα σχετίζεται με το λιπίδιο A και η ανοσογονικότητα συνδέεται με τα συστατικά του πολυσακχαρίτη (Εικόνα 1.2). Τα αντιγόνα (O – αντιγόνα) του κυτταρικού τοιχώματος των Gram αρνητικών βακτηρίων είναι και αυτά συστατικά των LPS. Τα LPS προκαλούν μια ποικιλία φλεγμονωδών αποκρίσεων και ως εκ τούτου μπορούν να αποτελέσουν μέρος της παθολογίας των βακτηριακών μολύνσεων από Gram αρνητικά βακτήρια (Gutsmann και συνεργάτες, 2005, Sampath, 2015).

Τα μόρια των LPS έχουν μοριακό βάρος  $> 100.000$  Dalton. Το τμήμα του λιπιδίου A του μορίου έχει αποδειχθεί ότι είναι υπεύθυνο για πολυάριθμες *in vivo* και *in vitro* επιδράσεις της ενδοτοξίνης. Τα LPS διεγείρουν τις ανοσολογικές αντιδράσεις (Yu και Kanost, 2004) και ενισχύουν τις κυτταρικές ανοσολογικές δράσεις (Foukas και συνεργάτες 1998, Soldatos και συνεργάτες, 2003). Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι η εμπορική βακτηριακή ενδοτοξίνη περιέχει πεπτιδογλυκάνη (PGN) για την ενεργοποίηση του αντιμικροβιακού πεπτιδίου (Dziarski και Gupta, 2006). Οι χαμηλές δραστηριότητες της ενδοτοξίνης διεγείρουν την ανοσολογική απόκριση και οι υψηλότερες οδηγούν σε σηπτικό σοκ. *In vivo*, τα Gram αρνητικά βακτήρια πιθανών απελευθερώνουν μικρές ποσότητες ενδοτοξίνης ενώ αναπτύσσονται και αυτό μπορεί να είναι σημαντικό για την τόνωση της φυσικής ανοσίας. Οι ενδοτοξίνες είναι σταθερές στη θερμότητα (δεν αποσταθεροποιούνται με βρασμό για 30 λεπτά), αλλά όχι σε μερικούς οξειδωτικούς παράγοντες όπως το υπεροξείδιο και το υποχλωριώδες, που χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση της βακτηριακής ενδοτοξίνης (Sampath, 2015).

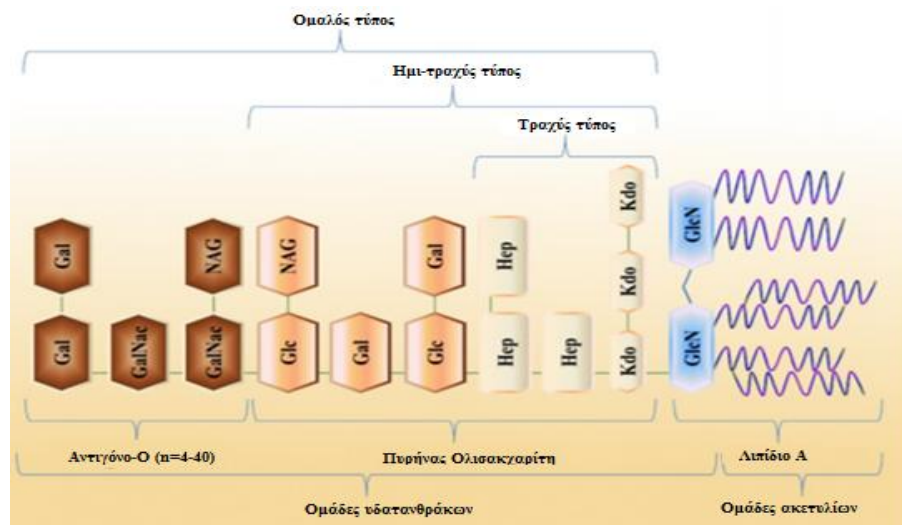
### 1.4. Συστατικά των λιποπολυσακχαριτών

Τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια είναι οι μόνοι οργανισμοί στη φύση που διαθέτουν LPS καθώς είναι ένα σύνθετο μόριο που συμμετέχει σε μια ποικιλία λειτουργιών που σχετίζονται με το κύτταρο (Todar, 2012). Τα LPS μπορεί να χωριστούν σε δύο τύπους: α) στον ομαλό τύπο (τύπος S-Smooth type) και β) στον τραχύ τύπο (τύπος R-Rough

type). Τα LPS τύπου S θεωρείται ως τα πλησιέστερα σε μορφή του κλασικού μοντέλου των LPS (Εικόνα 1.3) (Anwar και Choi, 2014). Αποτελούνται από τρία διαφορετικά τμήματα, εκ των οποίων τα δύο είναι εκτεθειμένα στον εξωτοκυττάριο χώρο. Αποτελούνται από το λιπίδιο A (Lipid –A) το οποίο βρίσκεται στην εξωτερική μεμβράνη του κυττάρου, ένα πυρήνα ολισακχαρίτη (R) που συνδέεται με 3-deoxy-d-manno-octulosonic οξύ (Kdo) με το λιπίδιο A και τη περιοχή του O-Αντιγόνου. Οι λιποπολυσακχαρίτες που περιλαμβάνουν και τα τρία τμήματα ονομάζονται S-LPS (smooth-LPS ), ενώ LPS που δεν διαθέτουν το O-Αντιγόνο ονομάζονται R-LPS (rough-LPS) (Steimle και συνεργάτες, 2016).

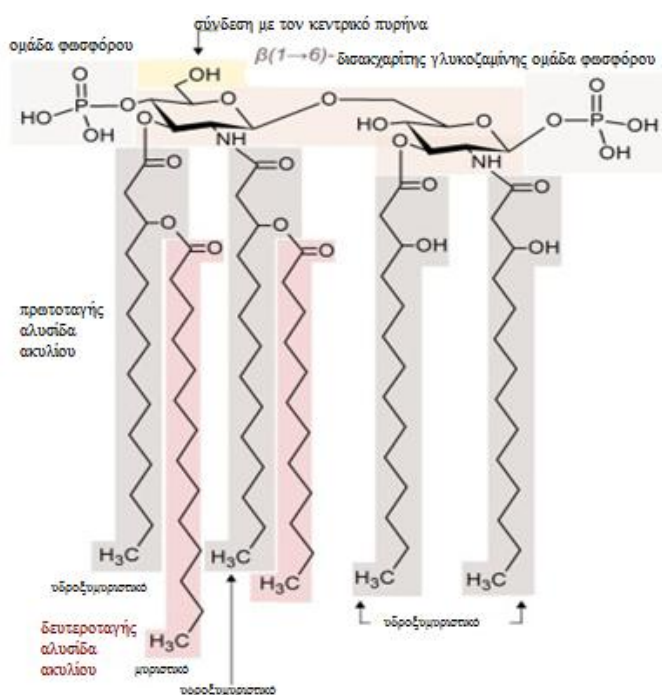


**Εικόνα 1.2.** Δομή των λιποπολυσακχαριτών (LPS). Τα LPS βρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα των Gram αρνητικών βακτηρίων. Η περιοχή του λιπιδίου A απεικονιζόμενη με κόκκινο χρώμα, προκαλεί την ανοσοαπόκριση (Bidne και συνεργάτες 2018).



**Εικόνα 1.3.** Πλήρης δομή των LPS (Anwar και Choi, 2014)

**Το λιπίδιο Α** αποτελείται από ένα δισακχαρικό σκελετό γλυκοζαμίνης β (1→6). Αποτελείται από φωσφορυλιωμένο διμερές N-ακετυλογλυκοζαμίνης (NAG) στις θέσεις 1' και 4' των σακχαριτών με 6 ή 7 λιπαρά οξέα (FA) συνδεδεμένα. Συνήθως βρίσκονται 6 FA, ενώ όλα τα FA στο λιπίδιο Α είναι κορεσμένα. Μερικά από αυτά συνδέονται απευθείας με το διμερές NAG και άλλα είναι εστεροποιημένα στα 3-υδροξυ λιπαρά οξέα (Sampath, 2015). Το λιπίδιο Α βρίσκεται στην εξωτερική πλευρά της βακτηριακής μεμβράνης και συνδέεται μαζί της μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (Raetz και Whitfield, 2001). Η βιολογική του δράση φαίνεται να εξαρτάται από μια διαμόρφωση που προσδιορίζεται από τον δισακχαρίτη γλυκοζαμίνης, τις ομάδες PO<sub>4</sub>, τις αλυσίδες ακετυλίων και επίσης τον εσωτερικό πυρήνα που περιέχει Kdo (Εικόνα 1.4). Καθώς το βακτηριακό λιποπυσακχαριδικό λιπίδιο Α είναι μία από τις πλέον συντηρημένες δομές όλων των Gram αρνητικών βακτηρίων, είναι ένα σημαντικό παθογόνο μόριο που αναγνωρίζεται από το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα και αναφέρεται και ως «ενδοτοξικό» μόριο. Λόγω της διατηρημένης δομής τους στα περισσότερα παθογόνα βακτήρια, αναγνωρίζεται ως σχετιζόμενο με παθογένεια μόριο από πολλούς διαφορετικούς υποδοχείς, π.χ. υποδοχέα τύπου 4 (TLR4) και σε ανοσοκύτταρα (μονοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα) ( Petsch και Anspach, 2000), και διεγείρει μια ισχυρή φλεγμονώδη απόκριση με ενεργοποίηση της κασπάσης-4 και της κασπάσης-5 στους ανθρώπους και από εκεί της έκκρισης των προ-φλεγμονωδών κυτοκινών.

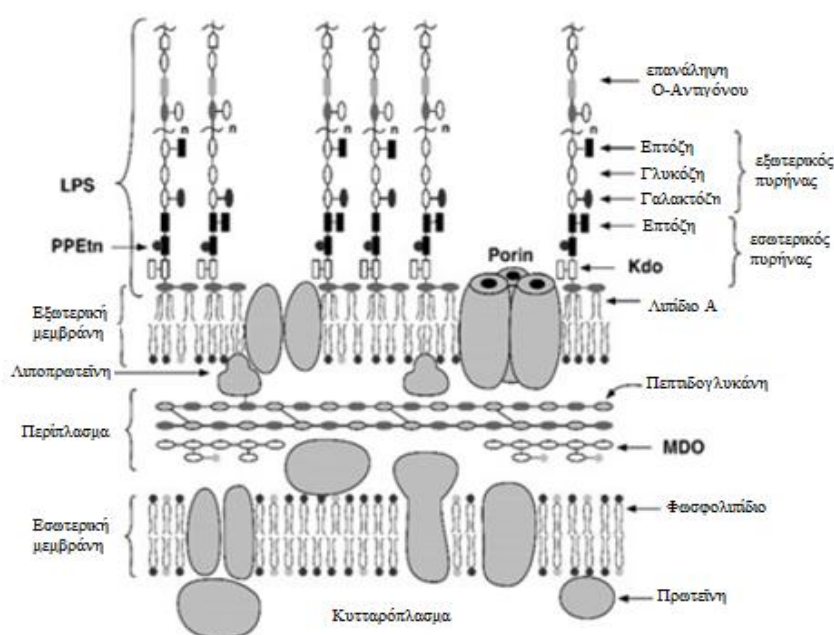


**Εικόνα 1.4.** Δομή του λιπιδίου-Α του *E.Coli* (Steimle και συνεργάτες, 2016)



**Το αντιγόνο O** συνδέεται στον ολισακχαριτικό πυρήνα. Αποτελείται από επαναλαμβανόμενες υπομονάδες ολιγοσακχαριτών αποτελούμενες από 3 - 5 σάκχαρα. Οι μεμονωμένες αλυσίδες ποικίλλουν σε μήκος μέχρι και 40 επαναλαμβανόμενες μονάδες. Ο πολυσακχαρίτης O είναι πολύ μεγαλύτερος από τον πολυσακχαρίτη πυρήνα και διατηρεί την υδρόφιλη περιοχή του μορίου LPS. Ένας κύριος αντιγονικός παράγοντας (antibody-combining site) του Gram-αρνητικού κυτταρικού τοιχώματος βρίσκεται στον πολυσακχαρίτη O (Johnson και συνεργάτες, 2015).

**O- ολισακχαρίτης ή κεντρικός ολισακχαρίτης (R)** συνδέεται στη θέση 6 ενός NAG. Ο ολισακχαρίτης R αποτελείται από μια μικρή αλυσίδα σακχάρων. Για παράδειγμα: KDO - Hep - Hep - Glu - Gal - Glu - GluNAc. Δύο ασυνήθιστα σάκχαρα, επτόζη και 2-κετο-3δεοξυοκτανοϊκό οξύ (KDO), συνήθως υπάρχουν στον πυρήνα πολυσακχαρίτη. Το KDO είναι μοναδικό και υπάρχει πάντοτε σε LPS και έτσι χρησιμοποιήθηκε ως δείκτης σε αναλύσεις για LPS (Sampath, 2015).



**Εικόνα1.5.** Μοριακό μοντέλο της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης του *E. Coli* K-12. Γεωμετρική μορφή: τα οβάλ και ορθογώνια σχήματα συμβολίζουν υπολείμματα σακχάρων, ενώ τα κυκλικά σχήματα αντιπροσωπεύουν πολικές ομάδες των λιπιδίων (Magalhaes και συνεργάτες 2007).

Η μοριακή μάζα ενός μονομερούς ενδοτοξίνης κυμαίνεται από 10 έως 20 kDa, εξαιτίας της μεταβλητότητας της αλυσίδας των ολισακχαριτών. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις όπου η μοριακή μάζα λόγω έλλειψης του Αντιγόνου-O μπορεί να είναι 2,5 kDa ενώ



ενδοτοξίνες με μακριές αλυσίδες του Αντιγόνου-Ο μπορεί να φτάσουν και τα 70 kDa. Είναι γνωστό ότι οι ενδοτοξίνες σχηματίζουν διάφορα υπερ-μοριακά συσσωματώματα σε υδατικά διαλύματα εξαιτίας αμφιπαθητικών δομών. Αυτά τα συσσωματώματα προκύπτουν από μη πολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ φωσφορικών ομάδων με δισθενή ιόντα (Ansprech, 2001). Οι δομές αυτές έχουν μελετηθεί με πολυάριθμες τεχνικές όπως ηλεκτρονική μικροσκοπία, περίθλαση ακτίνων X, φασματοσκοπία FT-IR και NMR. Τα αποτελέσματα από αυτές τις μελέτες έχουν δείξει ότι σε υδατικά διαλύματα, οι ενδοτοξίνες μπορούν να αυτό-οργανωθούν σε μια ποικιλία σχημάτων, όπως κυλινδρικές, κυβικές και εξαγωνικές ανεστραμμένες διατάξεις, με διάμετρο έως 0,1mm, με υψηλή σταθερότητα ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του διαλύματος (pH, ιόντα, επιφανειοδραστικές ουσίες κ.α) (Schromm και συνεργάτες, 2000). Τέλος οι ενδοτοξίνες είναι εξαιρετικά σταθερά μόρια και δεν καταστρέφονται υπό κανονικές συνθήκες αποστείρωσης. Η ενδοτοξίνη μπορεί να αδρανοποιηθεί όταν εκτεθεί σε θερμοκρασία

250 °C για περισσότερο από 30 λεπτά ή 180 °C για περισσότερο από 3 ώρες (Akbar και συνεργάτες, 2012) Επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν οξέα ή αλκάλια τουλάχιστον 0,1M για τη καταστροφή ενδοτοξίνης σε εργαστηριακή κλίμακα (Unger και συνεργάτες, 2014).

### **1.5. Μηχανισμός δράσης ενδοτοξινών.**

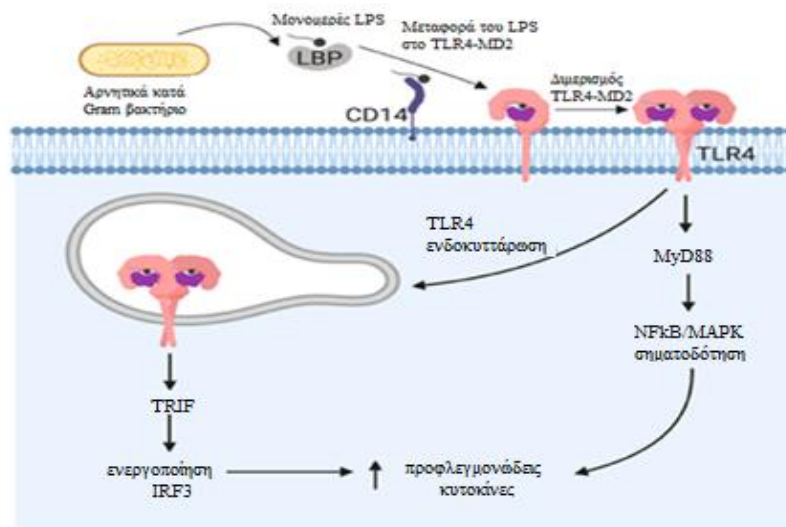
Η ενδοτοξίνη προκαλεί μια ευρεία ποικιλία παθοφυσιολογικών επιδράσεων όπως σοκ ενδοτοξίνης, βλάβη ιστού και θάνατο. Οι ενδοτοξίνες δεν δρουν άμεσα έναντι των κυττάρων ή των οργάνων αλλά μέσω της ενεργοποίησης του ανοσοποιητικού συστήματος, ειδικά των μονοκύτταρων και των μακροφάγων, ενισχύοντας έτσι τις ανοσολογικές αντιδράσεις. Τα κύτταρα αυτά απελευθερώνουν μεσολαβητές, όπως κάποιους παράγοντες νέκρωσης όγκου, ιντερλευκίνες, προσταγλανδίνες (Yamamoto και συνεργάτες, 2000). Η έρευνα στο τομέα της έμφυτης ανοσίας οδήγησε στον εύρεση μιας ομάδας υποδοχέων αναγνώρισης (Porcine reproductive and respiratory syndrome-PRRs) που βρίσκονται σε ανοσοκύτταρα και αναγνωρίζουν μοριακά μοτίβα που σχετίζονται με παθογόνα (PAMPs) συμπεριλαμβανομένων και των LPS. Τα LPS αποτελούν ένα ισχυρό PAMP που αναγνωρίζεται από ένα ειδικό υποδοχέα, τον υποδοχέα-4 (TLR4). Αυτοί οι μεσολαβητές έχουν ισχυρή βιολογική δραστηριότητα και είναι που βρίσκεται στην

επιφάνεια των φαγοκυττάρων (μακροφάγα, ουδετερόφιλα και δενδρικά κύτταρα) (Tan και Kagan, 2014) . Ο ρόλος του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος είναι να εντοπίσει και να αναγνωρίσει τη παρουσία των ξενιστών έτσι ώστε να ξεκινήσει η φαγοκυττάρωση για την απομάκρυνσή τους. Πρωταρχικοί στόχοι των LPS είναι τα φαγοκύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος δηλαδή των μακροφάγων, των ουδετερόφιλων και των δενδρικών κυττάρων. Η αναγνώριση των λιποπολυσακχαριτών ενεργοποιεί τα μακροφάγα και την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών στη συνέχεια, οι οποίες είναι υπεύθυνες για το πυρετό που προκαλείται από τη φλεγμονή. Σε αυτή τη διαδικασία απαιτείται ελεγχόμενη παραγωγή κυτοκινών, καθώς η ανεξέλεγκτη παραγωγή μπορεί να προκαλέσει θανατηφόρες συνέπειες όπως σηπτικό σοκ (Cohen, 2002).

#### **1.5.1. Μηχανισμός αναγνώριση των LPS από τον υποδοχέα-4.**

Ο υποδοχέας-4 που υπάρχει στην επιφάνεια διαφόρων φαγοκυττάρων, είναι ο εξειδικευμένος υποδοχέας αναγνώρισης των λιποπολυσακχαριτών. Η αποτελεσματική αναγνώριση των LPS και την παραγωγή προ-φλεγμονωδών κυτοκινών απαιτείται ο συγχρονισμός δράσης μιας σειράς βοηθητικών πρωτεϊνών, όπως της πρωτεΐνης ορού LBP (Lipopolysaccharide binding protein), της CD14 (Cluster of differentiation 14) και MD-2. Η αναγνώριση των LPS ξεκινά με τη αποδέσμευση ενός μονομερούς LPS όπου μέσω της πρωτεΐνης LBP μεταφέρεται στη CD14 που υπάρχει στα περισσότερα φαγοκύτταρα. Στη συνέχεια η CD14 μεταφέρει και εναποθέτει τα LPS στο σύμπλοκο TLR4/MD-2 το οποίο οδηγεί σε διμερισμό του TLR4. Αυτή η αλλαγή στη διαμόρφωση οδηγεί σε διμερισμό του υποδοχέας ιντερλευκίνης-1 ενεργοποιώντας με αυτό το τρόπο τον πυρηνικό μεταγραφικό παράγοντα NF-κΒ (χημικός μεσολαβητής φλεγμονής) και τη μεταγραφή διαφόρων προ-φλεγμονωδών κυτοκινών (Chaby, 2004) (Εικόνα 1.6).

Παρόλα αυτά, η αλληλεπίδραση ενδοτοξινών με ανοσοκύτταρα δεν προκαλείται μόνο από ειδικούς υποδοχείς. Η εκκίνηση των κυττάρων (cell priming) μπορεί να συμβεί με μη ειδική παρεμβολή μορίων ενδοτοξίνης στις μεμβράνες των κυττάρων – στόχων (Hurley 1995). Τέλος οι ενδοτοξίνες μπορεί να έχουν και ευεργετικά αποτελέσματα. Έχουν χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία «τεχνητού πυρετού», να καταστροφική όγκων και στη βελτίωση, της άμυνα του ανοσοποιητικού συστήματος. Από την άλλη πλευρά, οποιαδήποτε περιττή έκθεση σε ενδοτοξίνη πρέπει να αποφεύγεται αυστηρά για την πρόληψη επιπλοκών. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για τα φάρμακα που χορηγούνται ενδοφλεβίως (Fijita και συνεργάτες, 2010).



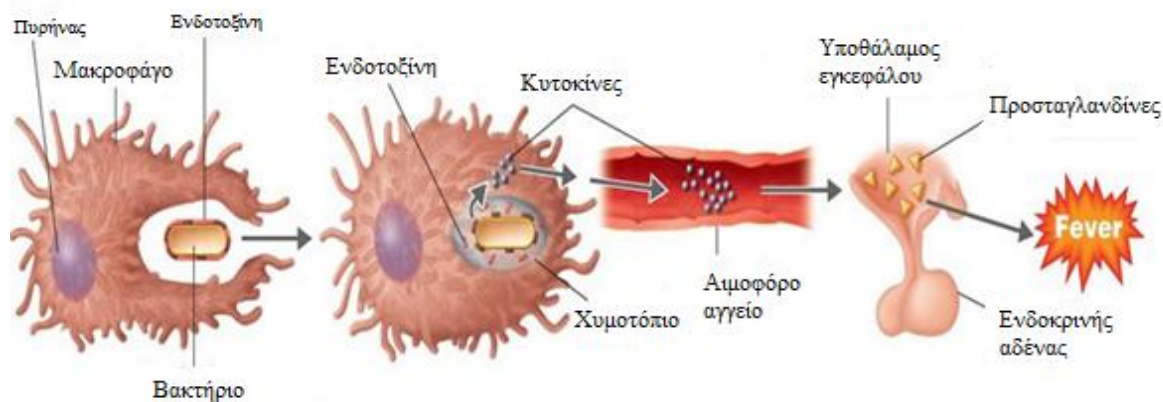
**Εικόνα 1.6.** Μηχανισμός αναγνώρισης των LPS από τον υποδοχέα-4 (Mazgaeen και Gurung, 2020).

## 1.6. Μολυσματικότητα και τοξική δράση των ενδοτοξινών.

Τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε διάφορα «φτωχά» θρεπτικά υποστρώματα, όπως για παράδειγμα το νερό, σε φυσιολογικό όρο και σε ρυθμιστικά διαλύματα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι ενδοτοξίνες να βρίσκονται σχεδόν παντού. Ένα κύτταρο *Escherichia coli* περιέχει περίπου 2 εκατομμύρια μόρια LPS. Η ενδοτοξίνη προκαλεί μια ευρεία ποικιλία παθοφυσιολογικών επιδράσεων. Σε περίπτωση όπου το σώμα εκτίθεται σε LPS σε υπερβολικό βαθμό ή συστηματικά (για παράδειγμα όταν μικρές συγκεντρώσεις LPS εισέρχονται στο αίμα), μπορεί να εμφανιστεί φλεγμονώδης αντίδραση, με αποτέλεσμα πολλαπλές παθοφυσιολογικές επιδράσεις, όπως πυρετός, βλάβη ιστού, σηπτικό σοκ και θάνατο (Papo και Shai 2005). Ο πυρετός προκαλείται από την ιντερλευκίνη-1, που παράγεται από το ήπαρ σε απόκριση της ενδοτοξίνης, που δρουν στον υποθάλαμο που ρυθμίζει τη θερμοκρασία. Η δράση του λιποπολυσακχαρίτη στα αιμοπετάλια προκαλεί διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη με επακόλουθη ισχαιμική βλάβη ιστού σε διάφορα όργανα ενώ το σηπτικό σοκ εμφανίζεται κατά τη διάρκεια σοβαρών λοιμώξεων με Gram αρνητικά βακτήρια ή λιποπολυσακχαρίτων που εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος (Stewart, 2012). Οι πυρετογόνοι δράσεις και το σοκ προκαλούνται κατά την ενδοφλέβια ένεση ενδοτοξίνης σε χαμηλές συγκεντρώσεις

(1ng/ml) (Fiske και συνεργάτες, 2001). Το μέγιστο επίπεδο ενδοτοξίνης για ενδοφλέβιες εφαρμογές φαρμακευτικού και βιολογικού προϊόντος ρυθμίζεται σε 5 μονάδες ενδοτοξίνης ( EU) ανά κιλό σωματικού βάρους σύμφωνα με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας (Petsch και Anspach, 2000). Ο όρος EU περιγράφει τη βιολογική δραστηριότητα μιας ενδοτοξίνης. Για παράδειγμα, 100 μg της πρότυπης ενδοτοξίνης EC-5 και 120 μg ενδοτοξίνης από το στέλεχος *Escherichia coli* O111:B4 έχει δραστηριότητα 1EU. Η κάλυψη αυτού του επιπέδου κατώτατων ορίων αποτελεί μια πρόκληση στη βιολογική έρευνα και στη φαρμακευτική βιομηχανία (Paro και Shai, 2005).

Τόσο το λιπίδιο A (το τοξικό συστατικό των LPS) όσο και οι πολυσακχαριτικές πλευρικές αλυσίδες (το μη τοξικό, αλλά και το ανοσολογικό τμήμα των LPS) δρουν ως καθοριστικοί παράγοντες της λοιμογόνου δράσης στα Gram αρνητικά βακτήρια. Τα O-αντιγόνα έχουν ιδιότητες που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στα φαγοκύτταρα προς τα αντιγόνα και την ιδιότητα των αντιγονικών παραλλαγών. Το λιπίδιο A δρα ως ανοσοδιεγερτής, το οποίο προκαλεί τις βιολογικές αντιδράσεις ενός οργανισμού (Sampach, 2015).



**Εικόνα 1.7.** Πυρετογόνος απόκριση εξαιτίας των ενδοτοξινών. (Microbiology WordPress.com)

### 1.7. Βιολογική δράση των λιποπολυσακχαριτών.

Οι βιολογικές, ανοσολογικές αποκρίσεις ενός πειραματόζωου μπορούν να αναλυθούν χρησιμοποιώντας αρκετές παραμέτρους όπως για παράδειγμα ένεση στο πειραματόζωο απευθείας αρνητικών κατά Gram βακτηρίων ή καθαρού διαλύματος LPS και η μελέτη ενός μεγάλου φάσματος παθοφυσιολογικών αντιδράσεων όπως είναι ο πυρετός, οι

μεταβολές του αριθμού των λευκών αιμοσφαιρίων, οι ενδοαγγειακή πήξη, ο θάνατος κ.α. Η έγχυση ελάχιστων δόσεων ενδοτοξίνης έχει σαν αποτέλεσμα το θάνατο των θηλαστικών ακολουθώντας την εξής πορεία: λανθάνουσα περίοδο, δυσφορία (διάρροια, καταπληξία) και θάνατος. Το πόσο σύντομα συμβαίνει ο θάνατος ποικίλει ανάλογα με τη δόση της ενδοτοξίνης, την οδό χορήγησης και το είδος του πειραματόζωου (Tanaka και Yamakawa, 2011).

## **1.8. Μελέτη της Μεθοδολογίας για την ανίχνευση ενδοτοξινών.**

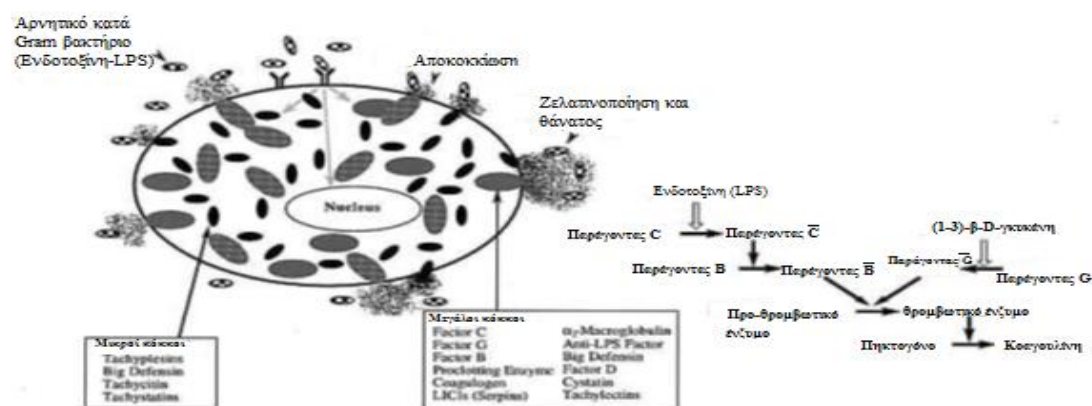
### **1.8.1. Μέθοδος Rabbit Pyrogen Test.**

Η μέθοδος ανίχνευσης πυρετογόνου σε κουνέλια δημιουργήθηκε από τους Hort και Panfold το 1912. Η αρχή της ανίχνευσης βασίζεται στην ένεση παρεντερικών φαρμάκων σε κουνέλια και στη συνέχεια στη παρατήρηση για αύξηση της θερμοκρασίας ή την εμφάνιση πυρετού στα ζώα (Peterbauer και συνεργάτες, 2000). Τα κουνέλια θεωρούνται ιδανική επιλογή επειδή έχουν παρόμοια ανοχή στην ενδοτοξίνη όπως ο άνθρωπος. Αυτή η μέθοδος μπορεί να ανιχνεύσει αρκετά χαμηλά επίπεδα ενδοτοξίνης έως και 0,5 EU/ml. (Hoffmann και συνεργάτες, 2005). Παρά την εξαιρετική ευαισθησία και την εξειδίκευση της η μέθοδος απαιτεί πολλά πειραματόζωα, χρόνο και αδυναμία της ποσοτικοποίησης της ενδοτοξίνης καθιστώντας την ακατάλληλη για συχνή εργαστηριακή χρήση (Kumar και συνεργάτες, 2017).

### **1.8.2. Μέθοδος Limulus Amebocyte Lysate**

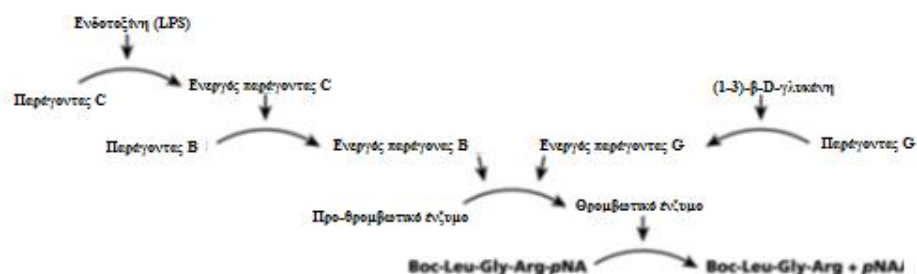
Η μέθοδος Limulus Amebocyte Lysate (LAL) δημιουργήθηκε τη δεκαετία του 1960 από τους Levin και Bang και χρησιμοποιεί το εκχύλισμα αίματος του καβουριού *Limulus polyphemus* (Schindler και συνεργάτες, 2009). Η μέθοδος LAL είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος με βάση και τις μονογραφίες της ευρωπαϊκής φαρμακοποιίας (Ph. Eur. 2.6.14). Η τεχνική της δοκιμασίας LAL εξαρτάται από την αντίδραση πήξης και βοηθά στην ποσοτική ανίχνευση των LPS με βάση τη πήξη του αντιδραστηρίου σε επαφή με τις ενδοτοξίνες (Su και Ding, 2015). Το LAL αντιδρά με βακτηριακές ενδοτοξίνες και με τον πολυσακχαρίτη (1→3)-β-D-glucan οποίος είναι συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των μυκήτων ενώ εντοπίζεται και σε διάφορα βακτήρια. Το αίμα του «βασιλικού κάβουρα» περιέχει μόνο ένα τύπο κυττάρων, τα αμοιβαδοκύτταρα. Αυτά τα κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο και στην άμυνα εναντίον των παθογόνων. Περιέχουν κόκκους με τον πηκτικό παράγοντα γνωστό ως “coagulogen” ο οποίος απελευθερώνεται

εκτός του κυττάρου όταν εμφανιστούν βακτηριακές ενδοτοξίνες ή (1→3)-β-D-glucan. Το αποτέλεσμα είναι η πήξη του αίματος με τον εγκλωβισμό της μόλυνσης στο ημίκλειστο κυκλοφορικό σύστημα του ζώου (Εικόνα 1.8) (Akbar και συνεργάτες, 2012).



**Εικόνα 1.8.** Αντίδραση του αμοιβαδοκύτταρου στη παρουσία βακτηριακών ενδοτοξινών (Abkar και συνεργάτες, 2012).

Τα αντιγόνα ανιχνεύονται μέσω υποδοχέων στο εξωτερικό της κυτταρικής μεμβράνης και η ύπαρξή τους ενεργοποιεί μέσω μεταγωγής σήματος την απελευθέρωση του περιεχομένου των κόκκων στο εξωτερικό του κυττάρου. Οι κόκκοι περιέχουν τις σερινικές πρωτεάσες (Factor-C/B/G), το προ-θρομβωτικό ένζυμο και τον πηκτικό παράγοντα θρομβογόνο (coagulogen). Οι πρωτεάσες Factor-C και Factor-G αυτοενεργοποιούνται παρουσία LPS και (1→3)-β-D-glucan αντίστοιχα και ξεκινούν το LAL cascade (Εικόνα 1.9) που οδηγεί στη μετατροπή του θρομβογόνου στην αδιάλυτη μορφή του θρομβίνης (Gel Clot) δημιουργώντας ινώδεις θρόμβους οι οποίοι φράσσουν το σημείο μόλυνσης και παγιδεύουν τους μικροοργανισμούς που εισβάλλουν.



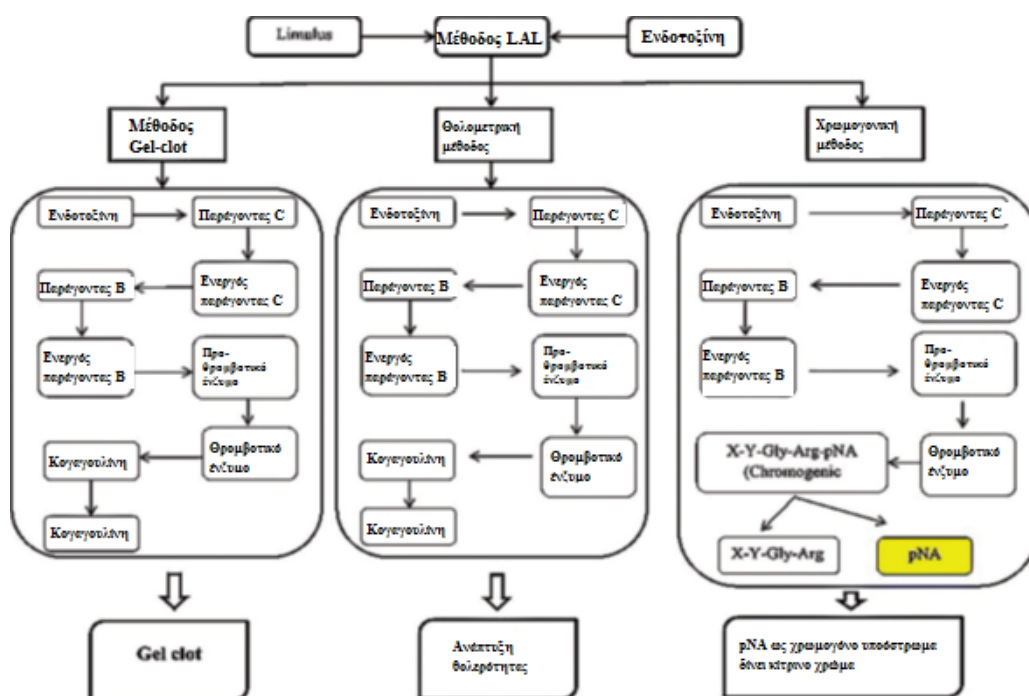
**Εικόνα 1.9.** LAL Cascade- Συνθετικό υπόστρωμα για τις Chromogenic αναλύσεις (Woldie και συνεργάτες, 2017).

Οι βακτηριακές ενδοτοξίνες οδηγούν στην αυτοενεργοποίηση του ζυμογόνου προενζύμου Factor-C στο ενεργό ένζυμο Factor-C το οποίο με την σειρά του μετατρέπει το ζυμογόνο προένζυμο Factor-B στο ενεργό ένζυμο Factor-B. Αντίστοιχα οι (1→3)-β-D-glucan μετατρέπουν το προένζυμο Factor-G στην ενεργή του μορφή, που επίσης είναι μια ζυμογόνος σερινική πρωτεάση. Από οποιαδήποτε διαδρομή και αν ξεκινήσει το LAL cascade, το προ-θρομβοτικό ένζυμο μετατρέπεται σε θρομβοτικό ένζυμο και αυτό μετατρέπει το θρομβογόνο στην αδιάλυτη θρομβίνη, παγιδεύοντας παθογόνους μικροοργανισμούς και υπολείμματα ενώ παράλληλα φράσσεται η πύλη εισόδου σε περίπτωση ανοιχτής πληγής.

Υπάρχουν τρεις βασικές LAL μεθοδολογίες: Gel Clot, κινητική Θολοσιμετρική (kinetic Turbidimetric) και Χρωμογονική (Chromogenic) κινητική και τελικού σημείου. Οι τελευταίες δύο (Θολοσιμετρική/Χρωμογονική) χαρακτηρίζονται ως φωτομετρικές μέθοδοι καθώς είναι απαραίτητη η χρήση φωτόμετρου για τη διεξαγωγή τους. Οι βασικές εφαρμογές τους είναι ο έλεγχος ενεσίμων/παρεντερικών φαρμακευτικών προϊόντων και αίματος. Η απλούστερη μορφή ανάλυσης LAL είναι η δοκιμασία θρόμβου πηκτώματος (gel clot). Όταν η δοκιμασία αυτή συνδυάζεται με μια αραιώση του δείγματος που περιέχει ενδοτοξίνη, σχηματίζεται ένα πήκτωμα (gel). Πρόκειται για μια ποιοτική και ημιποσοτική δοκιμασία που χρησιμοποιείται για την εξέταση της παρουσίας ενδοτοξινών. Ο σχηματισμός θρόμβου ερμηνεύεται ως θετικό αποτέλεσμα για την παρουσία ενδοτοξίνης ενώ ο μη σχηματισμός αναφέρεται σε δείγμα που είναι ελεύθερο ενδοτοξίνης. Η δοκιμασία αυτή εφαρμόζεται για την ανίχνευση ενδοτοξίνης κυρίως σε φαρμακευτικά προϊόντα. Η θολοσιμετρική και η χρωμογόνος μέθοδοι παρουσιάζουν μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία από τη μέθοδο gel clot (Schindler και συνεργάτες, 2009) Η δοκιμασία LAL λειτουργεί με τον σχηματισμό θρόμβου από το εκχύλισμα του αίματος των καβουριών μετά την έκθεση σε ενδοτοξίνες (Peterbauer και συνεργάτες, 2000).

Η θολοσιμετρική δοκιμασία LAL, σε σύγκριση με τη δοκιμασία θρόμβου πηκτώματος LAL, δίνει καλύτερη ποσοτική εκτίμηση της ενδοτοξίνης σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 0,01 EU/mL έως 100,0 EU/ mL. Αυτή η δοκιμασία βασίζεται στην αύξηση θολερότητας λόγω πήξης πρωτεΐνης ανάλογα με τη συγκέντρωση ενδοτοξίνης στο δείγμα. Οι οπτικές πυκνότητες των διαφόρων αραιώσεων του δείγματος δοκιμής μετρώνται και συσχετίζονται με την συγκέντρωση ενδοτοξίνης, χρησιμοποιώντας μία πρότυπη καμπύλη που σχηματίζεται από δείγματα με γνωστές ποσότητες ενδοτοξίνης (Sandle, 2015a).

Μια δοκιμασία κινητικής χρωμογόνου υποστρώματος διαφέρει από τις θρομβωτικές και τις θολομετρικές αντιδράσεις επειδή το θρομβογόνο (μια διαλυτή πρωτεΐνη που μετατρέπεται στην αδιάλυτη κοαγουλίνη από το σύστημα πήξης του καβουριού) αντικαθίσταται εν μέρει ή πλήρως από ένα χρωμογόνο υπόστρωμα. Όταν υδρολύεται από το ένζυμο προ-θρόμβωσης, το χρωμογόνο υπόστρωμα απελευθερώνει μια κίτρινη χρωστική ουσία γνωστή ως *p*-νιτροανιλίνη (*p*-nitroaniline). Ο χρόνος που απαιτείται για την απελευθέρωση της κίτρινης ουσίας σχετίζεται με τη συγκέντρωση ενδοτοξίνης. Ωστόσο, οι κινητικές και χρωμογονικές δοκιμές, αν και ακριβέστερες και γρηγορότερες από την μέθοδο gel-clot δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για υγρά με εγγενή θολότητα όπως αίμα και έγχρωμα διαλύματα (Peterbauer και συνεργάτες, 2000).



**Εικόνα 1.10.** Τύποι της μεθόδου που βασίζονται στη δοκιμασία LAL για την ανίχνευση ενδοτοξινών (Dullah και Ongkudon, 2016).

Σύμφωνα με τον Peterbauer η μέθοδος LAL ήταν 3 έως 300 φορές πιο ευαίσθητη από την Rabbit Pyrogen Test (Peterbauer και συνεργάτες, 2000). Το όριο ανίχνευσης αυτής της μεθόδου είναι 0,03 EU/ml (Ding και Ho 2001). Η δοκιμή LAL είναι επίσης γνωστή ως δοκιμή βακτηριακής ενδοτοξίνης (Bacteria Endotoxin Test ,BET) δεδομένου ότι βασίζεται στη προκαλούμενη από ενδοτοξίνη απόκριση πήξης, που ενεργοποιείται από τη



σύνδεση ενδοτοξίνης με το παράγοντα C (Ph. Eur). Παρόλο που η μέθοδος LAL έγινε αποδεκτή ως αξιόπιστη μέθοδος για τη μέτρηση της πυρετογένεσης, είναι ειδική μόνο για την ενδοτοξίνη ως συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των Gram αρνητικών βακτηρίων. Αυτό σημαίνει ότι δεν είναι εφαρμόσιμη σε δείγματα που περιέχουν μεγάλη ποσότητα πρωτεΐνης και δεν είναι ακριβής για την ποσοτικοποίηση της ενδοτοξίνης *in vivo* (<http://www.globalresearchonline.net>)

Εκτός από τα θέματα που μπορεί να προκύψουν σχετικά με την ευαισθησία και την εξειδίκευση του LAL, ο πληθυσμός του βασιλικού κάβουρα βρίσκεται υπό απειλή λόγω της υπερβολικής αλιείας για τη συλλογή του αίματος τους ( Sandle, 2017). Αν και τα ζώα επιστρέφουν στη θάλασσα μετά την συλλογή του αίματός τους περίπου το 20% αυτών αποτυγχάνουν να επιβιώσουν. Η ανακάλυψη του παράγοντα C έχει βοηθήσει σε αυτή τη κατεύθυνση. Ο παράγοντας C λειτουργεί σαν βιοαισθητήρας ενδοτοξίνης καθώς μπορεί να ανιχνεύει τη παρουσία ενδοτοξίνης μετά την ενζυμική δραστηριότητα (Shintani, 2016). Η Ευρωπαϊκή Διεύθυνση για τη Ποιότητα Υγείας και Υγειονομικής Περίθαλψης (European Directorate for the Quality of Medicine, EDQM), έδωσε κατευθυντήριες γραμμές για τη δοκιμή βακτηριακής ενδοτοξίνης που περιλαμβάνει τη χρήση ανασυνδιασμένου παράγοντα C ως πιθανή εναλλακτική μέθοδο στη δοκιμή LAL ([www.gmp-compliance.org](http://www.gmp-compliance.org))

## **1.9. Παρουσία ενδοτοξινών στα βιολογικά παρασκευάσματα**

### **1.9.1. Παρουσία ενδοτοξινών στις βιομηχανίες φαρμάκων.**

Στη φαρμακευτική βιομηχανία η δοκιμή των παρεντερικών φαρμάκων είναι σημαντική επειδή οι λιποπολυσακχαρίτες είναι παρόντες σε βακτηριακά είδη που ζουν στο νερό καθώς αυτό είναι το κύριο συστατικό σε πολλά παρεντερικά προϊόντα. Επειδή οι ενδοτοξίνες δεν καταστρέφονται με τη θερμοκρασία, έχει ως αποτέλεσμα να είναι ανθεκτικές στις περισσότερες συμβατικές διεργασίες αποστείρωσης και για αυτό απαιτούνται ξεχωριστές μέθοδοι για την απομάκρυνση τους (Sandle, 2004).

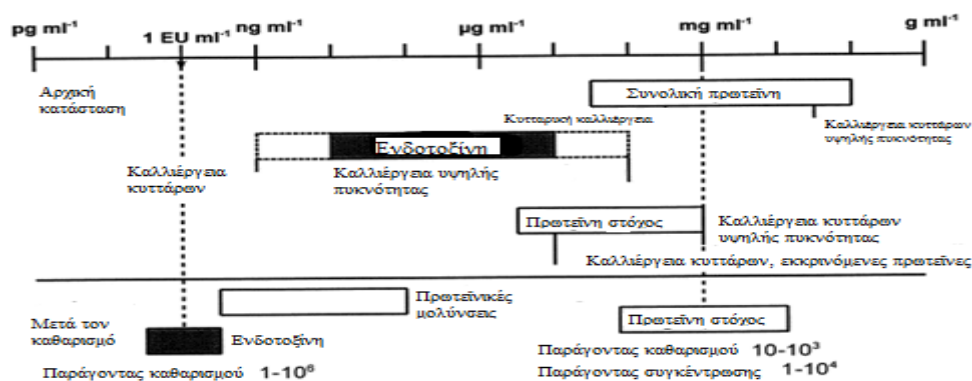
Στις βιομηχανίες φαρμάκων είναι δυνατόν να ανιχνευτούν ενδοτοξίνες κατά τη διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας ή στο τελικό προϊόν. Διάφορες φαρμακευτικές διεργασίες και εξοπλισμός που χρησιμοποιείται βρίσκονται σε κίνδυνο έκθεσης σε ενδοτοξίνες. Οι κίνδυνοι αυτοί προέρχονται από το χειρισμό του ανθρώπου, τη σκόνη, τη συσκευασία, το

μολυσμένο νερό κ.α. Η ανάπτυξη μικροοργανισμών στις περιπτώσεις αυτές, μπορεί να αποτελέσει αιτία μόλυνσης από ενδοτοξίνες (Williams, 2001).

Σύμφωνα με τους Westphal και Jann (1965), τα πυρετογόνα στα φαρμακευτικά παρασκευάσματα μπορεί να προέρχονται από μικροοργανισμούς της οικογένειας *Enterobacteriaceae* που θεωρείται ότι είναι ο κύριος υπεύθυνος μόλυνσης ενός ενέσιμου διαλύματος που παρασκευάζεται εφόσον δεν τηρούνται οι κατάλληλες διαδικασίες απολύμανσης και αποστείρωσης (Hirayama και Sakata, 2002). Τα Gram αρνητικά βακτήρια μπορεί είναι οι πιο επικίνδυνοι παράγωγοι πυρετογόνων αυτό όμως δεν σημαίνει ότι και τα θετικά κατά Gram βακτήρια δεν μπορούν να παράγουν τέτοια μόρια. Ωστόσο το κάνουν σε χαμηλό ποσοστό. Πράγματι τα Gram θετικά βακτήρια, όταν καταστρέφονται από τη θερμότητα, δεν παράγουν σχεδόν κανένα πυρετογόνο. Αυτό συμβαίνει διότι οι τοξίνες τους είναι εξωτοξίνες πρωτεϊνικής προέλευσης οι οποίες αποδιατάσσονται εύκολα με τη θερμότητα σε αντίθεση με τα Gram αρνητικά βακτήρια τα οποία παράγουν ενδοτοξίνες που αποτελούνται κυρίως από λιποπολισακχαρίτες και ως και τούτου είναι πιο ανθεκτικές στη θερμότητα (Mak και Saunders, 2006).

### **1.9.2. Παρουσία ενδοτοξινών στον τομέα της Βιοτεχνολογίας**

Στον τομέα της Βιοτεχνολογίας τα Gram αρνητικά βακτήρια χρησιμοποιούνται ευρέως στα συστήματα παραγωγής πρωτεϊνών ως αποτέλεσμα έκφρασης ανασυνδυασμένων γονιδίων. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι πάντοτε μολυσμένες από ενδοτοξίνες (Hirayama και Sakata 2002). Σήμερα αυτές οι βιολογικές διεργασίες χρησιμοποιούνται σε μεγάλο βαθμό στο τομέα τις βιοτεχνολογίας, και για αυτό το λόγο οι ενδοτοξίνες αποτελούν σοβαρό πρόβλημα στις διάφορες βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Οι συγκεντρώσεις των ενδοτοξινών σε αυτές τις εφαρμογές εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη πηγή του προϊόντος. Οι συγκεντρώσεις αυτές κυμαίνονται σε λιγότερο από 100 EU/ml<sup>-1</sup> σε υπερκείμενα κυτταροκαλλιεργειών και σε περισσότερο από 10<sup>6</sup> EU/ml<sup>-1</sup> σε υπερκείμενα βακτηριακών καλλιεργειών υψηλής πυκνότητας. (Εικόνα 1.11). Οι πρωτεΐνες που συντίθενται από Gram αρνητικά βακτήρια πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο ελεύθερες από ενδοτοξίνες ώστε να αποφευχθούν τυχόν παρενέργειες όταν αυτές χορηγούνται σε ζώα ή ανθρώπους. Παρόλα αυτά, οι ενδοτοξίνες είναι πολύ σταθερά μόρια που αντιστέκονται σε ακραίες θερμοκρασίας και μεταβολές του pH. Για αυτό το λόγο πολλές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την απομάκρυνσή τους από τις πρωτεΐνες (Hirayama και Sakata 2002, Petsch και Anspach 2000).



**Εικόνα 1.11.** Μέσος όρος συγκεντρώσεων πρωτεϊνών και ενδοτοξινών πριν και μετά το καθαρισμό (Petsch και Ansapach 2000).

### 1.10. Μέθοδοι απομάκρυνσης ενδοτοξινών από βιολογικά παρασκευάσματα.

Υπάρχουν δύο δυσκολίες που σχετίζονται με την απομάκρυνση ενδοτοξινών από τα προϊόντα. Η πρώτη έχει να κάνει με το ότι η εφαρμοζόμενη διαδικασία δεν πρέπει να μεταβάλει το προϊόν κατά τη διάρκεια της απομάκρυνσης της ενδοτοξίνης, ενώ η δεύτερη σχετίζεται με παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης ενδοτοξίνης και τη δυσκολία απομάκρυνσής της. Η βάση πολλών τεχνικών για την απομάκρυνση των λιποπολυσακχαριτών βασίζεται στην ίδια τη δομή των συμπλόκων ενδοτοξίνης. Ένα μόριο ενδοτοξίνης διαθέτει υδρόφοβες και υδρόφιλες φορτισμένες περιοχές. Αυτά τα χαρακτηριστικά διαμορφώνουν μια σειρά πιθανών αλληλεπιδράσεων με άλλα μόρια (Magalhães και συνεργάτες, 2007).

#### 1.10.1. Διαχωρισμός οργανικών και υδατικών φάσεων

Η χρήση υδατικών συστημάτων δύο φάσεων γίνεται με ορισμένες διαδικασίες, ως εναλλακτική λύση στα συστήματα εκχύλισης οργανικών-υδατικών διαλυτών, εν μέρει επειδή η μέθοδος μπορεί να παράγει ήπιες συνθήκες που δεν βλάπτουν ή δεν μετουσιώνουν ασταθή βιομόρια. Η υδρόφοβη φύση της ενδοτοξίνης βοηθά στη διφασική κατανομή και αποτελεί αποτελεσματική μέθοδος αφαίρεσης της ενδοτοξίνης. Αυτό περιλαμβάνει τη βελτιστοποίηση των συνθηκών που οδηγούν στο διαχωρισμό των βιολογικών μορίων στόχων σε μία φάση, ενώ η ενδοτοξίνη διαχωρίζεται από το προϊόν σχηματίζοντας άλλη φάση (Lopes και συνεργάτες, 2010). Εδώ τα συστήματα δύο φάσεων μπορούν να υποβληθούν σε χειρισμούς τροποποιώντας παράγοντες όπως το pH, την ιοντική ισχύ και τη συγκέντρωση του συστατικού φάσης.

### **1.10.2. Υπερδιήθηση μορίων ενδοτοξίνης**

Επειδή τα μόρια της ενδοτοξίνης τείνουν να σχηματίζουν μικκύλια ή κυστίδια σε υδατικό διάλυμα μπορούν να απομακρυνθούν με διήθηση. Η διαδικασία αυτή λειτουργεί αποκλείοντας τα μόρια της ενδοτοξίνης με μοριακό βάρος 10.000 Daltons και άνω, χρησιμοποιώντας ένα λεπτό φίλτρο (η μοριακή μάζα ενός μονομερούς ενδοτοξίνης κυμαίνεται από 10.000 έως 20.000 Da) (Anspach, 2001). Η μέθοδος της υπερδιήθησης χρησιμοποιείται συχνά σε διαδικασίες που αφορούν την απολύμανση του νερού, παρόλα αυτά στα πρωτεϊνικά διαλύματα η μέθοδος έχει μικρή επίδραση στα επίπεδα ενδοτοξίνης (Jang και συνεργάτες, 2009).

### **1.10.3. Χρωματογραφία**

Σε πολλές εφαρμογές, η αρνητική η χρωματογραφία προτιμάται σαν μέθοδο καθαρισμού από ενδοτοξίνες (Koizumi και συνεργάτες, 1997). Οι μέθοδοι χρωματογραφίας συγγένειας λειτουργούν με τη πρόσδεση της ενδοτοξίνης λόγω συγγένειας με άλλα μόρια. Αντίθετα, η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων χρησιμοποιεί θετικό φορτίο για να προσελκύσει την αρνητικά φορτισμένη ενδοτοξίνη και στην συνέχεια να επιτρέψει την έκλουσή της. Οι δύο αυτές διαδικασίες επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες όπως pH, θερμοκρασία και ποσότητα ηλεκτρολυτών στο διάλυμα (Lin και συνεργάτες, 2005). Επιπλέον μπορεί να χρησιμοποιηθεί η χρωματογραφία αποκλεισμού, αν και αυτό εξαρτάται από το μέγεθος των πρωτεϊνών (Saraswat και συνεργάτες, 2013)

Διάφορες επιπλοκές μπορεί να προκύψουν λόγω της τάσης της ενδοτοξίνης να σχηματίζει μικροκυτταρικές δομές (κυτταρικά συσσωματώματα). Για τον λόγο αυτό, η επιτυχία της χρωματογραφίας συγγένειας και ανταλλαγής ιόντων στον διαχωρισμό της ενδοτοξίνης από τις πρωτεΐνες επηρεάζεται από τις ιδιότητες της πρωτεΐνης στόχου (Petsch και Anspach, 2000).

### **1.10.4. Διάσπαση ενδοτοξίνων με τη χρήση απορρυπαντικών**

Η διάσπαση της ενδοτοξίνης στα πρωτεϊνικά διαλύματα μπορεί να γίνει μέσω της χρήσης μη ιοντικών επιφανειοδραστικών μορίων σε ένα στάδιο έκπλυσης (Reichelt και συνεργάτες, 2006). Ωστόσο, αυτό μπορεί να παρουσιάσει πρόβλημα και να χρειαστεί μετέπειτα καθαρισμός, καθώς το απορρυπαντικό απαιτεί αφαίρεση. Το πρόσθετο αυτό βήμα μπορεί να οδηγήσει σε κάποια απώλεια της απόδοσης του προϊόντος.

### **1.11. Μέθοδοι εκχύλισης των λιποπολυσακχαριτών.**

Ανάλογα με τα μεγέθη και τις δομές τους, τα LPS μπορούν να χωριστούν όπως έχει ήδη αναφερθεί σε δύο ομάδες: στον ομαλό τύπο (S-LPS) όπου τα LPS περιλαμβάνουν και τις τρεις περιοχές και τα R-LPS στα οποία είτε απουσιάζει το O-αντιγόνο, είτε αλυσίδες αυτού. Επειδή τα μόρια LPS σε διαφορετικά βακτήρια έχουν διαφορετικές δομές και ιδιότητες, δεν υπάρχει καθολική μέθοδος εκχύλισης των LPS. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι, όπου η κάθε μια ευνοεί συγκεκριμένες ομάδες LPS (Wang και συνεργάτες, 2010).

#### **1.11.1. Μέθοδος εκχύλισης μέσω φαινόλης- νερού**

Η μέθοδος αυτή ευνοεί την εκχύλιση S-LPS αλλά όχι την εκχύλιση των R-LPS. Χρησιμοποιείται μίγμα φαινόλης και νερού, όπου το μίγμα αυτό είναι μονοφασικό πάνω από τους 65 °C, αλλά διαχωρίζεται σε δύο φάσεις κάτω από αυτή τη θερμοκρασία. Τόσο τα LPS όσο και οι πρωτεΐνες μπορούν να εξαχθούν από τα βακτήρια όταν το μίγμα είναι πάνω από τους 65 °C, ενώ όταν αυτό κρυώνει συμβαίνει διαχωρισμός φάσης. Η φάση φαινόλης περιέχει κυρίως πρωτεΐνες, ενώ η υδατική φάση περιέχει τα LPS (Wang και συνεργάτες, 2010).

#### **1.11.2. Μέθοδος εκχύλισης με αιθέρα**

Η μέθοδος αυτή ευνοεί την εκχύλιση των R-LPS. Χρησιμοποιεί μονοφασικό διάλυμα αποτελούμενο από υγρή φαινόλη, χλωροφόρμιο και πετρελαϊκό αιθέρα (PCP). Σε ένα τέτοιο διάλυμα, τα R-LPS είναι πλήρως διαλυτά αλλά τα S-LPS, οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊκά οξέα είναι αδιάλυτα και μπορεί να διαχωριστούν από το εκχύλισμα (Wang και συνεργάτες, 2010).

#### **1.11.3. Μέθοδος εκχύλισης με EDTA**

Δεδομένου της ετερογένειας στο μέγεθος των LPS που μπορεί να εμφανίζονται σε ένα οργανισμό, έχει αναπτυχθεί μέθοδος εκχύλισης τόσο των S-LPS όσο και των R-LPS. Σε αυτή τη μέθοδο το SDS και το EDTA εφαρμόζονται για την κατακράτηση μολυσματικών ουσιών, όπως πεπτιδογλυκάνες και πρωτεΐνες εκχύλισμα (Wang και συνεργάτες, 2010).

#### **1.11.4. Μέθοδος Μικρο-εκχύλισης (Micro-extraction)**

Αποτελεί μέθοδο εκχύλισης LPS μικρής κλίμακας σε περίπτωση που υπάρχει μικρή συγκέντρωση βακτηριακών κυττάρων. Η καθαρότητα των LPS που εξάγονται με αυτή τη μέθοδο μπορεί να είναι μην είναι πάντα υψηλή (Wang και συνεργάτες, 2010).

#### **1.12. Παρουσία ενδοτοξινών στο νερό**

Το νερό είναι ένα βασικό συστατικό που χρησιμοποιείται σε πολλές φαρμακευτικές και βιολογικές διεργασίες. Το νερό χρησιμοποιείται για τη παρασκευή φαρμακευτικών προϊόντων, δραστικών φαρμακευτικών συστατικών (API), ενδιάμεσων προϊόντων και αντιδραστηρίων. (US Pharmacopeia WI-QC-10.76). Ο έλεγχος της ποιότητας του νερού σε όλη τη διαδικασία παραγωγής, αποθήκευσης και διανομής, συμπεριλαμβανομένης της μικροβιολογικής και χημικής ποιότητας, αποτελεί πολύ κρίσιμο παράγοντα ελέγχου. Το νερό μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορες εφαρμογές, μερικές από τις οποίες απαιτούν μικροβιολογικούς ελέγχους. Η παραγωγή, αποθήκευση και διανομή του νερού που προορίζονται για τέτοιες εφαρμογές θα πρέπει να σχεδιάζεται με τρόπο τέτοιο ώστε να εξασφαλίζεται η παραγωγή νερού κατάλληλης ποιότητας. Είναι απαραίτητο να επικυρωθεί η διαδικασία παραγωγής νερού για να διασφαλιστεί ότι το νερό που παράγεται, αποθηκεύεται και διανέμεται τηρεί τις απαιτούμενες προδιαγραφές. Οι μικροβιολογικές και χημικές δοκιμές για το νερό που χρησιμοποιείται στα φαρμακευτικά προϊόντα είναι απαραίτητες. Οι μικροβιολογικές δοκιμές καθορίζουν τον αριθμό των μικροοργανισμών σε ένα δείγμα νερού. Η μικροβιακή δοκιμή του νερού περιλαμβάνει την εκτίμηση του αριθμού των βιώσιμων αερόβιων βακτηρίων που υπάρχουν σε μια δεδομένη ποιότητα νερού (Sandle, 2017). Για να διασφαλιστεί η συμμόρφωση με ορισμένα πρότυπα χημικής και μικροβιολογικής ποιότητας, το νερό που χρησιμοποιείται για την παραγωγή φαρμακευτικών ουσιών πρέπει να πληρούν τις απαιτήσεις του Εθνικού Κανονισμού για το πόσιμο νερό (NPDWR- 10 CFR 141).

Υπάρχουν τέσσερις ποιότητες νερού στη φαρμακευτική παραγωγή που ορίζονται από την Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία (European Pharmacopoeia): Πόσιμο νερό, καθαρισμένο νερό, WFI ή νερό για ένεση και το νερό υψηλής καθαρότητας. Η κάθε μια από αυτές τις ποιότητες νερού μπορεί να αντιμετωπίζει μικροβιακά ζητήματα που σχετίζονται με τη μέθοδο παραγωγής, τον απαιτούμενο βαθμό καθαρισμού και τη διαδικασία αποθήκευσης και διανομής (Sanlde, 2017).

Καθαρό νερό (Purified Water): Τυπικά παράγεται με αντίστροφη ώσμωση και χρησιμοποιείται στη παραγωγή μη-παρεντερικών φαρμάκων. Ακόμα προορίζεται για χρήση σε σκευάσματα που δεν προορίζονται να είναι αποστειρωμένα ή μη πυρετογόνα (δηλαδή, δεν απαιτούν προδιαγραφή ενδοτοξίνης).

Νερό υψηλής καθαρότητας (Highly purified water): Ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (European Medicine Agency, EMA) εισήγαγε μια νέα κατηγορία νερού υψηλής καθαρότητας. Ορίζεται ως το νερό το οποίο προσδιορίζεται για τη παρασκευή προϊόντων που απαιτούν νερό υψηλής καθαρότητας ( Hideharu, 2016). Συγκεκριμένα προορίζεται για την παρασκευή οφθαλμικών και ρινικών φαρμάκων και φαρμάκων που σχετίζονται με ασθένειες του δέρματος και των αυτιών. Αυτός ο τύπος νερού απαιτεί όριο ενδοτοξίνη <0,25 μονάδες ενδοτοξίνης [EU] ανά χιλιοστόλιτρο (ml) (Sandle, 2017).

Νερό για έγχυση (Injection Water, WFI): Παράγεται είτε με αντίστροφη ώσμωση είτε με απόσταξη (σύμφωνα με το USP και Ph. Eur από το 2015). Χρησιμοποιείται στη παραγωγή παρεντερικών και άλλων παρασκευασμάτων. Το WFI πρέπει να καλύπτει όλες τις χημικές και μικροβιακές προδιαγραφές βακτηριακής ενδοτοξίνης. Επειδή οι ενδοτοξίνες παράγονται από τα Gram αρνητικά βακτήρια που μπορεί να έχουν επιμολύνει το νερό ή τον εξοπλισμό, οι διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία και διανομή του WFI θα πρέπει να σχεδιάζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να ελαχιστοποιείται ή να αποτρέπεται η μικροβιακή μόλυνση. Το όριο ενδοτοξίνης σε αυτή τη περίπτωση καθορίζεται ως <0.25 EU/ml (Hideharu, 2016).

#### **1.12.1. Μικροβιακή ποικιλότητα στο νερό που προορίζεται για τη χρήση σε φαρμακευτικά προϊόντα**

Το πόσιμο νερό από ιδιωτικές εταιρείες ύδρευσης ή δήμους παρακολουθείται για να διασφαλίσει ότι τα επίπεδα των χημικών ρύπων παραμένουν εντός των καθορισμένων κριτηρίων ασφάλειας και εξετάζεται για μικροοργανισμούς όπως *Escherichia coli*, εντερόκοκκοι, *Pseudomonas aeruginosa* κ.α. Αν και τα πιο καλά σχεδιασμένα συστήματα ύδατος μπορούν να διατηρηθούν σε κατάσταση ελέγχου, εντούτοις μπορούν να εμφανίσουν προβλήματα που σχετίζονται με την παρουσία μικροοργανισμών. Το σημαντικότερο πρόβλημα είναι οι σχηματισμοί βιουμενίων, σε μια επιφάνεια (όπως είναι οι σωληνώσεις με χαμηλό ρυθμό ροής). Πολλά στάδια της διαδικασίας καθαρισμού του νερού μπορούν να δημιουργήσουν συνθήκες οι οποίες, αν και έχουν σχεδιαστεί για να μειώνουν τους ρύπους, παραδόξως προάγουν το σχηματισμό βιουμενίων. Καθώς το νερό

διυλίζεται μέσω του φίλτρου, οι μικροοργανισμοί απορροφούνται πάνω στο πλέγμα, όπου σχηματίζουν βιουμένιο. Στο τέλος της διαδικασίας, η οποία ουσιαστικά μειώνει τα θρεπτικά συστατικά σε πολύ χαμηλά επίπεδα, δημιουργείται ένα ακραίο περιβάλλον. Αυτό το περιβάλλον προκαλεί ακραίες αντιδράσεις από τους υπάρχοντες μικροοργανισμούς, καθιστώντας δύσκολη την απομάκρυνσή τους.

Σε κατάλληλα σχεδιασμένα και συντηρημένα συστήματα, το καθαρό νερό και το WFI παρουσιάζουν χαμηλό κίνδυνο μικροβιακής μόλυνσης. Όποτε ανιχνεύονται μικροοργανισμοί (ειδικά όταν βρίσκονται πάνω από τις προδιαγραφές), δημιουργείται σημαντικός κίνδυνος (Sandle, 2017).

### **1.13. Πυρετογόνος ουσίες από Gram θετικά βακτήρια.**

Εκτός από την ενδοτοξίνη υπάρχουν και άλλες μορφές μικροβιακών πυρετογόνων. Ο βαθμός στον οποίο αυτά επικρατούν σε φαρμακευτικά περιβάλλοντα (ή βρίσκονται σε επίπεδα που μπορεί να προκαλέσουν πυρετογόνο απόκριση) είναι ένα ζήτημα που τίθεται υπό συζήτηση. Τα κύρια πυρετογόνα συστατικά που εμφανίζονται σε Gram θετικά βακτήρια είναι τα λιποθειικά οξέα (LTA), τα οποία για παράδειγμα βρίσκονται στον *Staphylococcus aureus*. Τα LTA αντιπροσωπεύουν μια «ενδοτοξίνη» των θετικά κατά Gram βακτηρίων, η οποία είναι μια τοξίνη που εκκρίνεται στο περιβάλλον μέσω της λύσης των κυττάρων (YuFukase και συνεργάτες, 1992). Οι εξωτοξίνες, όπως αυτές που εκκρίνονται από το γένος *Streptococcus* μπορούν επίσης να θεωρηθούν πυρετογόνες ουσίες (Hauser και συνεργάτες, 1991). Οι εξωτοξίνες μπορούν να προκαλέσουν σύνδρομο τοξικού σοκ (TSS), που χαρακτηρίζεται από καταπληξία, πυρετό. Η περισσότερη χαρακτηρισμένες εξωτοξίνες ανήκουν σε μια κατηγορία πυρετογόνων εξωτοξινών που παράγονται από τα βακτήρια *Staphylococcus aureus* και *Streptococcus pyogenes* (Sandle, 2016).

Μια άλλη ουσία που μπορεί επίσης να θεωρηθεί πυρετογόνος είναι η πεπτιδογλυκάνη, κοινή τόσο στα Gram αρνητικά, όσο και στα Gram θετικά βακτήρια που βρίσκεται στο κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων. Η πεπτιδογλυκάνη είναι ένα μακρομόριο που περιβάλλει το κύτταρο και παρόλο που δεν είναι αποδεδειγμένα πυρετογόνος, όταν τα Gram θετικά βακτήρια βρίσκονται σε μεγάλους βαθμούς μπορεί να προκαλέσει πυρετογόνο απόκριση (Sandle, 2016).



#### **1.14. Σκοπός της παρούσας εργασίας.**

Οι ενδοτοξίνες, που είναι ένα σύμπλεγμα λιποπολυσακχαριτών (LPS) και βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη των αρνητικά κατά Gram βακτηρίων αποτελούν σημαντικούς μολυσματικούς παράγοντες διάφορων φαρμακευτικών προϊόντων. Οι ενδοτοξίνες είναι δυνατό να απελευθερώνονται κατά τη λύση της κυτταρικής μεμβράνης του βακτηρίου μολύνοντας με αυτό το τρόπο διάφορες βιολογικά δραστικές ουσίες. Στη Βιομηχανία Φαρμάκων ενδοτοξίνες μπορεί να βρεθούν τόσο στο τελικό προϊόν, όσο και στη γραμμή παραγωγής αυτού. Έχει αποδειχθεί από πλήθος ερευνών ότι οι ενδοτοξίνες είναι πολύ σταθερά μόρια και δεν καταστρέφονται με τη θερμοκρασία, έχει ως αποτέλεσμα να είναι ανθεκτικές στις περισσότερες διεργασίες αποστείρωσης. Επίσης σε περίπτωση που το ανθρώπινο σώμα εκτεθεί συστηματικά σε LPS μπορεί να εμφανιστεί φλεγμονώδης αντίδραση με αποτέλεσμα να εμφανιστούν πολλαπλές παθοφυσιολογικές επιδράσεις στον ξενιστή που εισέρχονται. Συνεπώς, η αποτελεσματική ανίχνευση των αρνητικά κατά Gram βακτηρίων που μπορούν να αναπτυχθούν στη γραμμή παραγωγής φαρμακευτικών προϊόντων με δυνατότητα απελευθέρωσης ενδοτοξίνης αποτέλεσε τον κύριο στόχο της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας. Σε αυτή την κατεύθυνση έπρεπε να εφαρμοστεί η κατάλληλη μεθοδολογία για την προετοιμασία των δειγμάτων των δειγμάτων από τους χώρους παραγωγής των φαρμακευτικών προϊόντων για τη δοκιμασία Limulus Amebocyte Lysate-gel clot που στοχεύει στην ανίχνευση των ενδοτοξινών. Παράλληλα έγινε και καθαρισμός των λιποπολυσακχαριτών που ανιχνεύτηκαν στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια χρησιμοποιώντας δύο προσεγγίσεις προκειμένου να γίνει η επιλογή της πιο αποτελεσματικής.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

### ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 2.1. Δειγματοληψία.

Κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν τέσσερις δειγματοληψίες στις ημερομηνίες που αναγράφονται στον Πίνακα 2.1. Τα δείγματα προήλθαν από φαρμακευτική βιομηχανία. Συγκεκριμένα αφορούσαν περιβαλλοντικά δείγματα που προήλθαν τόσο από χώρους παραγωγής στείρων προϊόντων όσο και από χώρους παραγωγής μη στείρων προϊόντων. Επίσης για τη μελέτη ανίχνευσης ενδοτοξινών μελετήθηκαν δείγματα νερού προερχόμενα από διάφορα στάδια κατά τη διαδικασία επεξεργασίας τους στη βιομηχανία. Η δειγματοληψία έγινε τις χρονικές περιόδους που αναγράφονται στον (Πίνακα 2.1).

**Πίνακας 2.1.** Ημερομηνίες δειγματοληψίας

|                              | Ημερομηνίες     |
|------------------------------|-----------------|
| 1 <sup>η</sup> δειγματοληψία | Νοέμβριος 2018  |
| 2 <sup>η</sup> δειγματοληψία | Δεκέμβριος 2018 |
| 3 <sup>η</sup> δειγματοληψία | Απρίλιος 2019   |
| 4 <sup>η</sup> δειγματοληψία | Ιούνιος 2019    |

##### 2.1.1. Περιγραφή δειγμάτων

Τα περιβαλλοντικά δείγματα από τους χώρους παραγωγής συλλέχτηκαν με δύο τρόπους. Η πρώτη κατηγορία δειγμάτων προς ανάλυση αφορά δείγματα αέρα σε τρυβλία Petri (Εικόνα 2.1) που είχαν εκτεθεί για δεδομένο χρονικό διάστημα (3 ημέρες) σε διάφορους χώρους της εταιρίας. Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών του αέρα ήταν το Tryptic Soya Agar (TSA) και τα δείγματα αυτά επωάστηκαν στη συνέχεια για 48 ώρες στους 37 °C. Η δεύτερη κατηγορία δειγμάτων αφορά στους μικροοργανισμούς από επιφάνειες των χώρων παραγωγής της

βιομηχανίας. Η συλλογή αυτών των δειγμάτων έγινε χρησιμοποιώντας τρυβλία επαφής (rodac plates) (Εικόνα 2.2) ενώ το θρεπτικό υπόστρωμα ήταν TSA με αδρανοποιητές (Tryptic Soya Agar) (Κεφάλαιο 2.3.1) και ο χρόνος επώασης ήταν επίσης 48 ώρες στους 37 °C. Δεδομένου ότι, πριν τη λειτουργία του χώρου όλες οι επιφάνειες είχαν καθαριστεί και απολυμανθεί με κατάλληλα απολυμαντικά, η χρήση του TSA με αδρανοποιητές γίνεται για να εξουδετερωθεί η δράση υπολειμμάτων του απολυμαντικού στις επιφάνειες. Η μη χρήση TSA με αδρανοποιητές πιθανώς να μας δώσει ψευδή αποτελέσματα.



**Εικόνα 2.1.** Τρυβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα TSA



**Εικόνα 2.2.** Τρυβλία επαφής (rodac plates) με θρεπτικό υπόστρωμα TSA

### 2.1.2. Δείγματα νερού

#### 2.1.2.1. Τρόπος συλλογής δειγμάτων νερού

Σε κάθε δειγματοληψία συλλέχθηκε όγκος νερού 120 ml και η συλλογή των δειγμάτων έγινε σε πλαστικά αποστειρωμένα δοχεία τελικού όγκου 200 ml.

Τα σημεία δειγματοληψίας ήταν :

1. Μετά την κατιοντική στήλη
2. Μετά την ανιοντική στήλη
3. Μετά τη μικτή στήλη ( Mixed Bed)
4. Μετά τη λάμπα UV

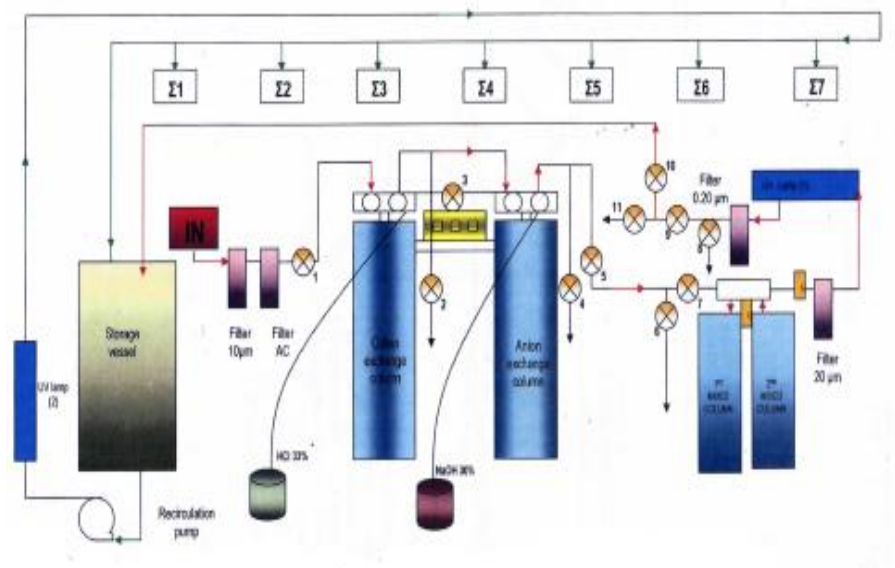
Τα δείγματα διατηρήθηκαν στους 8 °C και μελετήθηκαν εντός 24 ωρών.

#### **2.1.2.2. Συχνότητα συλλογής δειγμάτων**

Συλλογή δειγμάτων πραγματοποιείται κατά την εγκατάσταση της μονάδας του νερού ή μετά από κάθε αλλαγή, η κρισιμότητα της οποίας αξιολογείται κάθε φορά μέσω προγράμματος όπου ελέγχει το φορτίο, όπου και ορίζονται οι απαραίτητες ενέργειες.

#### **2.1.2.3. Περιγραφή της μονάδας νερό από όπου συλλέχτηκαν τα προς μελέτη δείγματα νερού.**

Η μονάδα αποτελείται κατά βάση από μια κατιοντική, μια ανιοντική και μια στήλη μικτής κλίνης (Εικόνα 2.3). Η τροφοδοσία γίνεται με νερό πόλης που ακολουθεί την εξής διαδρομή. Τι νερό πόλης αρχικά περνάει από φίλτρο κατακράτησης σωματιδίων 10 μm μετά από φίλτρο ενεργού άνθρακα και κατά σειρά περνάει από την κατιοντική στήλη, την ανιοντική στήλη και τη μικτή. Στη συνέχεια περνάει από φίλτρο κατακράτησης σωματιδίων 20 μm, από λάμπα UV και από φίλτρα κατακράτησης μικροβίων 0,2 μm. Το νερό συλλέγεται σε μια δεξαμενή συλλογής, περνάει από αντλία και από UV. Το απιοντισμένο νερό περνάει από τα 7 σημεία χρήσης της παραγωγής και συλλέγεται σε μια δεξαμενή συλλογής. Το νερό πόλης ελέγχεται σύμφωνα με τις προδιαγραφές ελέγχου νερού πόλης και όχι από τη μονογραφία του purified water (European Pharmacopoeia 9.4).



**Εικόνα 2.3.** Σχηματική απεικόνιση μονάδας παραγωγής και δικτύου διανομής απιονισμένου νερού.

## 2.2. Επεξεργασία δειγμάτων.

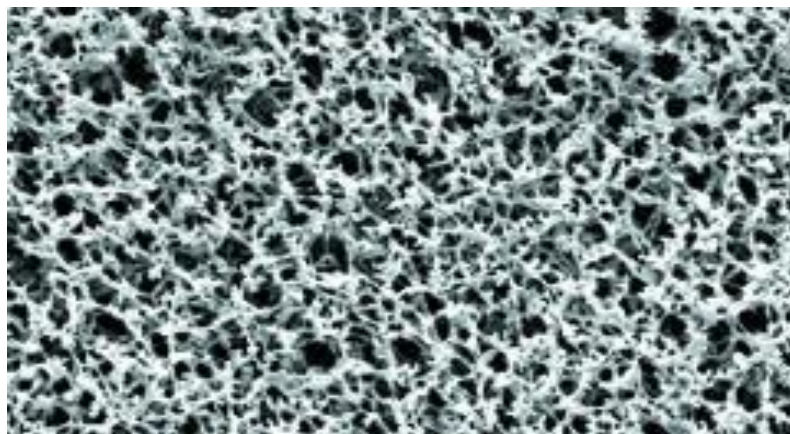
### 2.2.1. Απομόνωση βακτηρίων περιβαλλοντικών δειγμάτων

Από τα τρυβλία που προήλθαν από τους στείρους χώρους, από τους μη στείρους αλλά και από τα τρυβλία επαφής έγινε απομόνωση των αποικιών που είχαν αναπτυχθεί σε αυτά σε καθαρή καλλιέργεια. Με αποστειρωμένο κρίκο εμβολιασμού έγινε απομόνωση όλων των αποικιών που είχαν αναπτυχθεί στο θρεπτικό υπόστρωμα και έγινε ανακαλλιέργεια αυτών σε TSA θρεπτικό υπόστρωμα. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν για 48 ώρες στους 37°C.

### 2.2.2. Απομόνωση βακτηρίων από τα δείγματα νερού

Δείγματα νερού διηθήκαν υπό κενό, σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης (mixed cellulose esters membranes, Whatman) με διάμετρο πόρων 0,2 µm (Εικόνα 2.4 ). Οι μεμβράνες αυτές αφήνουν το νερό να διαχυθεί διαμέσου αυτών ενώ επίσης συγκρατούν τους μικροοργανισμούς σε όλο το πάχος της μεμβράνης. Οι συσκευές διήθησης πλύθηκαν με

αποσταγμένο και απιονισμένο νερό στο εργαστήριο και απολυμάνθηκαν με χρήση διαλύματος αιθανόλης 70% (v/v) και ακτινοβολίας UV για 30 λεπτά. Οι κωνικές φιάλες αποστειρώθηκαν σε θερμοκρασία 121 °C και σε πίεση 1 atm για 30 λεπτά.

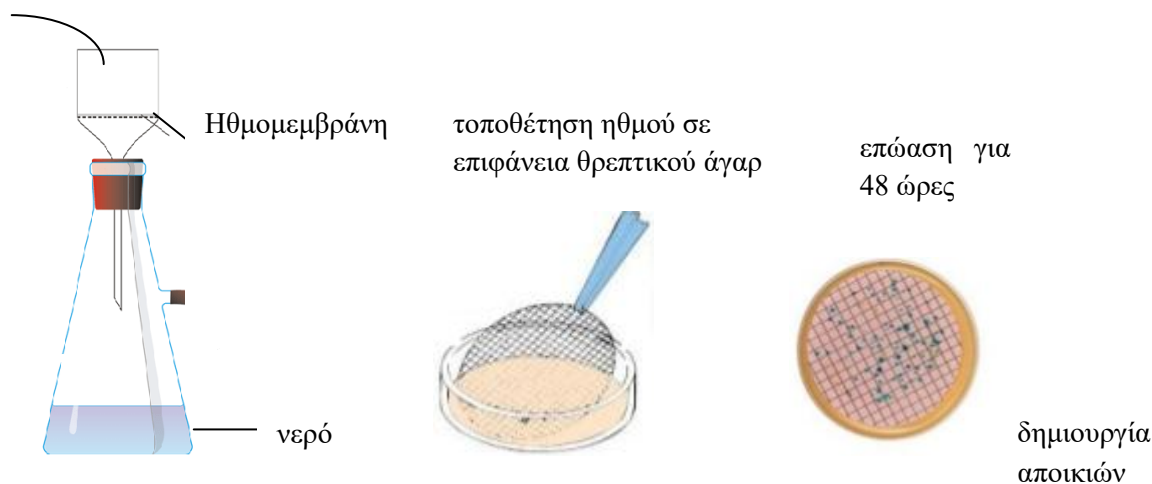


**Εικόνα 2.4.** Επιφάνεια μεμβράνης εστέρων κυτταρίνης (<http://www.whatman.com>)

#### **2.2.2.1. Προσδιορισμός του πληθυσμού των μικροοργανισμών σε δείγματα νερού.**

Ο προσδιορισμός του ολικού πληθυσμού σε εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα πραγματοποιήθηκε με διήθηση δείγματος όγκου 120 ml σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης με διάμετρο πόρου 0,2  $\mu\text{m}$ . Οι μεμβράνες τοποθετήθηκαν πάνω στα εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα, R2A και NA. Οι καλλιέργειες επωάστηκαν σε θερμοκρασία 37 °C για 48 ώρες (Εικόνα 2.5). Στη συνέχεια απομονώθηκαν οι αποικίες που είχαν αναπτυχθεί επάνω στη μεμβράνη και έγινε ανακαλλιέργεια αυτών στα ίδια θρεπτικά υπόστρωμα. Το θρεπτικό υπόστρωμα R2A Agar επιλέχθηκε καθώς θεωρείται ιδανικό θρεπτικό για την ανάπτυξη βακτηρίων από πόσιμο νερό (nelabservices.com) ενώ το NA θεωρείται ως ένα γενικού τύπου θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη βακτηρίων.

πρόσθεση  
νερού



**Εικόνα 2.5.** Μέθοδος ηθμομεμβράνης

## **2.3. Θρεπικά υποστρώματα**

### **2.3.1. Tryptone Soya Agar (TSA)**

Περιέχει (g/l): τρυπτόνη 15,0, πεπτόνη σόγιας 5,0, NaCl 5,0 - άγαρ 15,0. pH  $7.3 \pm 0,2$  στους 25 °C (Atlas, 1993)

### **2.3.2. Luria Broth (LB)**

Περιέχει (g/l): εκχύλισμα ζύμης 5,0, τρυπτόνη 10,0, NaCl 5,0. pH  $7,3 \pm 0,2$  στους 25 °C . (Atlas, 1993)

### **2.3.3. Nutrient Agar (NA)**

Περιέχει (g/l): πεπτόνη 5,0, εκχύλισμα κρέατος 1,0, εκχύλισμα ζύμης 2,0, NaCl 5,0 – άγαρ 15,0, pH  $7,4 \pm 0,2$  στους 25 °C (Atlas, 1993).

### **2.3.4 R2A Agar**

Περιέχει (g/l): εκχύλισμα ζύμης 0,5, πεπτόνη προτεόζης 0,5, casamino acid 0,5, γλυκόζη 0,5, διαλυτό άμυλο 0,5, πυροσταφυλικό νάτριο 0,3,  $MgSO_4$  0,05, άγαρ 15,0, pH  $7,2 \pm 0,2$  στους 25 °C (Reasoner και Geldreich 1985).

## **2.4. Χημικά και ρυθμιστικά διαλύματα**

### **2.4.1. Φωσφορικό Νάτριο- $\text{NaPO}_4$ (50mM)**

Περιέχει (g/l) 0,9 g  $\text{NaPO}_4$  σε 0,1 l (MBG -Applichem)

### **2.4.2. Οξικό Νάτριο - $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ (5M)**

Περιέχει (g/l) 0,5 g σε 0,1 l (MBG -Applichem)

### **2.4.3. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (5Mm)**

Περιέχει (g/l) 0,15 g σε 0,1 l pH 7,4  $\pm$ 0,2 (MBG -Applichem)

### **2.4.4. Χλωριούχο Μαγνήσιο - $\text{MgCl}_2$ (20mM)**

Περιέχει (g/l) 0,4 g σε 0,1 l (MBG -Applichem)

### **2.4.5. Tris-HCl (10Mm)**

Περιέχει (g/l) 0,16 g σε 0,1 l (MBG -Applichem)

### **2.4.6. Phosphate-buffered saline (PBS)**

Περιέχει (g/l) 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,24 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Thermo Fisher).

### **2.4.7. Διάλυμα γλυκερόλης 30% (w/v)**

Περιέχει 20,0 g γλυκερόλης σε 100 ml αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό. (Wellington και Williams, 1978).

### **2.4.8. Διάλυμα αλάτων Ringer (1/4)**

Περιέχει (g/l) NaCl 2,15 g, KCl 0,15 g,  $\text{CaCl}_2$  0,075 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,5 g (Wellington και Williams, 1978).

### **2.4.9. Διάλυμα λύσης βακτηριακών κυττάρων- Lysis buffer 25mM**

Περιέχει 25 Mm EDTA (MBG), 13,3% w/v σακχαρόζη (MBG) σε αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. pH 8 στους 25 °C. Αποστείρωση για 15 min. Η λυσοζύμη προστίθεται ακριβώς πριν τη χρήση σε συγκέντρωση 10mg/ml (Hopwood και συνεργάτες 1985).



#### **2.4.10. Διάλυμα TAE (1x)**

Περιέχει 0,04 M Tris-acetate, 0,001 M EDTA, pH 8. Το διάλυμα παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση 50 φορές μεγαλύτερη (50x) από το διάλυμα εργασίας (1x) και συντηρήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα παρασκευάστηκε λίγο πριν την ηλεκτροφόρηση με ανάλογη αραίωση του 50x πυκνού διαλύματος. (Sambrook, και Russell 2001).

#### **2.4.11. Διάλυμα SDS (Sodium dodecyl sulfate) 10%**

Περιέχει 10 g SDS (Fisher Scientific), αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 100 ml.

#### **2.4.12. Διάλυμα οξικού καλίου 5M**

Περιέχει: 49,075 g  $\text{CH}_3\text{COOK}$  (Fisher Scientific), αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 100 ml. Αποστείρωση για 15 min.

#### **2.4.13. Διάλυμα Βρωμιούχου Αιθιδίου**

Περιέχει: 10 mg  $\text{ml}^{-1}$  βρωμιούχο αιθίδιο (Sigma), σε αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Το φιαλίδιο όπου αποθηκεύτηκε το διάλυμα καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο και το διάλυμα φυλάχθηκε σε θερμοκρασία δωματίου.

#### **2.4.14. Υδατικό διάλυμα αιθανόλης 70%**

Περιέχει ( $\text{ml l}^{-1}$ ) : 70 αιθανόλη.

#### **2.4.15. Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης**

Περιέχει : 0,25% (w/v) κυανού βρωμοφαινόλης (Sigma), 0,25 % (w/v) κυανολικό ξυλένιο (Sigma), 30% (w/v) γλυκερόλη. Το διάλυμα συντηρήθηκε στους 4 °C.

#### **2.4.16. Διάλυμα Κρυσταλλικού Ιωδίου (Crystal Violet)**

Διάλυμα A: crystal violet 20,0 g, αιθανόλη 99% 200 ml. Διάλυμα B: οξαλικό αμμώνιο 8,0 g, νερό 800 ml (American Society of Microbiology 1957).

#### **2.4.17. Διάλυμα Ιωδίου**

Περιέχει: ιώδιο 1,0 g, ιωδιούχο κάλιο (KI) 2,0 g, νερό 300 ml (American Society for Microbiology 1957).

#### **2.4.18. Διάλυμα αιθανόλης 99%**

#### **2.4.19. Διάλυμα Σαφρανίνης**

Περιέχει: 100 ml κορεσμένου αλκοολικού διαλύματος σαφρανίνης (2,5 g χρωστικής σε 100ml αιθανόλης) και 1000 ml νερό (American Society for Microbiology 1957).

#### **2.4.20. Control Standard Endotoxin (CSE).**

Η βασική ενδοτοξίνη ελέγχου είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο πρότυπο για δοκιμές ενδοτοξίνης. Είναι εκχύλισμα από *E. coli* O<sub>113</sub>:H<sub>10</sub>. Έχει προκαθορισμένη ποσότητα ενδοτοξίνης, όπως περιγράφεται στο Πιστοποιητικό Ανάλυσης (Certificate of Analysis – CoA).(U.S. Pharmacopoeia Convention, Inc., Rockville, MD 20852). Η λυοφιλιωμένη ενδοτοξίνη προετοιμάζεται σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονται στη συσκευασία και σύμφωνα με το CoA με ανασύσταση με LRW. Γίνεται αραίωση στη συνέχεια για συγκέντρωση 1 EU/ml.

#### **2.4.21. LAL Reagent**

Το αντιδραστήριο LAL (προϊόν λύσης του καβουριού *Limulus polyphemus*) είναι βιολογικής προέλευσης. Είναι ένα σύνθετο μείγμα ενζύμων και συν-παραγόντων. Η ενζυμική δραστηριότητα κάθε παρτίδας LAL αξιολογείται από τον κατασκευαστή χρησιμοποιώντας το Reference Standard Endotoxin (RSE, που παρέχεται από το FDA). Το προϊόν είναι λυοφιλιωμένο και γίνεται ανασύσταση του σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονται στη συσκευασία με LRW.

#### **2.4.22. LAL Reagent Water.**

Απιονισμένο αποστειρωμένο νερό, ελεύθερο ενδοτοξινών. Χρησιμοποιείται για την ανασύσταση του αντιδραστηρίου LAL και του CSE.

### **2.5. Βιοχημικές δοκιμασίες.**

Από τα βακτήρια που απομονώθηκαν σε καθαρή καλλιέργεια μελετήθηκαν περαιτέρω με μοριακές και άλλες τεχνικές μόνο εκείνα των οποίων τα αποτελέσματα όλων των βιοχημικών δοκιμών υποδείκνυαν πως ανήκουν στην ομάδα των Gram-αρνητικών βακτηρίων.

#### **2.5.1.1. Σχηματισμός ενδοσπορίων – «θερμικό σοκ»**

Με τη δοκιμασία αυτή εκτιμάται η ικανότητα ορισμένων μικροοργανισμών να σχηματίζουν ανθεκτικές μορφές οι οποίες να μπορούν να επιβιώνουν κάτω από δυσμενείς συνθήκες περιβάλλοντος. Με τη δοκιμασία του «θερμικού σοκ» γίνεται εκτίμηση του σχηματισμού ενδοσπορίων από τα βακτήρια. Η διαδικασία έχει ως εξής: 1,5 ml υγρής καλλιέργειας του βακτηρίου τοποθετούνται σε υδατόλουτρο 80 °C για 15 min. Κάτω από αυτές τις συνθήκες όλα τα βλαστικά κύτταρα καταστρέφονται, ενώ τα ενδοσπόρια επιβιώνουν. Σε σταθερό θρεπτικό υπόστρωμα γίνεται εμβολιασμός με μια σταγόνα από κάθε καλλιέργεια που τοποθετήθηκε στους 80 °C και εν συνεχεία ακολουθεί επώαση στους 30 °C για 24 h. Ο σχηματισμός υποδηλώνει τον σχηματισμό ενδοσπορίων (Καραγκούνη-Κύρτσου, 2001).

#### **2.5.1.2. Χρώση κατά Gram**

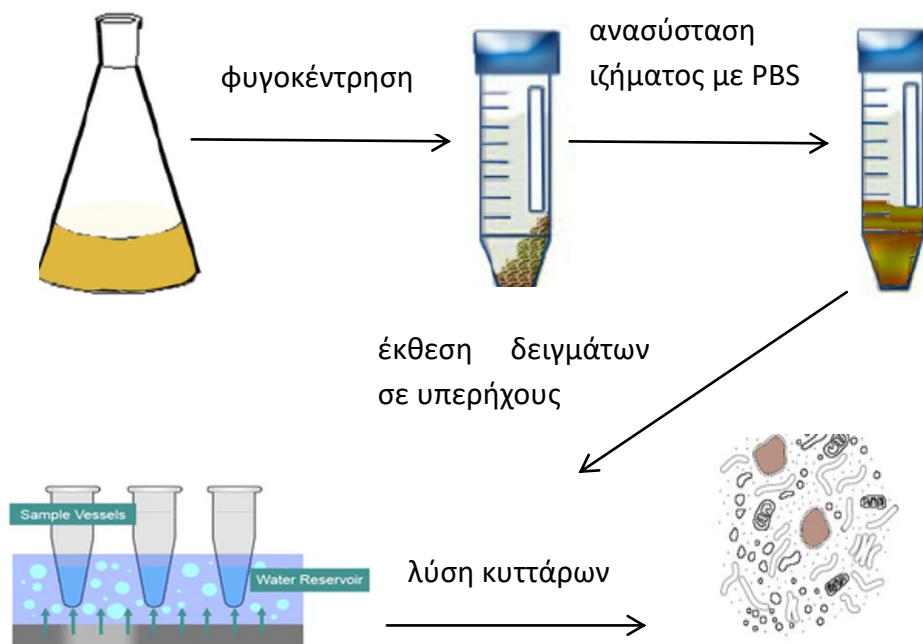
Τα βακτήρια που απομονώθηκαν ταξινομήθηκαν σε ομάδες ανάλογα με τα αποτελέσματα της χρώσης Gram. Σύμφωνα με αυτή τη χρώση τα κύτταρα βάφονται με κρυσταλλικό ιώδες και ιώδιο. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός συμπλόκου κρυσταλλικού ιώδους. Η δοκιμασία της χρώσης Gram εφαρμόστηκε όπως περιγράφεται στο Βιβλίο Εργαστηριακών Ασκήσεων Μικροβιολογίας (Καραγκούνη-Κύρτσου, 2001).

#### **2.6. Μέθοδος λύσης της κυτταρικής μεμβράνης με υπερήχους (Sonication).**

Χρησιμοποιούνται υπερηχητικές συχνότητες (>20 kHz), και η διαδικασία είναι γνωστή ως υπερηχητική (Robert και συνεργάτες 2008). Η συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε για τη λύση των κυττάρων με σκοπό την απελευθέρωση των ενδοτοξινών.

Αρχικά έγινε ανακαλλιέργεια των Gram αρνητικών βακτηρίων από στερεή καλλιέργεια σε 5 ml Luria Broth. Στη συνέχεια έγινε επώαση των κυττάρων για 24 ώρες 37 °C υπό ανάδευση στις 200 στροφές (rpm). Μετά το πέρας των 24 ωρών η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά στις 10.500 στροφές. Το ίζημα που προέκυψε από την φυγοκέντρηση φυλάχθηκε στους -20 °C για 24 ώρες. Ακολούθησε καθαρισμός του ιζήματος με Phosphate-buffered saline (PBS) ([www.diagenode.com/protocols](http://www.diagenode.com/protocols)). Ποσότητα 1 ml PBS προστέθηκε για την ανασύσταση του ιζήματος και στη συνέχεια το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 4000 στροφές. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε δυο φορές. Μεταξύ της πρώτης και δεύτερης φυγοκέντρησης

απομακρύνθηκε το υπερκείμενο που πρόκυψε. Μετά τη δεύτερη φυγοκέντρωση το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε άλλο σωλήνα και ακολούθησε η διαδικασία των υπερήχων. Η ισχύς καθορίστηκε στα 400 Watt για 15 λεπτά. Η υπερηχητική συσκευή που πραγματοποιήθηκε αυτή η διαδικασία ήταν σε υδατόλουτρο υπερήχων (bath sonicator). Έπειτα το δείγμα φυγοκεντρήθηκε και πάλι για 15 λεπτά στις 15.000 στροφές σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στους 4 °C.



**Εικόνα 2.6.** Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου λύσης της κυτταρικής μεμβράνης με τη βοήθεια των υπερήχων.

## 2.7. LAL test gel –clot method.

Η ανίχνευση ενδοτοξίνης έγινε από τα Gram αρνητικά βακτήρια από τα δείγματα ακολούθηθηκε η μέθοδος LAL gel-clot. Η ανίχνευση των ενδοτοξινών έγινε μέσω τυποποιημένης δοκιμασίας (kit) από τη εταιρία Endosafe (Endosafe Gel-Clot LAL from Charles River). Η δοκιμασία αυτή περιλαμβάνει το αντιδραστήριο LAL σε λυοφιλιωμένη μορφή, το δείγμα ενδοτοξίνης (Control Standard Endotoxi-CSE) επίσης σε λυοφιλιωμένη μορφή και νερό ελεύθερο ενδοτοξινών ( LAL Reagent Water-LRW) . Ακόμα για τη διεξαγωγή του πειράματος έγινε χρήση γυάλινων δοκιμαστικών σωλήνων ελεύθερα ενδοτοξινών με διαστάσεις 16x90 mm και 10x75 mm. Η μέτρηση των όγκων, που

απαιτούνταν πειραματικά έγινε χρήση γυάλινων πιπετών ελεύθερων πυρετογόνων των 10 ml, 2 ml και 1 ml. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες και τα σιφόνια αποτελούσαν μέρος της τυποποιημένης δοκιμασίας.

### 2.7.1. Ανασύσταση του μάρτυρα ενδοτοξίνης – CSE

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την ανίχνευση ενδοτοξινών στα δείγματα μας έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που δίνεται στην τυποποιημένη διαδικασία (Limulus Amebocyte Lysate ENDOSAFE U.S. License No. 1197).

Πριν τη προετοιμασία της «ενδοτοξίνης μάρτυρα» CSE ελέγξαμε το Πιστοποιητικό Ανάλυσης (Certificate of Analysis-CoA) στο οποίο αναγράφεται ο όγκος LRW που πρέπει να προστεθεί για την ανασύσταση του CSE.

1. Έγινε ανασύσταση του CSE με 5 ml LRW.
2. Στη συνέχεια έγινε vortex για 15 λεπτά
3. Αν η συγκέντρωση του CSE που δίνεται είναι 22 Eu/ml σύμφωνα με το CoA τότε η αραίωση για 1 Eu/ml γίνεται με τη παρακάτω διαδικασία.

Το CSE μετά την ανασύσταση μπορεί να φυλαχθεί στους 4 °C για 28 μέρες. Πριν από κάθε χρήση του CSE πρέπει να γίνεται vortex για 15 λεπτά.

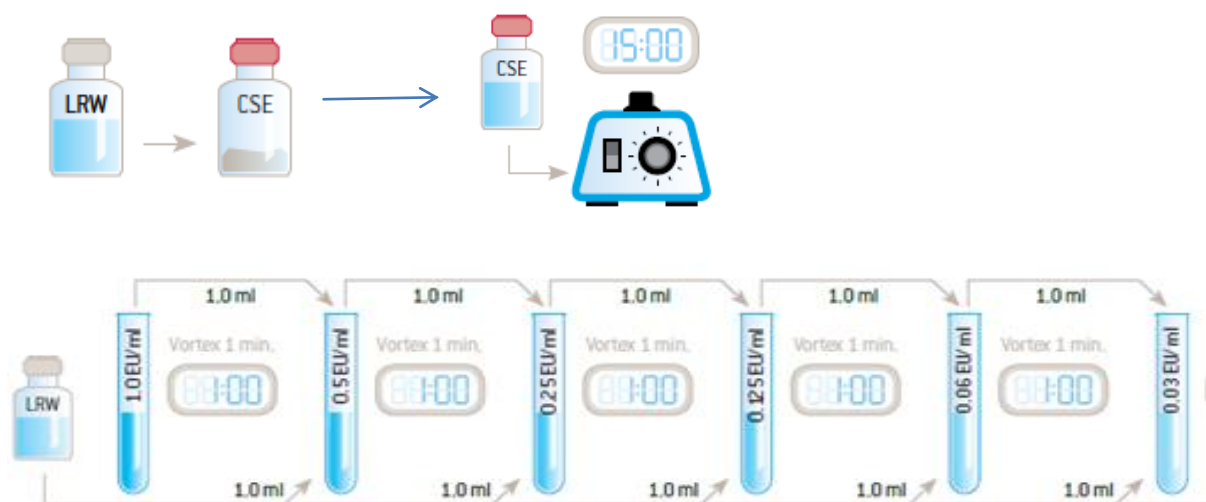
$$100 \mu\text{l CSE} + 2,1 \text{ ml από LRW} = 1 \text{ Eu/ml}$$

4. Μετά τη διαδικασία αραίωσης τα δείγματα προετοιμάζονται σύμφωνα με το παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.2). Μετά από κάθε αραίωση στο δείγμα γίνεται ισχυρή ανάδευση (vortex) για ένα λεπτό.

**Πίνακας 2.2.** Προετοιμασία και διαδοχικές αραιώσεις διαλυμάτων για τη δοκιμασία LAL.

| Διαδικασία αραίωσης   | Αναγνωριστικά | Αναγνωριστικά | Αναγνωριστικά |
|-----------------------|---------------|---------------|---------------|
| 0.1ml CSE +1.9 ml LRW | A             | 1             | 8λ            |
| 1 ml (A) + 1 ml LRW   | B             | 0,5           | 4λ            |
| 1 ml (B) + 1 ml LRW   | C             | 0,25          | 2λ            |

|                     |   |       |             |
|---------------------|---|-------|-------------|
| 1 ml (C) + 1 ml LRW | D | 0,125 | $\lambda$   |
| 1 ml (D) + 1 ml LRW | E | 0,06  | $\lambda/2$ |
| 1 ml (E) + 1 ml LRW | F | 0,03  | $\lambda/4$ |



**Εικόνα 2.7.** Σχηματική αναπαράσταση των διαλυμάτων και των διαδοχικών αραιώσεων για το LAL test gel clot method (Bioscience.lonza.com).

### 2.7.2 Ανασύσταση αντιδραστηρίου LAL

α. Η ανασύσταση του αντιδραστηρίου LAL έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονταν στη ετικέτα του Lysate.

β. Η ανασύσταση του προϊόντος έγινε με 1,2 ml LRW.

γ. Μετά την προσθήκη του LRW απαιτείται ομαλή ανάδευση του διαλύματος .

Το αντιδραστήριο LAL μετά την ανασύσταση μπορεί φυλαχθεί για 24 ώρες στους 2 °C - 8 °C ενώ για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στους -8 °C.

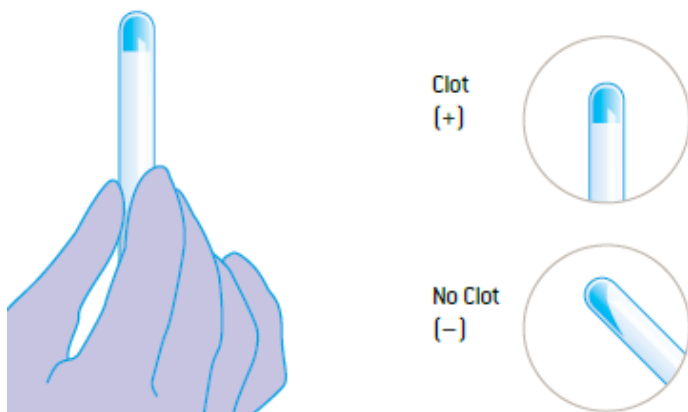
## 2.8. Προετοιμασία δειγμάτων για την μέθοδο ανίχνευσης βακτηριακής ενδοτοξίνης.

Η προετοιμασία των δειγμάτων προς μελέτη για την ανίχνευση ενδοτοξίνης έγινε σύμφωνα με το Πίνακα 2.3. Ως μάρτυρας θετικού αποτελέσματος θεωρείται το Positive Product Control καθώς και το Positive Water Control. Αντίθετα σαν αρνητικός μάρτυρας θεωρείται το Negative Water Control. Το δείγμα στο οποίο θα ανιχνευθεί η παρουσία ή όχι ενδοτοξίνης είναι αυτό που αναφέρεται ως Negative Product Control στο παρακάτω πίνακα. Το κάθε ένα από τα παρακάτω διαλύματα υπήρχε συνολικά 4 φορές προς αποφυγή σφάλματος κατά τη πειραματική διαδικασία.

**Πίνακας 2.3.** Προετοιμασία δειγμάτων για τον έλεγχο ανίχνευσης ενδοτοξίνης.

| Δοκιμή του προϊόντος         | LRW (μl) | CSE (μl) (4λ) | Δείγμα (μl) | Lysate( μl) | Αποτέλεσμα |
|------------------------------|----------|---------------|-------------|-------------|------------|
| Αρνητικό μάρτυρας νερού      | 100      | -             | -           | 100         | -Ve        |
| Αρνητικός μάρτυρας προϊόντος | 50       | -             | 50          | 100         |            |
| Θετικός μάρτυρας νερού       | 50       | 50            | -           | 100         | + Ve       |
| Θετικός μάρτυρας προϊόντος   | -        | 50            | 50          | 100         | +Ve        |

Μετά τη προετοιμασία των δειγμάτων σύμφωνα με το Πίνακα 2.3 τα δείγματα επωάζονται στο υδατόλουτρο στους 36 °C για 60 λεπτά. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος τα σωληνάρια με τα δείγματα περιστρέφονται 180 °C (Εικόνα 2.8). Αν παρατηρηθεί η δημιουργία πηκτώματος τότε το αποτέλεσμα θεωρείται θετικό ως προς την ύπαρξη ενδοτοξίνης. Αντίθετα αν το διάλυμα στα σωληνάρια είναι ρευστό τότε το αποτέλεσμα θεωρείται αρνητικό και το δείγμα είναι καθαρό από ενδοτοξίνες.



**Εικόνα 2.8.** Θετικό και αρνητικό αποτέλεσμα μετά τη μέθοδο LAL- gel clot (Bioscience.lonza.com).

## 2.9. Εκχύλιση και καθαρισμός των LPS.

Τα LPS εκχυλίστηκαν με τη μέθοδο ζεστής φαινόλης- νερού (hot phenol-water method) και τη μέθοδο χλωροφορμίου-μεθανόλης (chloroform-methanol method).

### 2.9.1. Προετοιμασία των βακτηριακών καλλιιεργειών για την εκχύλιση των LPS με τη μέθοδο ζεστής φαινόλης-νερού (Michael και συνεργάτες, 2012).

- 1) Τα βακτήρια αναπτύχθηκαν σε 5 ml καλλιιεργειας (Luria Broth -LB) και επώαστηκαν για 24 ώρες υπό ανάδευση στους 37 °C στις 200 rpm.
- 2) Έγινε αραίωση της καλλιιεργειας 1:10 με LB και στη συνέχεια έγινε η ανάγνωση OD<sub>600</sub> σε φασματοφωτόμετρο. Με βάση την τιμή στα OD<sub>600</sub> πραγματοποιήθηκε εναιώρημα βακτηρίων 1,5 ml με OD<sub>600</sub> 0,5.
- 3) Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 11.000 rpm για 15 λεπτά και στη συνέχεια αφαιρέθηκε το υπερκείμενο που πρόκυψε. Σε αυτή τη φάση αν η εκχύλιση των LPS δεν πραγματοποιηθεί αμέσως το ίζημα των κυττάρων μπορεί να αποθηκευτεί στους -20 °C.

#### 2.9.1.1. Εκχύλιση LPS

- 1) Αρχικά παρασκευάστηκε ένα ρυθμιστικό διάλυμα 2x SDS. Για αυτό παρασκευάστηκε διάλυμα 50 ml με 4% β-μερκαπτοαιθανόλη (BME), 4% SDS και 20% γλυκερόλη σε 0,1M Tris-HCl με pH 6.8. Σε αυτό προστέθηκε μια μικρή ποσότητα μπλε βρωμοφαινόλης για να χρωματιστεί το διάλυμα. Από το διάλυμα 2x



SDS με αραιώση 1:1 με αποστειρωμένο νερό παρασκευάστηκε και ένα δεύτερο ρυθμιστικό διάλυμα συγκέντρωσης 1x SDS.

- 2) Παρασκευάστηκαν τρία ξεχωριστά διαλύματα DNase, RNase και Proteinase K με συγκέντρωση 10 mg/ml σε αποστειρωμένο νερό.
- 3) Το ίζημα των κυττάρων που προέκυψε μετά τη φυγοκέντρωση επαναιωρήθηκε σε 200  $\mu$ l από το 1x SDS ρυθμιστικό διάλυμα. Με τη χρήση της πιπέτας το ίζημα διαλύεται πλήρως στο ρυθμιστικό διάλυμα.
- 4) Το εναιώρημα των κυττάρων θερμάνθηκε σε θερμοκρασία βρασμού σε υδατόλουτρο για 15 λεπτά και στη συνέχεια αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να κρυώσει για άλλα 15 λεπτά.
- 5) Προστέθηκαν 5  $\mu$ l από τα διαλύματα RNase και DNase και τα δείγματα επώστηκαν στους 37 °C για 30 λεπτά.
- 6) Στη συνέχεια προστέθηκαν και 10  $\mu$ l από το διάλυμα Proteinase K και ακολούθησε επώαση των δειγμάτων στους 59 °C για 24 ώρες.
- 7) Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 200  $\mu$ l από παγωμένη Tris- κορεσμένη φαινόλη ( cold Tris- saturated phenol) και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση για 20 λεπτά.
- 8) Τα δείγματα επώστηκαν στους 65 °C για 15 λεπτά με περιστασιακή ανάδευση σε vortex. Με το πέρας του χρόνου επώασης τα δείγματα παρέμειναν στους 25 °C μέχρι να κρυώσουν και σε αυτά προστέθηκε 1 ml διαιθυλαιθέρα (25 °C) . Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση για 10 λεπτά.
- 9) Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στις 11.000 rpm για 15 λεπτά. Από τη φυγοκέντρωση προέκυψε διφασικό διάλυμα με τη κάτω φάση να έχει μοβ χρώμα ( φάση στην οποία υπάρχουν τα LPS) και τη πάνω φάση κίτρινο (φάση που αποτελείται από φαινόλη και διαιθυλαιθέρα). Με τη βοήθεια μιας πιπέτας πάρθηκε η ποσότητα της κάτω φάσης και φυλάχθηκε σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα.
- 10) Τα βήματα 2 g-2i επαναλήφθηκαν για ακόμα μια φορά ώστε να απομακρυνθεί όλη η ποσότητα της φαινόλης από τη μοβ φάση που περιέχονται τα LPS.
- ια) Τέλος πριν την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE στα δείγματα προστίθενται 200  $\mu$ l από το 2 x SDS ρυθμιστικό διάλυμα.

### **2.9.2. Προετοιμασία των βακτηριακών καλλιέργειών για την εκχύλιση των LPS με τη μέθοδο χλωροφορμίου- μεθανόλης. (Rastegar και συνεργάτες 2011)**

Η μέθοδος για τις καλλιέργειες προετοιμάστηκαν με τον ίδιο τρόπο με αυτόν στη μέθοδο ζεστής φαινόλης-νερού

- 1) 2 ml καλλιέργειας μεταφέρθηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν
- 2) Το υπερκείμενο που προκύπτει από τη φυγοκέντρωση αφαιρείται και στο ίζημα προστίθενται 2 ml αιθανόλης 95% και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση με vortex μέχρι να διαλυθεί το ίζημα στην αιθανόλη.
- 3) Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 2000 rpm για 10 λεπτά, αφαιρείται το υπερκείμενο και στο ίζημα προστίθενται ξανά 2 ml αιθανόλης. Συνολικά αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές.
- 4) Μετά τη τρίτη φορά καθαρισμού του ιζήματος με αιθανόλη το υπερκείμενο αφαιρείται και πάλι και το ίζημα τοποθετείται κάτω από θάλαμο μέχρι να εξατμιστεί εντελώς η αιθανόλη.
- 5) Το ξηρό ίζημα επαναδιαλύεται σε 1 ml EDTA 10% και στη συνέχεια τοποθετείται σε υδατόλουτρο με υπερήχους ( bath sonicator) στα 400W για 15 λεπτά.
- 6) 1 mL από κορεσμένο διάλυμα μεθανόλης / χλωροφορμίου ( 1:2 αναλογία) προστίθεται στο διάλυμα βακτηρίων- EDTA.
- 7) Το διάλυμα ανακινείται για 2 ώρες και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 2000 rpm για 10 λεπτά. Μετά και από τη φυγοκέντρωση έχουν σχηματιστεί στο διάλυμα τρεις φάσεις: στη πάνω φάση βρίσκεται η μεθανόλη, στη μεσαία η βιομάζα και κάτω φάση το χλωροφόρμιο.

Η φάση με τη μεθανόλη και η φάση με το χλωροφόρμιο αφαιρούνται και μεταφέρονται σε γυάλινα σκεύη όγκου 15 και 20 ml και τοποθετούνται στο θάλαμο μέχρι να εξατμιστεί εντελώς το υγρό. Το ίζημα που προκύπτει μετά την εξάτμιση είναι ξηρά LPS. Πριν την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης το ίζημα επαναδιαλύεται σε 2 ml αποστειρωμένο PBS.

Αμέσως μετά την εκχύλιση των λιποπρωτεϊνών ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE) και στη συνέχεια χρώση των πηκτωμάτων με διάλυμα Coomassie Brilliant Blue και με διάλυμα νιτρικού αργύρου.

## **2.10. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης με αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).**

Η αναλυτική μέθοδος SDS-PAGE, χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση το μέγεθός του σωματιδίου, χωρίς να αξιοποιεί καμιά άλλη φυσική ιδιότητα και χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του βάρους μοριακών των πρωτεϊνών. Αρχικά, πραγματοποιείται μετουσίωση πρωτεϊνών έτσι ώστε να μην έχει δευτεροταγή, τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή.

Το SDS (δωδεκυλο-σουλφονικό νάτριο) έχει την ιδιότητα να διαλύει τα υδροφοβικά μόρια και έχει αρνητικό φορτίο. Με αυτό το τρόπο όλες οι προς μέτρηση πρωτεΐνες αποκτούν αρνητικό φορτίο με αποτέλεσμα να μετακινούνται προς τον θετικό πόλο με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου. Εφόσον οι πρωτεΐνες κινηθούν λόγω του φορτίου που έχουν αποκτήσει, θα κινηθούν όλες με τον ίδιο ρυθμό χωρίς να υφίστανται κανένα διαχωρισμό λόγω μεγέθους. Προστίθεται πήκτωμα με μονομερή ακρυλαμίδιου για να επιτευχθεί διαχωρισμός. Με την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες κινούνται διαμέσου των πόρων του gel πολυακρυλαμίδιου. Η ταχύτητα της μετακίνησης και κατ' επέκταση η τελική απόσταση που θα διανύσουν εξαρτάται από το μέγεθος του μορίου ( τα μικρά μόρια διανύουν μεγαλύτερη απόσταση σε σχέση με τα μεγαλύτερα) ( [www.mbl.com](http://www.mbl.com) MBL, life science)

Χρησιμοποιήθηκαν συσκευές κατακόρυφης ηλεκτροφόρησης και η κατεργασία κάθε δείγματος έγινε με προσθήκη κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος SDS 4%. Ακολούθησε βρασμός των δειγμάτων για περίπου 5 λεπτά. Η ηλεκτροφόρηση επιτελείται σε δυο διαδοχικά πηκτώματα: ένα πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel), στο οποίο τοποθετούνται τα δείγματα και ένα πήκτωμα διαχωρισμού (separating ή resolving gel), το οποίο ακολουθεί ακριβώς κάτω από το πήκτωμα πακεταρίσματος. Στην παρούσα εργασία παρασκευάστηκε το πήκτωμα με συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης 12%-6% αντίστοιχα για το πήκτωμα διαχωρισμού και το πήκτωμα πακεταρίσματος (Cornell University).

Τέλος χρησιμοποιήθηκε πρότυπο πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (BlueStar Prestained Protein Marker)

**Πίνακας 2.4.** Πήκτωμα διαχωρισμού 12% για την SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| H <sub>2</sub> O        | 3,4 ml |
| Ακρυλαμίδη (30%)        | 4 ml   |
| 1.5 M Tris-HCL (pH 8.8) | 2,5 ml |
| SDS (20%)               | 50 μl  |
| APS (10%)               | 100 μl |
| TEMED                   | 10 μl  |

**Πίνακας 2.5.** Πήκτωμα πακεταρίσματος 6% για την SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| H <sub>2</sub> O        | 2,7 ml |
| Ακρυλαμίδη (30%)        | 0,8 ml |
| 1,5 M Tris-HCL (pH 8,8) | 0,5 ml |
| SDS (20%)               | 20 μl  |
| APS (10%)               | 40 μl  |
| TEMED                   | 4 μl   |

Το δείγμα τοποθετήθηκε στον ενδιάμεσο χώρο που σχηματίζεται από ένα ζεύγος γυάλινων πλακών της συσκευής ηλεκτροφόρησης και η ελεύθερη επιφάνειά του καλύφθηκε με διάλυμα αιθανόλης. Το πήκτωμα αφέθηκε να πολυμερισθεί για τουλάχιστον 1 ώρα. Στη συνέχεια, αφού αφαιρέθηκε το διάλυμα αιθανόλης, προστέθηκε το πήκτωμα πακεταρίσματος και αφέθηκε να πολυμερισθεί για 45 λεπτά. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν για περίπου 1 ώρα και 30 λεπτά στα 120V.

#### **2.10.1. Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με κολλοειδές διάλυμα Coomassie Brilliant Blue**

Η χρώση με κολλοειδές διάλυμα Coomassie Brilliant Blue είναι μία μη - ειδική αντιστρεπτή διαδικασία χρώσης που γίνεται συνήθως μετά την ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου SDS-PAGE (Rezania και συνεργάτες, 2011). Η σύσταση του διαλύματος είναι παρακάτω.

## **Κολλοειδές διάλυμα Coomassie Brilliant Blue**

0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250

9 όγκοι μεθανόλη

9 όγκοι H<sub>2</sub>O

2 όγκοι οξικού οξέως

Τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης, μετά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων, εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα Coomassie Brilliant Blue G και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για χρονικό διάστημα ~12-16 h υπό συνεχή ανάδευση. Με το πέρασ της επώασης το πήκτωμα αποχρωματίστηκε με συνεχείς πλύσεις σε ίδιο διάλυμα αλλά απουσία την χρωστικής Coomassie Brilliant Blue.

### **2.10.2. Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με διάλυμα νιτρικού αργύρου**

Ακολούθησε η χρώση των πηκτωμάτων, η οποία περιλαμβάνει με πλύσεις διαφορετικά διαλύματα με σκοπό την εμφάνιση των ζωνών στο πήκτωμα (Fomsgaard, 1990).

Βήμα 1<sup>ο</sup>. Το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε διάλυμα με 110 ml H<sub>2</sub>O, 80 ml αιθανόλης (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O), 10 ml οξικού οξέος (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>) και 1,4 ml περιοδικού οξέος (H<sub>5</sub>IO<sub>6</sub>). Το πήκτωμα παρέμεινε σε αυτό το διάλυμα για περίπου πέντε λεπτά υπό ανακίνηση.

Βήμα 2<sup>ο</sup>. Ακολούθησαν 3 διαδοχικές πλύσεις με 200 ml αποστειρωμένου νερού με διάρκεια 5 λεπτών η κάθε μια και πάλι ενώ το πήκτωμα με το νερό βρισκόντουσαν υπό ανακίνηση.

Βήμα 3<sup>ο</sup>. Μετά την αφαίρεση του νερού και τις τελευταίας πλύσης του πηκτώματος, ακολούθησε η τοποθέτηση του gel στο διάλυμα χρώσης με νιτρικό άργυρο. Το διάλυμα αυτό ,συνολικού όγκου 300 ml ,παρασκευάστηκε με 4 ml υδροξείδιο του αμμωνίου (NH<sub>4</sub>OH), 56 ml υδροξείδιο του νατρίου ( NaOH) συγκέντρωσης 0,1M, 10 ml νιτρικό άργυρο ( AgNO<sub>3</sub>) 20% και τέλος 200 ml νερό. Το πήκτωμα παρέμεινε σε αυτό το διάλυμα για περίπου 15 λεπτά ενώ ανακινούνταν καθ' όλη αυτή τη διάρκεια.

Βήμα 4<sup>ο</sup>. Ακολούθησαν και πάλι 3 πλύσεις και αυτές διάρκειας 3 λεπτών όπως έγινε και στο βήμα 2.

Βήμα 5<sup>ο</sup>. Η επόμενη πλύση έγινε με διάλυμα αποτελούμενο από 10 mg κιτρικό οξύ ( $C_6H_8O_7$ ), 250  $\mu$ l φορμαλδεΐδης 36% και νερό μέχρι 500 ml τελικό όγκο. Το πήκτωμα παρέμεινε σε αυτό το διάλυμα για περίπου 3-5 λεπτά μέχρι να εμφανιστεί υποκίτρινο φόντο στο πήκτωμα και εμφανιστούν οι ζώνες.

Βήμα 6<sup>ο</sup>. Προκειμένου να σταματήσει η αντίδραση χρώσης, το πήκτωμα τοποθετείται σε διάλυμα με 10% οξικό οξύ. Το πήκτωμα μπορεί να παραμείνει σε αυτό το διάλυμα για την αποθήκευσή του.

## **2.11. Ταυτοποίηση βακτηρίων.**

### **2.11.1. Απομόνωση ολικού DNA από καθαρή καλλιέργεια βακτηρίου**

Η απομόνωση DNA από καθαρή καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε βάσει του πρωτοκόλλου του (Haught και συνεργάτες 1994). Το συνολικό DNA απομονώθηκε από κύτταρα που συλλέχθηκαν από στερεή καλλιέργεια 24 ωρών, σε θρεπτικό άγαρ. Μεταφέρθηκαν με αποστειρωμένο κρίκο εμβολιασμού σε φυγοκεντρικούς σωλήνες που περιείχαν 500  $\mu$ l διαλύματος  $MgSO_4$  10 mM και φυγοκεντρήθηκαν σε 11000 στροφές για 10 λεπτά στους 4 °C.

Στο ίζημα έγινε προσθήκη διαλύματος λύσης (25 mM Tris, 25 mM EDTA, 10,3 % σακχαρόζη, 10 mg/ml λυσοζύμη) και ακολούθησε επώαση για 2 ώρες στους 37 °C. Στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα SDS 10 % (w/v) και το μίγμα επωάστηκε στους 65 °C για 20 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 10 λεπτά, στις 14.000 στροφές ανά λεπτό, στους 15 °C. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρούς σωλήνες και έγινε προσθήκη διαλύματος οξικού καλίου 5 M και άμεση μεταφορά των σωλήνων σε πάγο. Μετά από παραμονή 30 λεπτών οι σωλήνες φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις 14.000 στροφές ανά λεπτό, στους 4 °C και έγινε μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρούς σωλήνες. Ακολούθησε καταβύθιση με ισοπροπανόλη για 30 λεπτά στους 21 °C και φυγοκέντρωση για 20 λεπτά, στις 14.000 στροφές ανά λεπτό, στους 4 °C. Στο ίζημα προστέθηκε διάλυμα αιθανόλης 70 % και μετά από φυγοκέντρωση για 5 λεπτά, στις 14.000 στροφές ανά λεπτό, στους 4 °C, το ίζημα ξηράθηκε και αναδιαλύθηκε σε απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Το DNA που απομονώθηκε ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αгарόζης 0,8 % (w/v) και παρατηρήθηκε σε υπεριώδη ακτινοβολία.

### 2.11.2. Ενίσχυση της αλληλουχίας 16S rRNA και ταυτοποίηση των προϊόντων.

Κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ενισχύθηκε το τμήμα του γονιδίου 16S rRNA μεταξύ των βάσεων 8 και 1510 (αρίθμηση κατά *E.coli*). Τα μόρια εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν F27 και R1492 (Miller και συνεργάτες, 2013).

**Πίνακας 2.6.** Εκκινητές για την ενίσχυση της αλληλουχίας 16S rDNA

| Ονομασία εκκινητή | Αλληλουχία εκκινητή                 |
|-------------------|-------------------------------------|
| 27F               | 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'          |
| R1492             | 5'-TAC-GGY-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT-T-3' |

Το μίγμα που χρησιμοποιήθηκε για μία αντίδραση με τελικό όγκο τα 25  $\mu$ l, περιλάμβανε τα συστατικά και τις ποσότητες που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.7). Επίσης το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση της συγκεκριμένης αλληλουχίας. Επίσης το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση της συγκεκριμένης αλληλουχίας φαίνεται στον επόμενο Πίνακα 2.8.

**Πίνακας 2.7.** Συστατικά μίγματος για μια αντίδραση 25  $\mu$ l για την ανίχνευση του 16S rRNA.

| Συστατικά                                      | Αρχική συγκέντρωση συστατικών | Τελική ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε σε 25 $\mu$ l αντίδρασης |
|------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| 5 x KAPA HiFi Buffer (GC)                      | 1x                            | 5 $\mu$ l                                                    |
| 1 U/ $\mu$ l KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase | 0,5 units                     | 0,5 $\mu$ l                                                  |
| 10mM KAPA dNTP mix                             | 0,3 mM/ dNTP                  | 0,75 $\mu$ l                                                 |
| Εκκινητής 27F                                  | 0,3 $\mu$ M                   | 0,75 $\mu$ l                                                 |
| Εκκινητής P1492                                | 0,3 $\mu$ M                   | 0,75 $\mu$ l                                                 |
| DNA                                            | 5-0,5 $\mu$ g                 | 5 $\mu$ l                                                    |
| H <sub>2</sub> O                               | -                             | 16 $\mu$ l                                                   |

**Πίνακας 2.8.** Πρόγραμμα αντίδρασης PCR 16S rRNA για τη μοριακή ταυτοποίηση των στελεχών.

| Στάδιο αντίδρασης          | Θερμοκρασία (°C) | Χρόνος (min) |               |
|----------------------------|------------------|--------------|---------------|
| Αρχική αποδιάταξη          | 98               | 3            |               |
| Αποδιάταξη                 | 98               | 20           |               |
| Πρόσδεση εκκινητών στο DNA | 60               | 15           | } x35 κύκλους |
| Επιμήκυνση αλυσίδων        | 72               | 1            |               |
| Τελική επιμήκυνση          | 72               | 1            |               |
| Συντήρηση                  | 10               | Παύση        |               |

Τελικά τα προϊόντα του PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2 % (w/v) και ακολούθησε παρατήρηση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Τα PCR προϊόντα διαχωρίστηκαν από τους εκκινητές και τα ελεύθερα νουκλεοτίδια με τη χρήση του Nukleospin Kit (MN, Γερμανία), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και χρησιμοποιήθηκαν απευθείας για ανάλυση αλληλουχίας ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com), Κορέα).

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν για κάθε γονίδιο συγκρίθηκαν με ήδη γνωστές αλληλουχίες της γονιδιακής τράπεζας ([www.pubmed.com](http://www.pubmed.com)) με τη χρήση του αλγόριθμου BLAST (Altschul και συνεργάτες 1997), ώστε να βρεθούν οι μικροοργανισμοί που παρουσίαζαν μεγαλύτερη ταυτότητα αλληλουχίας με βάση την πρωτοταγή δομή των γονιδίων.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### **3.1. Μελέτη του μικροβιακού φορτίου σε απολυμασμένους ή αποστειρωμένους χώρους της Βιομηχανίας Φαρμάκων.**

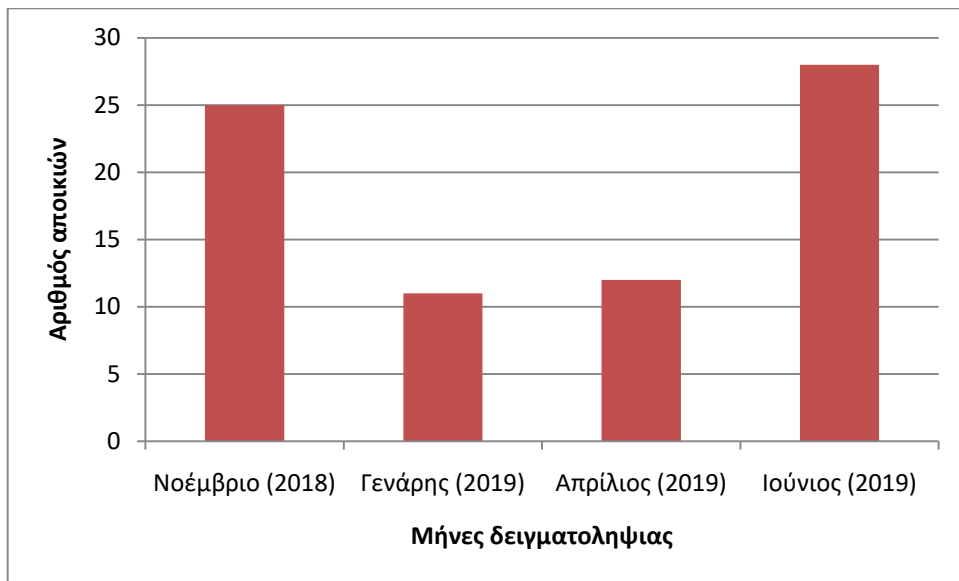
Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε ποσοτική σύγκριση του πληθυσμού των μικροοργανισμών από τον περιβάλλοντα χώρο της Φαρμακευτική Βιομηχανίας. Στις Εικόνες 3.1, 3.2, 3.3 και στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν στο συνολικό αριθμό βακτηρίων που απομονώθηκαν τους μήνες Νοέμβριο (2018), Ιανουάριο (2019), Απρίλιο (2019) και Ιούνιο (2019) και οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν περιγράφονται στη παράγραφο 2.1.2. Επιλέχθηκαν τρεις θέσεις δειγματοληψίας στο χώρο της βιομηχανίας όπου σύμφωνα με τα πρότυπα ποιότητας επικρατούσαν στείρες συνθήκες. Τοποθετήθηκαν τρία τρυβλία ανά θέση και έγινε ποσοτική εκτίμηση του συνολικού πληθυσμού των βακτηρίων. Τα αποτελέσματα φαίνονται στις Εικόνες 3.1, 3.2, και 3.3.

Ο πληθυσμός των βακτηρίων στις θέσεις δειγματοληψίας είναι μεγαλύτερος τον μήνα Ιούνιο (2019), ενώ τις μικρότερες τιμές τις εμφανίζει και στις τρεις περιοχές δειγματοληψίας τον μήνα Ιανουάριο (2019) (Πίνακας 3.1).

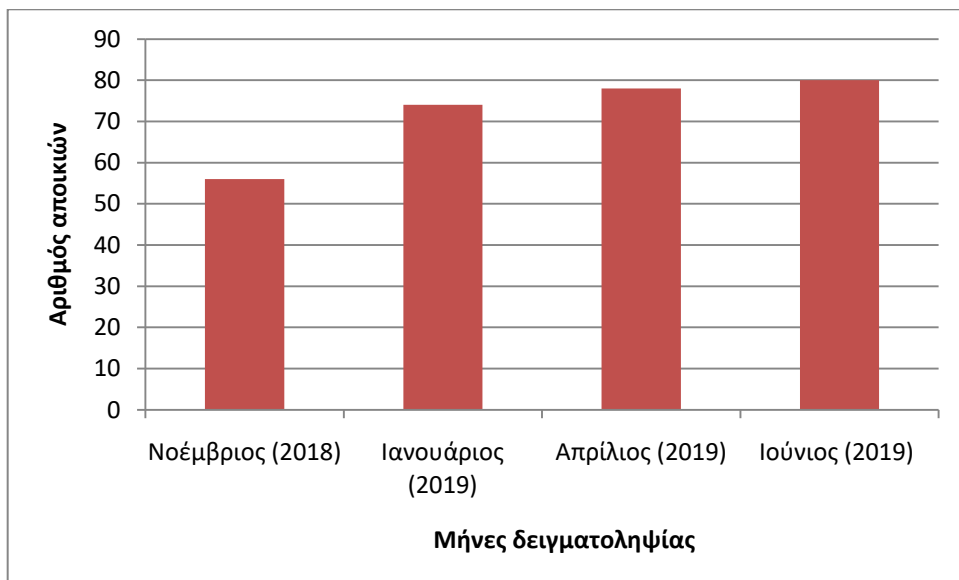
Αναλυτικότερα για τη θέση δειγματοληψίας R, το μήνα Νοέμβριο (2018) μετρήθηκαν κατά μέσο όρο 25 αποικίες ανά τρυβλίο, το μήνα Ιανουάριο (2019) 11, τον μήνα Απρίλιο (2019) 12 και το μήνα Ιούνιο (2019) 28 (Εικόνα 3.1).

Θέση δειγματοληψίας A, τον μήνα Νοέμβριο μετρήθηκαν 56 αποικίες κατά μέσο όρο, το μήνα Ιανουάριο 74, τον Απρίλιο 78 και τον Ιούνιο 80 (Εικόνα 3.2).

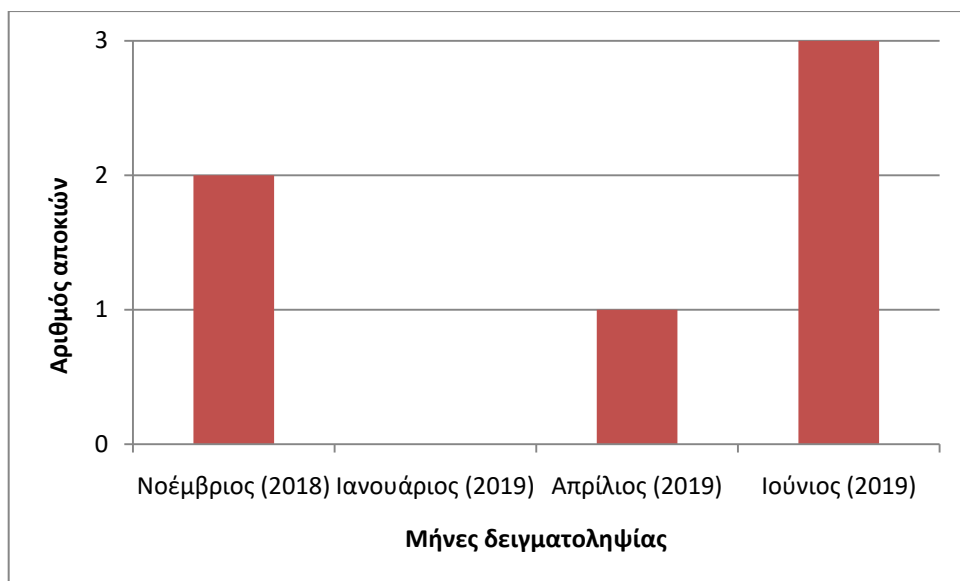
Θέση δειγματοληψίας Δ, οι αποικίες που μετρήθηκαν κατά μέσο όρο τον μήνα Νοέμβριο ήταν 2, τον Ιανουάριο 0, τον Απρίλιο 1 και τον Ιούνιο 3 (Εικόνα 3.3).



**Εικόνα 3.1.** Αριθμός αποικιών στη θέση δειγματοληψίας R τους μήνες Νοέμβριο (2018), Ιανουάριο (2019), Απρίλιο (2019) και Ιούνιο (2019) σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA (Κεφάλαιο 2.3.1).



**Εικόνα 3.2.** Αριθμός αποικιών στη θέση δειγματοληψίας A τους μήνες Νοέμβριο (2018), Ιανουάριο (2019), Απρίλιο (2019) και Ιούνιο (2019) σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA (Κεφάλαιο 2.3.1).



**Εικόνα 3.3.** Αριθμός αποικιών στη θέση δειγματοληψίας Δ τους μήνες Νοέμβριο (2018), Ιανουάριο (2019), Απρίλιο (2019) και Ιούνιο (2019) σε θρεπτικό υπόστρωμα TSA (Κεφάλαιο 2.3.1).

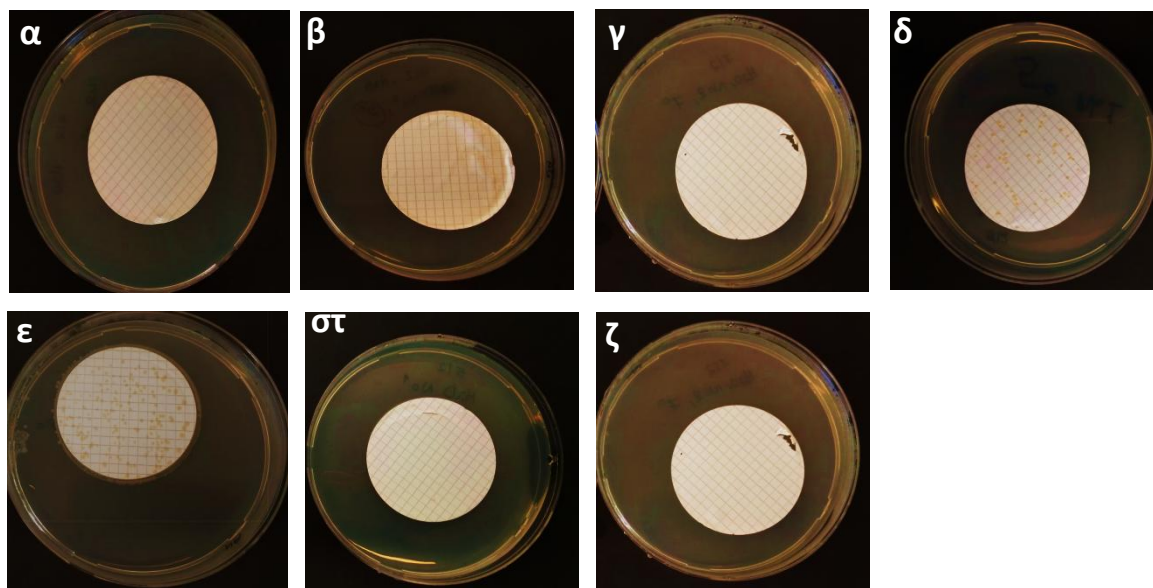
**Πίνακας 3.1.** Συνολικός αριθμός βακτηρίων και από του τρεις στείρους χώρους.

|                  | Θέση δειγματοληψίας<br>R | Θέση δειγματοληψίας<br>A | Θέση δειγματοληψίας<br>Δ |
|------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Νοέμβριος</b> | <b>25</b>                | <b>56</b>                | <b>2</b>                 |
| Ιανουάριος       | 11                       | 74                       | 0                        |
| Απρίλιος         | 12                       | 78                       | 1                        |
| <b>Ιούνιος</b>   | <b>28</b>                | <b>80</b>                | <b>3</b>                 |

Η ανίχνευση των μικροοργανισμών με δυνατότητα απελευθέρωσης ενδοτοξινών εφαρμόστηκαν μέθοδοι ανάκτησης μικροοργανισμών μέσω εκλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων (Κεφάλαιο 2.3) ενώ στη συνέχεια μέσω βιοχημικών δοκιμασιών έγινε ανίχνευση των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων που είναι υπεύθυνα για τη παρουσία των LPS. Αυτές οι μέθοδοι εφαρμόστηκαν τόσο στους μικροοργανισμούς που απομονώθηκαν από τη γραμμή παραγωγής φαρμακευτικών προϊόντων, όσο και από τα δείγματα νερού.

### 3.2. Μελέτη του μικροβιακού πληθυσμού αφού έχει προηγηθεί διήθηση νερού.

Συλλέχθηκαν δείγματα νερού από τα στάδια επεξεργασίας απιονισμένου νερού (κατιοντική στήλη, ανιοντική στήλη, μικτή στήλη και λάμπα UV) (Κεφάλαιο 2.1.2). Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η μέθοδος διήθησης του νερού μέσω ηθμών νιτροκυτταρίνης (Εικόνα 2.5) και εναπόθεση των ηθμών, όπως αυτή περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2.2, στην επιφάνεια τρυβλίων με θρεπτικό υπόστρωμα NA (Κεφάλαιο 2.3.3) και R2A (Κεφάλαιο 2.3.4). Μετά την επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία 37 °C για 48 ώρες δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη ποσοτική διαφορά μεταξύ των τεσσάρων δειγματοληψιών στον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν. Συνολικότερα, ανάπτυξη βακτηρίων παρατηρήθηκε σε δύο από τα επτά στάδια επεξεργασίας του νερού. Αυτά είναι: το στάδιο επεξεργασίας που αφορά τη 1<sup>η</sup> μικτή στήλη και το αμέσως επόμενο στάδιο, δηλαδή τη 2<sup>η</sup> μικτή στήλη. Σε όλα τα υπόλοιπα στάδια ( νερό πόλης, κατιοντική και ανιοντική στήλη, μετά τη UV λάμπα και τελικό απιονισμένο νερό) δεν παρατηρήθηκε καμία ανάπτυξη βακτηρίων και τους τέσσερις μήνες που αφορούν τις περιόδους δειγματοληψίας.

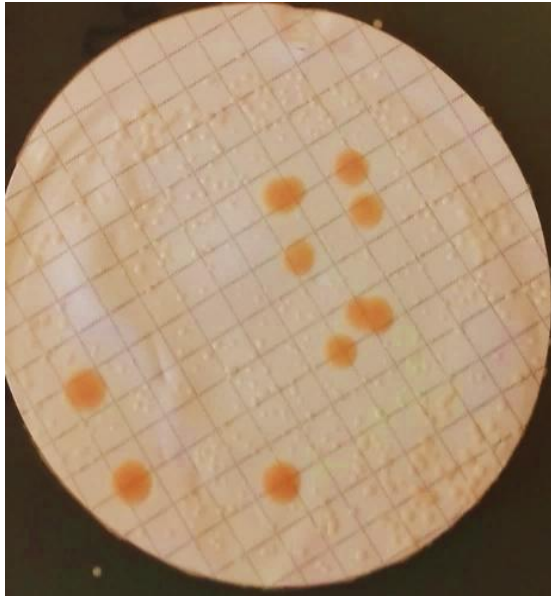


**Εικόνα 3.4.** Ανάπτυξη βακτηρίων στους ηθμούς μετά τη διήθηση νερού.

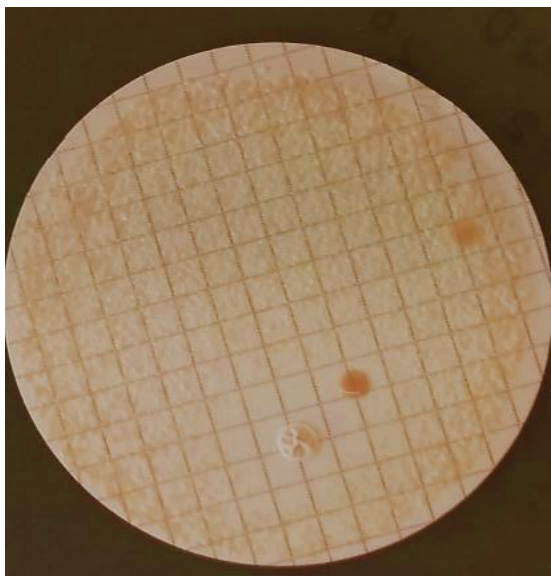
α) νερό πόλης, β) μετά τη κατιοντική στήλη, γ) μετά ανιοντική στήλη, δ) μετά τη 1<sup>η</sup> μικτή στήλη, ε) μετά τη 2<sup>η</sup> μικτή στήλη, στ) μετά τη UV λάμπα, ζ) τελικό απιονισμένο νερό.

Επειδή το νερό αποτελεί ένα ολιγότροφο ενδιαίτημα στο οποίο οι μικροοργανισμοί βρίσκονται υπό συνθήκες καταπόνησης, δοκιμάστηκαν δύο θρεπτικά υποστρώματα. Χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα R2A (2.3.4) και το NA (2.3.3). Το θρεπτικό υπόστρωμα R2A Agar επιλέχθηκε καθώς θεωρείται ιδανικό θρεπτικό για την ανάπτυξη

βακτηρίων από πόσιμο νερό ενώ το NA θεωρείται ως ένα γενικού τύπου θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη βακτηρίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στο θρεπτικό υπόστρωμα R2A (Εικόνα 3.6) παρατηρείται η ανάπτυξη μεγαλύτερου πληθυσμού βακτηρίων σε σχέση με το θρεπτικό υπόστρωμα NA (Εικόνα 3.5).



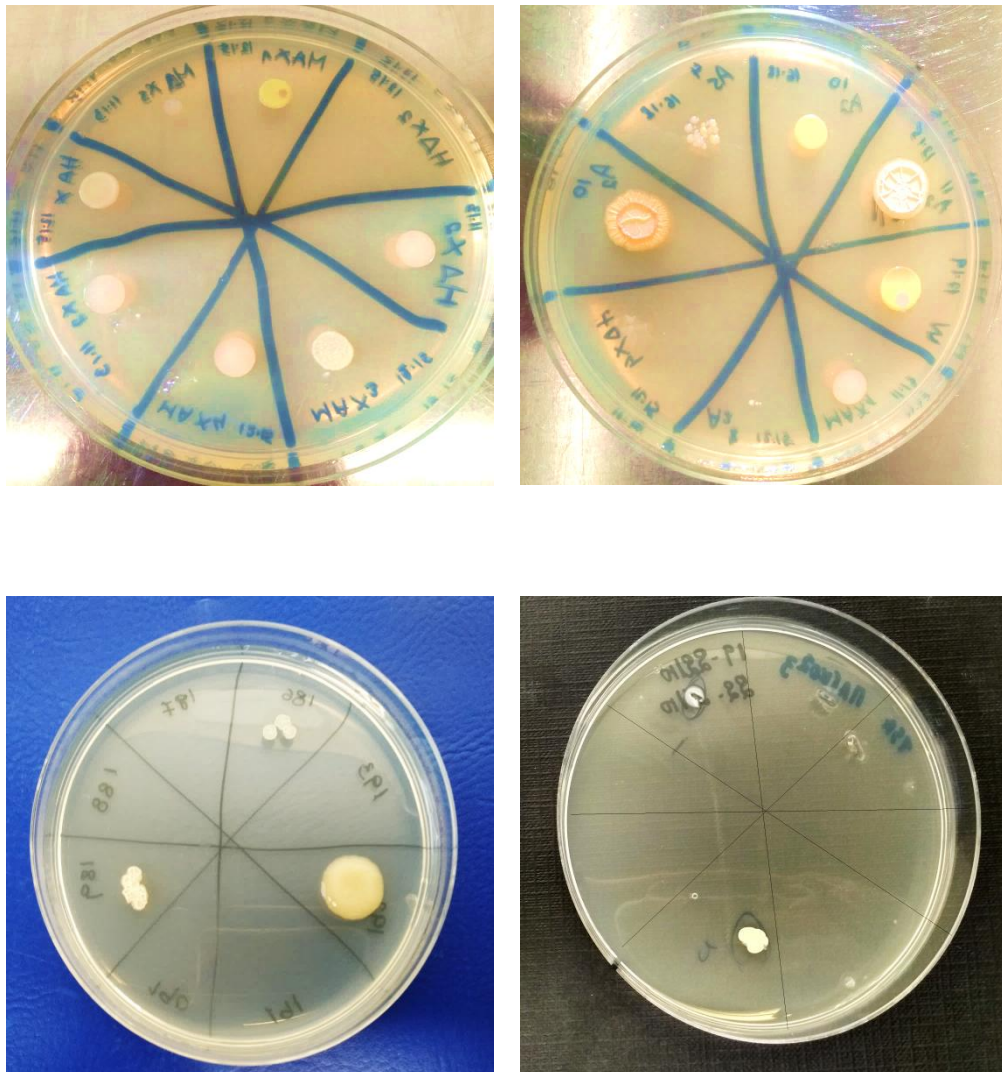
**Εικόνα 3.5.** Ανάπτυξη βακτηρίων σε θρεπτικό υπόστρωμα NA



**Εικόνα 3.6.** Ανάπτυξη βακτηρίων σε θρεπτικό υπόστρωμα R2A

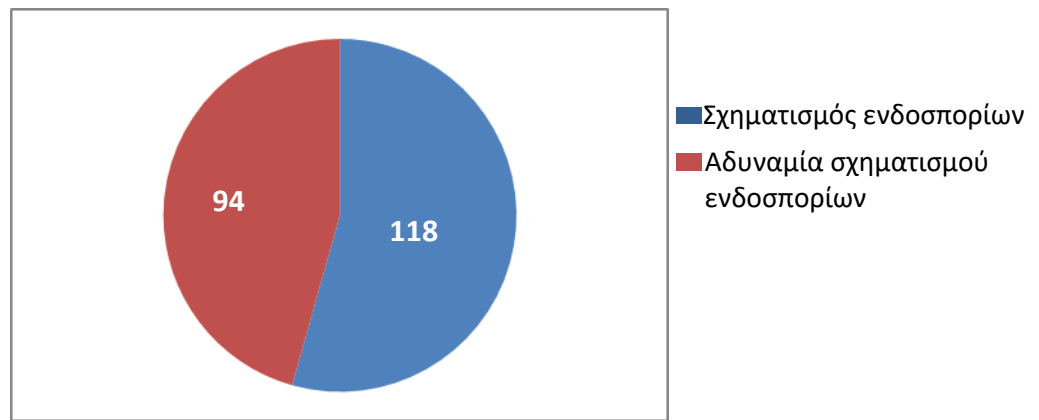
### 3.3. Βιοχημικός χαρακτηρισμός των απομονωμένων μικροοργανισμών.

Τα βακτήρια που απομονώθηκαν σε καθαρή καλλιέργεια εξετάστηκαν ως προς τη δυνατότητα παραγωγής ενδοσπορίων. Αυτό κρίθηκε απαραίτητο ώστε να αποκλειστούν οι μικροοργανισμοί που σχηματίζουν ανθεκτικές μορφές κάτω από δυσμενείς συνθήκες (Κεφάλαιο 2.4.5.1). Η συγκεκριμένη μέθοδος επιλέχθηκε καθώς αποτελεί μια γρήγορη και σίγουρη μέθοδο για τον αποκλεισμό των Gram θετικών βακτηρίων καθώς αυτά δεν σχετίζονται με τα LPS. Από τα 212 συνολικά απομονωμένα βακτήρια τα 94 δεν είχαν τη δυνατότητα παραγωγής ενδοσπορίων (Εικόνα 3.7).



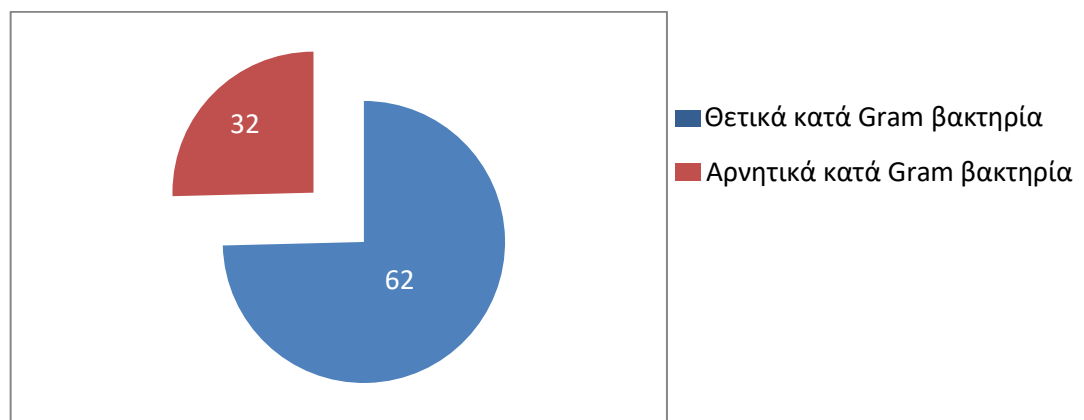
**Εικόνα 3.7.** Μέθοδος σχηματισμού ενδοσπορίων-«θερμικο σοκ»





**Εικόνα 3.8.** Αριθμός μικροοργανισμών με αδυναμία παραγωγής ενδοσπορίων μετά το «θερμικό σοκ»

Από τα 94 στελέχη που έδειξαν αδυναμία ανάπτυξης τους κατά τη δοκιμασία του «θερμικού σοκ» τα 32 ήταν αρνητικά κατά Gram



**Εικόνα 3.9.** Σύνολο Gram αρνητικών βακτηρίων μετά τη χρώση κατά Gram

Από τις παραπάνω δύο δοκιμασίες επιλέχθηκαν 32 στο σύνολο μικροοργανισμοί στους οποίους και πραγματοποιήθηκε η μέθοδος για την ανίχνευση ενδοτοξινών.

### **3.4. Παρουσία ενδοτοξινών στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια - Limulus amoebocyte lysate test.**

Ακολούθησε λύση κυτταρικής μεμβράνης των Gram αρνητικών βακτηρίων μέσω υπερήχων (Κεφάλαιο 2.5) και στη συνέχεια εφαρμόστηκε η μέθοδος Limulus amoebocyte lysate – gel clot (LAL test) (Κεφάλαιο 2.7). Το σωληνάριο το οποίο περιελάμβανε 50 μl νερό καθαρό ενδοτοξινών, 50 μl δείγμα και 100 μl προϊόν λύσης ( LAL Reagent) μετά την επώαση στους 60 °C για μια ώρα έδειξε σχηματισμό πηκτώματος ύστερα από την

αναστροφή του σωληναρίου. Αυτό αποδεικνύει την παρουσία ενδοτοξίνης στο δείγμα (Εικόνα 3.10).

Από το σύνολο των 32 αρνητικά κατά Gram βακτηρίων που εξετάστηκαν τέσσερα έδειξαν θετικό αποτέλεσμα ως προς τη παρουσία ενδοτοξίνης σχηματίζοντας πήκτωμα. Τα βακτήρια αυτά έλαβαν τις κωδικές ονομασίες S1E17, AT,W3,EC3 αντίστοιχα και ταχτοποιήθηκαν μοριακά μέσω ανάλυσης της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA.



**Εικόνα 3.10.** Σχηματισμός πηκτώματος ύστερα από τη μέθοδο LAL test.

### **3.5. Παρουσία λιποπολυσακχαριτών στα απομονωμένα βακτήρια.**

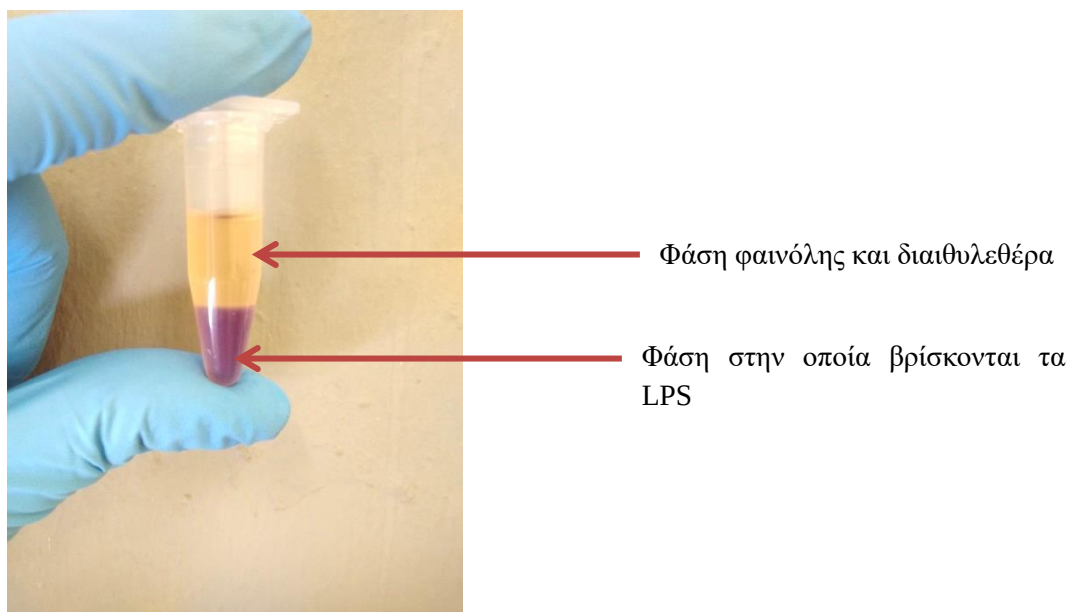
Η εκχύλιση των λιποπολυσακχαριτών στα απομονωμένα βακτήρια πραγματοποιήθηκε με δύο μεθόδους, τη μέθοδος ζεστής φαινόλης-νερού και τη μέθοδος χλωροφορμίου-μεθανόλης. Η επιλογή αυτών των δύο μεθόδων έγινε με σκοπό να διαπιστωθεί ποια από τις δύο έχει σαν αποτέλεσμα την εκχύλιση πιο καθαρών LPS χωρίς τη παρουσία πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων .

#### **3.5.1. Ανίχνευση της παρουσίας λιποπολυσακχαριτών με τη μέθοδο ζεστής φαινόλης νερού ( hot phenol-water method).**

Στα δείγματα που εξετάστηκαν παρατηρήθηκε ο σχηματισμός δύο φάσεων. Η υπερκείμενη φάση φαινόλης διαιθυλεθέρα και η υποκείμενη φάση στην οποία βρίσκονται



τα LPS (Εικόνα 3.11). Απομονώθηκε το μοβ στρώμα (υποκείμενη φάση) από όλα τα δείγματα σε αποστειρωμένα σωληνάκια τύπου eppendor και προστέθηκαν 200  $\mu$ l από 2x SDS προκειμένου να ακολουθήσει ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Έπειτα από την ηλεκτροφόρηση έγινε χρώση του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο και με Coomassie Brilliant Blue (Κεφάλαιο 2.10.1).



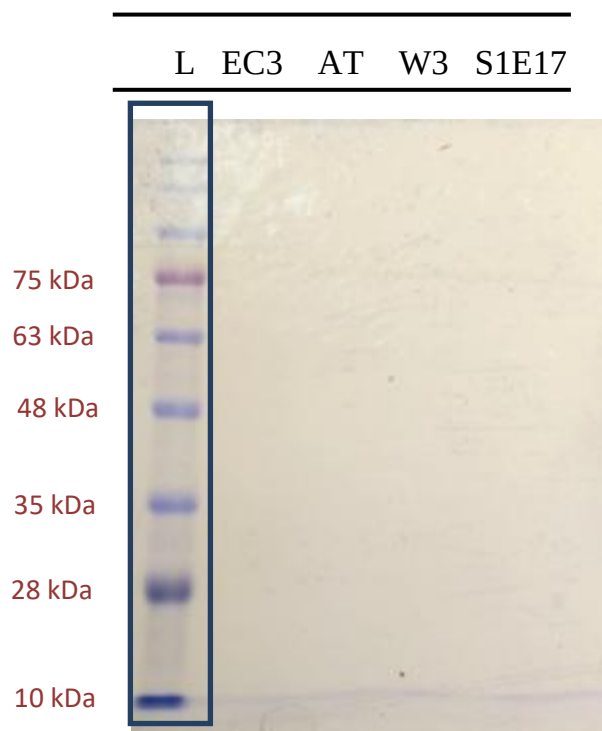
**Εικόνα 3.11.** Σχηματισμός δύο φάσεων κατά την εκχύλιση των LPS με τη μέθοδο ζεστής φαινόλης-νερού.

#### **3.5.1.1. Μελέτη της παρουσίας πρωτεϊνικών μολύνσεων με εφαρμογή της μεθόδου ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και χρώση με Coomassie Brilliant Blue.**

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και στη συνέχεια η χρώση με Coomassie Brilliant Blue έγινε με σκοπό να διαπιστωθεί η απουσία πρωτεϊνών μετά την μέθοδο εκχύλισης των LPS που αποτελεί και σκοπό της πειραματικής διαδικασίας (Εικόνα 3.12). Αυτή η μέθοδος χρωματισμού είναι απλή και γρήγορη και μπορεί να ανιχνεύσει ακόμα και 0,1 $\mu$ g πρωτεΐνης. Αντίθετα η συγκεκριμένη χρωστική δεν μπορεί να χρωματίσει τα LPS.

Η απουσία ζωνών ύστερα από τη χρώση με Coomassie Brilliant Blue αποδεικνύει την απουσία βακτηριακών πρωτεϊνών. Η απουσία πρωτεϊνών θεωρείται απαραίτητη

προκειμένου να αποφευχθούν ψευδή αποτελέσματα κατά τη χρώση του πηκτώματος με νιτρικό άργυρο και τυχόν πρωτεΐνες να θεωρηθούν LPS.



**Εικόνα 3.12.** Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με Coomassie Brilliant Blue ύστερα από εκχύλιση και καθαρισμό των LSP με τη μέθοδο ζεστής φαινόλης-νερού και SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση. Όπου (L) ο πρωτεϊνικός μάρτυρας.

#### **3.5.1.2. Μελέτη ανίχνευσης των LPS με εφαρμογή της μεθόδου ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και χρώση με νιτρικό άργυρο.**

Η SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση είναι μέθοδος διαχωρισμού μορίων των LPS ανάλογα με τη μοριακή μάζα. Στα LPS το τμήμα του Αντιγόνου-O έχει μεγαλύτερη μοριακή μάζα σε σχέση με το πυρήνα και το λιπίδιο-A. Συνεπώς μέσω του διαχωρισμού αυτού μετά την ηλεκτροφόρηση και τη χρώση με νιτρικό άργυρο, είναι δυνατή η παρατήρηση των τμημάτων των LPS. Η χρώση με νιτρικό άργυρο είναι μια ευαίσθητη μέθοδος για την ανίχνευση LPS μετά από την ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE. Στο τμήμα του λιπιδίου-A βρίσκονται θέσεις πρόσδεσης των ιόντων του αργύρου.

Η παρουσία ζωνών στο πήκτωμα αποδεικνύει την επιτυχή εκχύλιση των LPS με τη μέθοδο ζεστής φαινόλης νερού. Τρία από τα τέσσερα στελέχη έδειξαν χαρακτηριστικές ζώνες των LPS ύστερα από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης. Στα στελέχη EC3, AT και W3 φαίνονται πρότυπες ζώνες που είναι χαρακτηριστικές για τα LPS των Gram αρνητικών βακτηρίων. Οι ζώνες στη κορυφή του πηκτώματος, που εμφανίζουν μεγάλα μοριακά βάρη και έχουν χαρακτηριστικό σχήμα «σκάλας» (ladder pattern) σχετίζονται με LPS που περιέχουν αλυσίδες με το O-αντιγόνο. Αντίθετα οι ζώνες στο κάτω μέρος του πηκτώματος σχετίζονται με το πυρήνα και το λιπίδιο A των LPS (Εικόνα 3.13 Α-Γ). Επιπλέον το διαφορετικό μοτίβο που παρουσιάζεται στην περιοχή του O-Αντιγόνου υποδεικνύει τη παρουσία διαφορετικών βακτηριακών στελεχών καθώς τα O-Αντιγόνα ποικίλουν μεταξύ αυτών των στελεχών και δίνουν στα βακτήρια τραχύ (τύπου R) ή ομαλό (τύπου S) φαινότυπο. Αντίθετα για το τέταρτο στέλεχος, S1E17, ενώ το αποτέλεσμα ύστερα από τη δοκιμασία LAL ήταν θετικό, δεν εμφανίστηκαν ζώνες κατά τη χρώση με νιτρικό άργυρο (Εικόνα 3.13Δ).

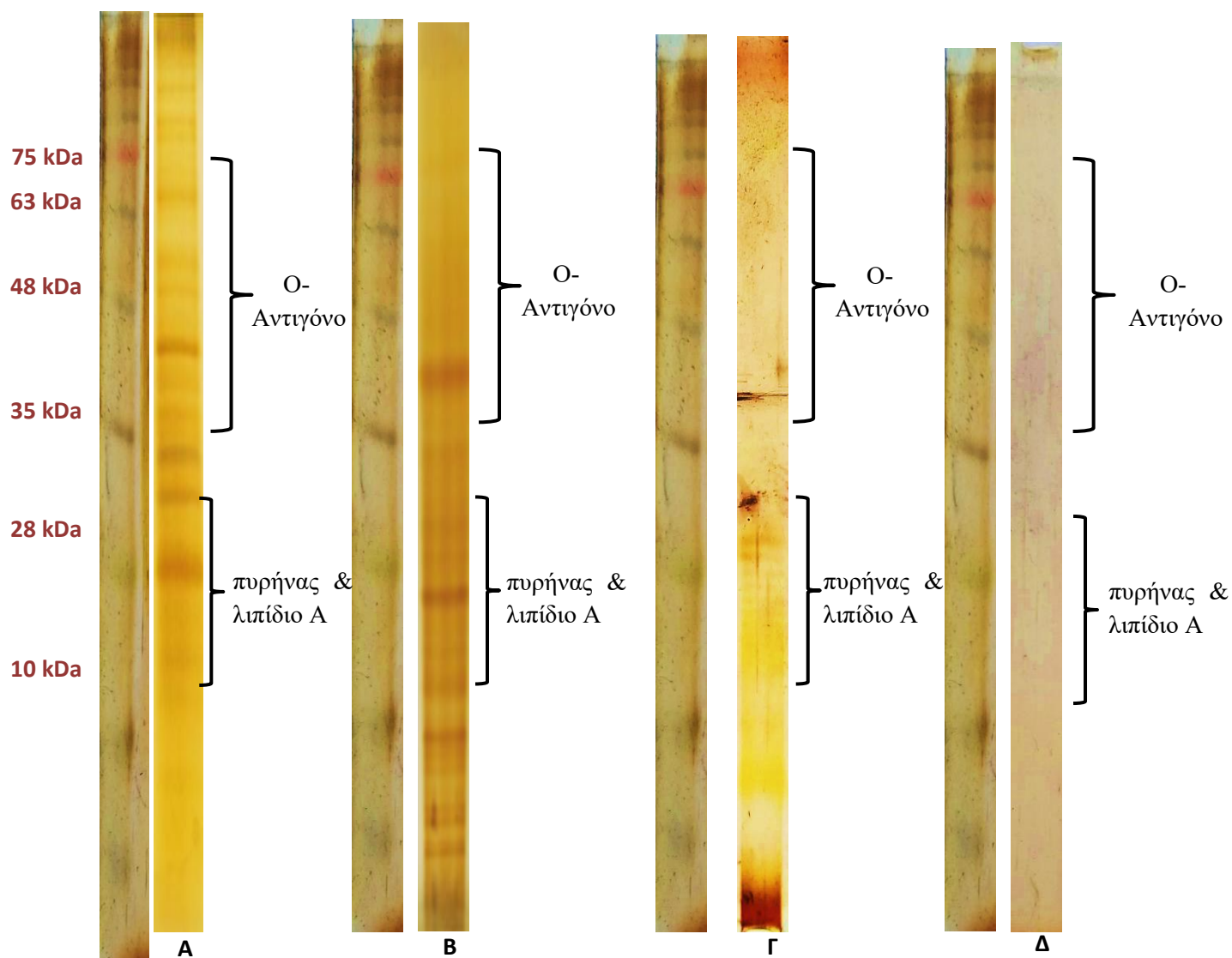
### 3.5.2. Παρουσία λιποπολυσακχαριτών με τη μέθοδο χλωροφορμίου – μεθανόλης.

Στα διαλύματα βακτηρίων- EDTA μετά τη προσθήκη μεθανόλης/ χλωροφορμίου και την ανακίνηση και έπειτα τη φυγοκέντρησή τους παρατηρήθηκε ο σχηματισμός τριών φάσεων: φάση μεθανόλης, βιομάζα και φάση χλωροφορμίου.

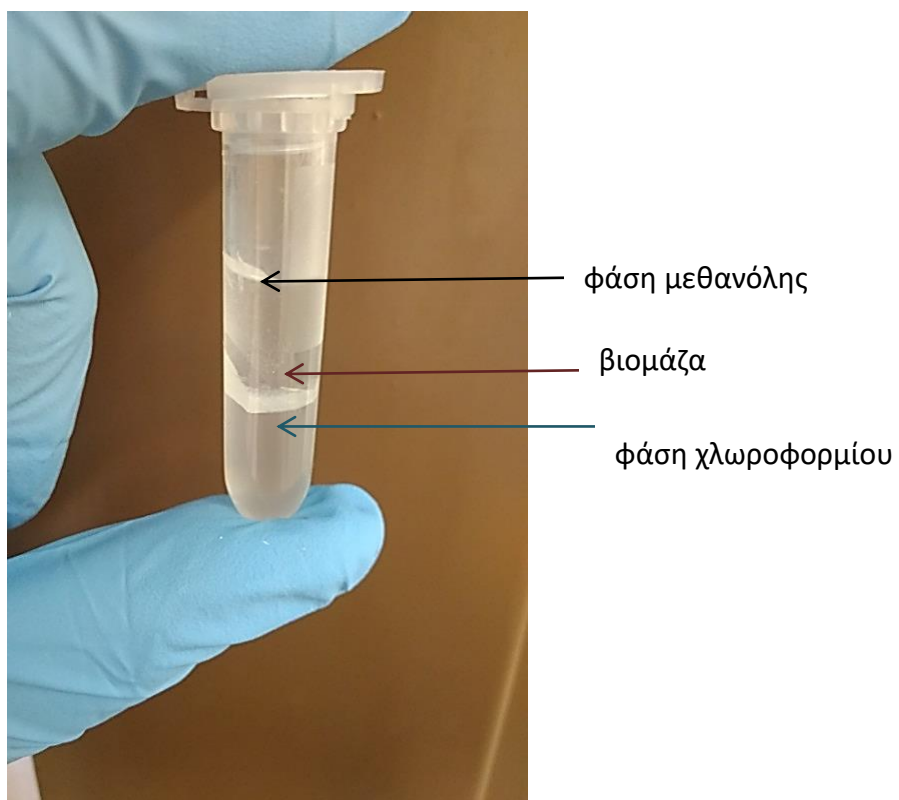
Από τις τρεις φάσεις (Εικόνα 3.14) απομονώθηκαν σε αποστειρωμένους γυάλινους σωλήνες όγκου 15-20 ml οι φάσεις μεθανόλης και χλωροφορμίου όπου βρίσκονται τα LPS. Στη συνέχεια και αφού το εκχύλισμα λιπιδίων εκπλύθηκε για να απομακρυνθούν τυχόν μη λιπιδικά συστατικά, η οργανική φάση εξατμίστηκε. Μετά το πέρας 24 ωρών το διάλυμα (μεθανόλη/χλωροφόρμιο) εξατμίστηκε και σχηματίστηκε ίζημα (LPS) σε τρία από τα τέσσερα στελέχη (Εικόνα 3.15).

Ίζημα δεν σχηματίστηκε στο στέλεχος S1E17. Αποτέλεσμα αυτού να μην συνεχιστεί καμία άλλη δοκιμασία για αυτό το στέλεχος καθώς η απουσία ιζήματος υποδεικνύει και την απουσία των LPS.

| L EC3 | L AT | L W3 | L S1E17 |
|-------|------|------|---------|
|-------|------|------|---------|



**Εικόνα 3.13.** Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο μετά από εκχύλιση και καθαρισμό των LPS με τη μέθοδο ζεστής φαινόλης-νερού και SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση. Όπου (L) ο πρωτεϊνικός μάρτυρας.



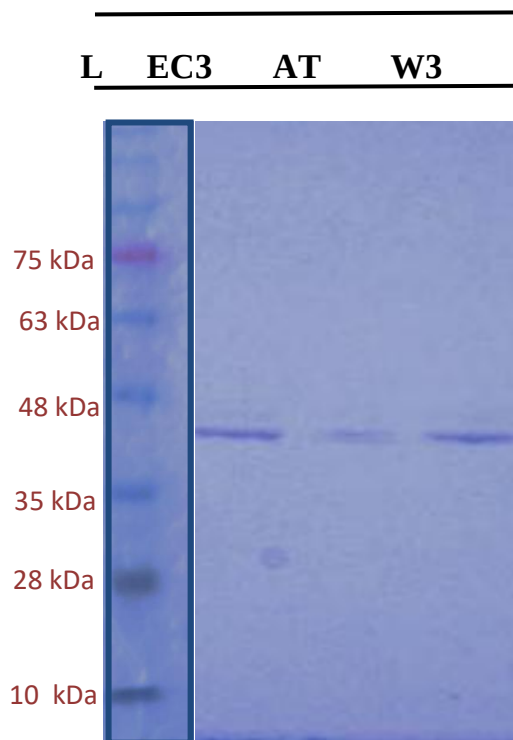
**Εικόνα 3.14.** Σχηματισμός τριών φάσεων μετά την προσθήκη μεθανόλης/χλωροφορμίου.



**Εικόνα 3.15.** Σχηματισμός ιζήματος ύστερα από εξάτμιση μεθανόλης/χλωροφορμίου σε διαφορετικά δείγματα.

### 3.5.2.1. Μελέτη της παρουσίας πρωτεϊνικών μολύνσεων με εφαρμογή της μεθόδου ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και χρώση με Coomassie Brilliant Blue.

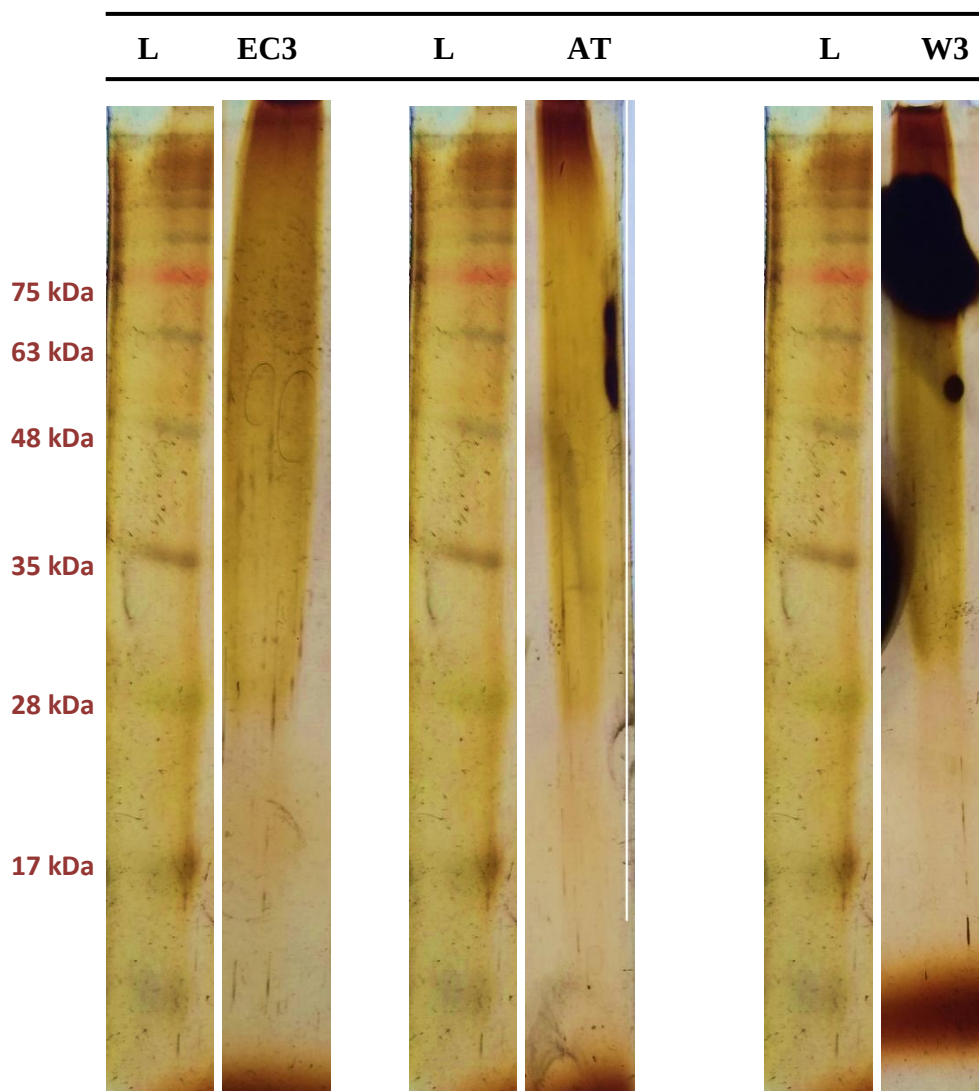
Στη μέθοδο εκχύλισης LPS με μεθανόλη/χλωροφόρμιο το πήκτωμα μετά τη χρώση με Coomassie Brilliant Blue αποκάλυψε μια πρωτεϊνική μόλυνση. Εμφανίστηκαν ζώνες που αποδεικνύουν στην ύπαρξη πρωτεϊνών στα δείγματα, βάρους περίπου 40 kDa.



**Εικόνα 3.16.** Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με Coomassie Brilliant Blue ύστερα από εκχύλιση και καθαρισμό των LPS με τη μέθοδο φαινόλης / χλωροφόρμιο και SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση. Όπου (L) ο πρωτεϊνικός μάρτυρας.

### 3.5.2.2. Μελέτη ανίχνευσης των LPS με εφαρμογή της μεθόδου ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης και χρώση με νιτρικό άργυρο.

Η εκχύλιση των LPS με αυτή τη μέθοδο δεν έδειξε το χαρακτηριστικό μοτίβο (ladder pattern) των LPS δεν ήταν πιθανότατα λόγω μόλυνσης των δειγμάτων από πρωτεΐνες (Εικόνα 3.17).

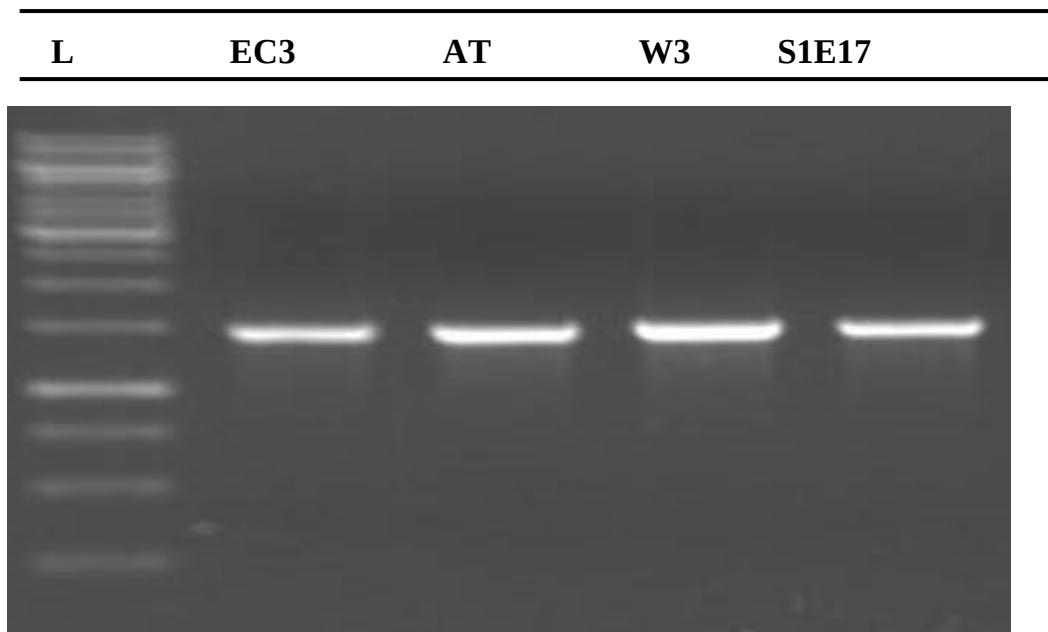


**Εικόνα 3.17.** Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργγυρο μετά από εκχύλιση και καθαρισμό των LPS με τη μέθοδο μεθανόλης / χλωτοφορμίου και SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση. Όπου (L) ο πρωτεϊνικός μάρτυρας.

### 3.6. Μοριακή ταυτοποίηση των επιλεγμένων βακτηρίων.

Έγινε μοριακή ταυτοποίηση μέσω ανάλυσης της αλληλουχίας του 16S rRNA (Κεφάλαιο 2.9.2) γονιδίου των τεσσάρων επιλεγμένων στελεχών που έδειξαν θετικό αποτέλεσμα ως προς τη παρουσία ενδοτοξινών μετά τη δοκιμασία LAL. Η ενίσχυση του γονιδίου πραγματοποιήθηκε με το ζεύγος F27-1492R και τα αποτελέσματα φαίνονται στην Εικόνα 3.18. Το προϊόν είχε το αναμενόμενο μέγεθος 1484 βάσεις.





**Εικόνα 3.18.** Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR του 16S rRNA γονιδίου. Όπου (L) ο μοριακός μάρτυρας.

Οι αλληλουχίες των τεσσάρων στελεχών συγκρίθηκαν με αλληλουχίες αναφοράς ( 16S rRNA reference sequences) καθώς και με όλες τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (nucleotide collection) που έχουν κατατεθεί στη βάση δεδομένων GenBank (Πίνακας 3.2).

**Πίνακας 3.2.** Αποτελέσματα της ευθυγράμμισης των αλληλουχιών με τον αλγόριθμο BLAST.

| Κωδικός στελέχους | Μικροοργανισμός με τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια <sup>1</sup> (αριθμός κατάθεσης στην τράπεζα GenBank) | Max score | Μέγιστη ομοιότητα % |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|---------------------|
| EC3               | <i>Escherichia fergusonii</i> (NR_074902.1)                                                                   | 2028      | 97.17               |
| AT                | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NR_117678.1)                                                                   | 1650      | 95.45               |
| W3                | <i>Shigella flexneri</i> ( NR_026331.1)                                                                       | 2054      | 97.27               |
| S1E17             | <i>Staphylococcus xylosus</i> (NR_113350.1)                                                                   | 2085      | 96.82               |

<sup>1</sup> Οι αλληλουχίες με αριθμούς NR αποτελούν αλληλουχίες αναφοράς

Με βάση το παραπάνω πίνακα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα τρία από τα τέσσερα στελέχη ανήκουν στα Gram αρνητικά βακτήρια, ενώ το μόνο στέλεχος Gram θετικό είναι το *Staphylococcus xylosus*.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΣΥΖΗΤΗΣΗ & ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το περιβάλλον στο οποίο πραγματοποιούνται φαρμακευτικές διεργασίες, ιδίως οι στείροι χώροι μιας Φαρμακοβιομηχανίας μπορεί να αντιμετωπίσει πολλές μολύνσεις. Η ανθρώπινη δραστηριότητα, οι διαδικασίες εγκατάστασης και ο εξοπλισμός μπορεί να προκαλέσει μεταφορά και διασπορά μικροοργανισμών στην ατμόσφαιρα τέτοιων χώρων. Η συγκέντρωση των αερομεταφερόμενων σωματιδίων στους εσωτερικούς χώρους πρέπει να ελέγχεται και να ορίζονται τα όρια αυτής της συγκέντρωσης σύμφωνα με το αντίστοιχο ISO. Οι πληροφορίες σχετικά με πιθανή εποχιακή αλλαγή στον πληθυσμό των βακτηρίων είναι σημαντικές για την αξιολόγηση των επιπτώσεων που μπορεί αυτοί οι πληθυσμοί να έχουν κάθε φορά. Μελέτες έχουν δείξει ότι η εποχιακή διακύμανση στους πληθυσμούς των βακτηρίων σχετίζεται με τη θερμοκρασία και την υγρασία του περιβάλλοντα χώρου. Έχουν γίνει πολλές αναφορές για τη βακτηριακή ποικιλότητα εσωτερικών χώρων από αερομεταφερόμενα σωματίδια (Mandal και Brandl, 2011), ωστόσο δεν υπάρχουν πληροφορίες για στο περιβάλλον μιας φαρμακευτικής βιομηχανίας, ειδικότερα για χώρους που αφορούν στο περιβάλλον-Class 8 δηλαδή τους στείρους χώρους μιας φαρμακευτικής βιομηχανίας (Kembel και συνεργάτες, 2012). Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, ο μεγαλύτερος αριθμός βακτηριακών στελεχών παρατηρείται στον στείρο χώρο με κωδική ονομασία Α που αφορά τα αποδυτήρια στα οποία το προσωπικό αλλάζει ρούχα, σε σχέση με τους υπόλοιπους δύο χώρους R και Δ που είναι χώροι φαρμακευτικών διεργασιών όπως εμφιάλωσης φαρμακευτικών προϊόντων. Οι μολύνσεις σε αυτούς τους χώρους κατά βάση, είναι αποτέλεσμα της μεταφοράς αερομεταφερόμενων σωματιδίων από τον εξωτερικό χώρο προς τον χώρο των αποδυτηρίων μέσω ανθρώπινης δραστηριότητας (Rintala και συνεργάτες, 2008). Καθώς οι παράμετροι της υγρασίας και της θερμοκρασίας παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση της μικροβιακής ποικιλότητας (Park και συνεργάτες 2014), τον μήνα Νοέμβριο 2018 και τον μήνα Ιούνιο 2019 παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη μικροβιακή αύξηση όπου αυτό το ποσοστό είναι σε υψηλά επίπεδα. Αντίθετα παρατηρήθηκε μια μικρή μείωση τον μήνα Απρίλιο 2019 και μια ακόμα μεγαλύτερη τον μήνα Ιανουάριο 2019. Μελέτες σχετικά με την εποχιακή διακύμανση αερομεταφερόμενων σωματιδίων έχουν δείξει ότι τους καλοκαιρινούς μήνες και τους μήνες του φθινοπώρου, οι συγκεντρώσεις βακτηρίων είναι υψηλότερες σε σχέση με τον

χειμώνα και την άνοιξη (Moschandreas και συνεργάτες 2003) αποτέλεσμα που συμφωνεί με την παρούσα εργασία. Η αύξηση της συγκέντρωσης των βακτηρίων το καλοκαίρι πιθανόν σχετίζεται με τις πιο υψηλές θερμοκρασίες που ευνοούν πιο έντονες κυτταρικές διαδικασίες και διαδικασίες σηματοδότησης (Bowers και συνεργάτες 2012).

Μέχρι σήμερα, οι περισσότερες από τις εργασίες που αφορούν την εποχιακή διακύμανση της μικροβιακής ποικιλότητας σε εσωτερικούς χώρους έχουν επικεντρωθεί σε μετρήσεις που αφορούν τους μύκητες και σε μικρότερο βαθμό σε αντίστοιχες βακτηρίων (Park και συνεργάτες, 2014). Οι μέχρι τώρα μελέτες σε διάφορα εσωτερικά περιβάλλοντα, έχουν δείξει ότι τα γένη *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* και *Proteobacteria* είναι οι κοινώς εμφανιζόμενες ομάδες βακτηρίων που υπάρχουν σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις στον αέρα (Yassin και Almouqatea 2010, Sandle και συνεργάτες, 2005, Amato και συνεργάτες, 2005, Pearce και συνεργάτες, 2010, Brodie και συνεργάτες, 2007). Ακόμα, τους μήνες του φθινοπώρου παρατηρείται μια αύξηση του γένους *Bacillus*, μια ομάδα βακτηρίων που θεωρείται ότι προέρχεται από το έδαφος και μεταφέρεται στην ατμόσφαιρα (Bowers και συνεργάτες, 2011).

Μέχρι σήμερα λίγες μελέτες έχουν γίνει σε ότι αφορά τη μικροβιακή ποικιλότητα σε βιομηχανικές μονάδες παραγωγής νερού υψηλής καθαρότητας που προορίζεται για φαρμακευτική χρήση. Ειδικότερα στις φαρμακοβιομηχανίες, η αναγκαιότητα για νερό υψηλής καθαρότητας είναι επιτακτική καθώς οποιαδήποτε μόλυνση στο νερό είτε λόγω ύπαρξης μικροοργανισμών είτε λόγω μεταβολικών προϊόντων τους, μπορεί να μεταφερθεί στα τελικά προϊόντα επιδρώντας αρνητικά στην υγεία του καταναλωτή (Kawai, και συνεργάτες 2004). Με βάση και τα πρωτόκολλα της Ευρωπαϊκής Επιτροπής Φαρμακοποιίας και τα βιβλιογραφικά δεδομένα επιλέχθηκαν θρεπτικά υποστρώματα που υποστηρίζουν την ανάπτυξη βακτηριακών πληθυσμών. Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν θρεπτικά υποστρώματα όπως το NA που είναι γενικού τύπου υπόστρωμα για την καταμέτρηση και την απομόνωση των μικροοργανισμών και το R2A. Το θρεπτικό R2A ενδείκνυται για χρήση κατά τον έλεγχο πόσιμου νερού καθώς περιέχει προσταφυλικό νάτριο και άμυλο που ευνοούν την ανάκτηση καταπονημένων κυττάρων (Reasoner και Geldreich 1985). Ένας βασικός λόγος της ύπαρξης βακτηριακών ενδοτοξινών στις φαρμακευτικές εγκαταστάσεις οφείλεται στη χρήση μεγάλου όγκου νερού στην επεξεργασία (αποτελεί βασικό συστατικό πολλών προϊόντων και χρησιμοποιείται για το καθαρισμό του εξοπλισμού). Ο μικροοργανισμός που βρέθηκε και σχετίζεται με το νερό

είναι το αρνητικό κατά Gram βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* καθώς τέτοια βακτήρια μπορούν να αναπτυχθούν σε φτωχά θρεπτικά υποστρώματα όπως το νερό και μπορούν να βρεθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις σε τέτοιου τύπου περιβάλλοντα (Sanlde, 2015).

Όπως αναφέρθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο (Κεφαλαίο 3.2) και στις τέσσερις δειγματοληψίες που έγιναν παρατηρήθηκε ανάπτυξη βακτηρίων σε δύο από τα επτά στάδια παραγωγής αποστειρωμένου νερού. Καθώς αυτά τα στάδια είναι διαδοχικά (1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> μικτή στήλη) είναι πιθανό η μόλυνση που έχει δημιουργηθεί στη 1<sup>η</sup> μικτή στήλη να μεταφέρεται και στη 2<sup>η</sup> στήλη ενώ στη συνέχεια τα επόμενα στάδια να περιλαμβάνουν πιο ισχυρές μεθόδους αποστείρωσης και δεν παρατηρήθηκε καμία ανάπτυξη. Αυτό μπορεί να είναι αποτέλεσμα δημιουργίας βιουμενίου στη στήλη επεξεργασίας του νερού. Τα βιουμένια είναι φυσικές κοινότητες βακτηρίων, όπου συναντιόνται σε αυτά τα συστήματα (Sanlde, 2015).

Τα βιουμένια σχηματίζονται από βακτήρια τα οποία είναι προσκολλημένα το ένα με το άλλο και με επιφάνειες. Ο σχηματισμός βιουμενίου ακολουθεί αρκετά βήματα. Αρχικά τα βακτήρια βρίσκονται σε κατάσταση αναστρέψιμης προσκόλλησης, δηλαδή σε αυτή τη φάση μπορούν να αποκολληθούν υπό συνθήκες από την επιφάνεια. Αυτό με την πάροδο του χρόνου μετατρέπεται σε μια μη αναστρέψιμη προσκόλληση. Μέσα σε λίγες μέρες σχηματίζονται μικρο-αποικίες, οδηγώντας στη δημιουργία τελικά του βιουμενίου (Wingender, 1999). Γενικά η ομάδα των Gram αρνητικών βακτηρίων σχηματίζει πιο εύκολα βιουμένια καθώς, εξαιτίας της μορφολογίας τους τα βακτήρια προσκολλώνται πιο εύκολα στις επιφάνειες. Τα βακτήρια αυτά στην κυτταρική μεμβράνη τους διαθέτουν *Pili* (*Fimbriae*), δηλαδή λεπτά πρωτεϊνούχα εξαρτήματα τα οποία βοηθούν στην προσκόλληση του κυττάρου με επιφάνειες (Sandle, 2015 β, Jiminez, 2004). Σε τέτοια συστήματα επεξεργασίας του νερού, ο σχηματισμός βιουμενίου συνδέεται με διακοπές λειτουργίας στη γραμμή παραγωγής απιονισμένου νερού ή περιόδους πολύ μικρής χρήσης του νερού, όπου επηρεάζεται η ταχύτητα ροής του στο σύστημα επεξεργασίας του. Ο σχηματισμός βιουμενίων μπορεί επίσης να είναι προϊόν λάθους σχεδίασης του συστήματος σε ότι αφορά τον τύπο του υλικού που χρησιμοποιείται για τις σωληνώσεις, τη διάμετρο αυτών και τη ταχύτητα που κυκλοφορεί το νερό (Sandle, 2013). Η δημιουργία βιουμενίων είναι δύσκολο να αποφευχθεί και είναι αναγκαίος ένας διαφορετικός τρόπος προσέγγισης. Ο καλός σχεδιασμός του συστήματος επεξεργασίας

του νερού είναι βασικός παράγοντας που θα κρατήσει τα συστήματα αυτά σε ικανοποιητική κατάσταση (Lehtola και συνεργάτες 2004).

Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού του μικροβιακού φορτίου στο νερό, έδειξαν ότι βρισκόταν εντός των ορίων που ορίζονται από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή Φαρμακοποιίας και στις τέσσερις δειγματοληψίες που είναι  $10^4$  cfu/ml. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό του μικροβιακού φορτίου του νερού κατά τα στάδια επεξεργασίας του μπορεί να υποεκτιμά το μικροβιακό φορτίο σε σχέση με τεχνικές μικροσκοπίας φθορισμού που εκτός των άλλων μπορούν να διακρίνουν τόσο τον ολικό αριθμό κυττάρων όσο και τον αριθμό των μεταβολικά ενεργών κυττάρων ( Kawai και συνεργάτες, 2004).

Ύστερα και από τη μοριακή ταυτοποίηση μέσω ανάλυσης της αλληλουχίας 16S rRNA, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι από τα τέσσερα στελέχη που εμφάνισαν θετικό αποτέλεσμα ως προς τη παρουσία ενδοτοξίνης μετά το LAL τεστ τα τρία: *Escherichia fergusonii* EC3, *Pseudomonas aeruginosa* AT και *Shigella flexneri* W3 είναι Gram αρνητικά, ενώ το τέταρτο *Staphylococcus xylosus* S1E17 ανήκει στην κατηγορία των Gram θετικών βακτηρίων.

*Escherichia fergusonii* EC3: Είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο, στενά συνδεδεμένο με το είδος *Escherichia coli*, ενώ απομονώθηκε για πρώτη φορά από δείγματα ανθρώπινου αίματος. Το στέλεχος *Escherichia fergusonii* μολύνει ανοιχτές πληγές όπως επίσης και μπορεί να προκαλέσει λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος (Savini και συνεργάτες, 2008). Ο τρόπος δράσης των LPS που προκύπτουν από το στέλεχος *Escherichia fergusonii* είναι πανομοιότυπος με αυτόν στο στέλεχος *Escherichia coli* (Wragg και συνεργάτες, 2009) και περιγράφεται στο Κεφάλαιο 5.1.

*Pseudomonas aeruginosa* AT: Είναι ένα από τα πιο σημαντικά παθογόνα βακτήρια που συναντώνται σε ανοσοκατεσταλμένους ξενιστές με κυστική ίνωση (CF) και ο λιποπολυσακχαρίτης που απελευθερώνεται από αυτόν τον οργανισμό είναι βασικός παράγοντας για τη λοιμογόνο δράση του. Το λιπίδιο A των LPS μπορεί μεταβλητά να είναι πεντ-, εξα- ή επτα- ακετυλιωμένο και αυτές οι ισομορφές έχουν διαφορετικές δυνάμεις όταν ενεργοποιούν την έμφυτη ανοσία του ξενιστή μέσω δέσμευσης στον υποδοχέα TLR4. Συνολικά υπάρχει μια μεγάλη ποσότητα πληροφοριών σχετικά με τα γονίδια και τα ένζυμα που απαιτούνται για την απελευθέρωση των LPS από το

*Pseudomonas aeruginosa* και έχουν διεξαχθεί σημαντικές βιολογικές και αναστολογικές μελέτες για το καθορισμό του ρόλου των LPS στη λοιμογόνο ικανότητα και την ανοσία στη μόλυνση του *Pseudomonas aeruginosa*, (Suzuki και συνεργάτες 2001).

*Shigella flexneri* W3: Το βακτήριο *Shigella flexneri* είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο που προκαλεί τις πιο μεταδοτικές βακτηριακές δυσεντερίες. Η παθογένεια του *Shigella flexneri* βασίζεται στην ικανότητα του βακτηρίου να εισβάλλουν και να αναπαράγονται εντός του εντέρου, με αποτέλεσμα τη δημιουργία φλεγμονής και την καταστροφή του επιθήλιου. Γενικότερα τα πυρετογόνα που προέρχονται από την οικογένεια των *Enterobacteriaceae* πιστεύεται ότι είναι ο κύριος παράγοντας μόλυνσης ενός ενέσιμου διαλύματος που παρασκευάζεται χωρίς τις κατάλληλες διαδικασίες απολύμανσης και αποστείρωσης (Magalhães και συνεργάτες, 2007). Στο βακτήριο *Shigella flexneri* το αντιγόνο O των LPS έχει δύο μεγέθη, ένα μικρό (SOAg) από 11 έως 17 επαναλαμβανόμενες μονάδες και ένα πιο μεγάλο (VL-OAg) περίπου 90 επαναλαμβανόμενων μονάδων (Martinic και συνεργάτες, 2011). Μελέτες έχουν δείξει ότι η δομή των LPS στο συγκεκριμένο στέλεχος τροποποιείται σε απόκριση του pH. Οι μελέτες αυτές δείχνουν ότι το χαμηλό pH (pH 3,5) προκαλεί τροποποιήσεις των LPS, αυξάνοντας την αντίσταση τους σε αυτή την περιβαλλοντική κατάσταση. Τόσο οι περιοχές του O αντιγόνου όσο και του λιπιδίου A των LPS στο βακτηριακό στέλεχος *Shigella flexneri* τροποποιείται σε μέτριες όξινες συνθήκες όπου αυτές οι τροποποιήσεις με τη σειρά τους έχουν αντίκτυπο στην αντοχή αυτού του παθογόνου σε οξέα (McGowan και συνεργάτες, 1998).

*Staphylococcus xylosus* S1E17: Είναι ένα θετικό κατά Gram βακτήριο που συνήθως υπάρχει στο δέρμα και στους βλεννογόνους υγιών ανθρώπων. Ο παθογόνος χαρακτήρας που μπορεί να έχει και ο μηχανισμός μόλυνσης έχουν αποκτήσει σημαντικό ενδιαφέρον λόγω της αντοχής του σε διάφορα αντιβιοτικά (Taik Oh και συνεργάτες 2019) μεταξύ αυτών της πενικιλίνης και των κεφαλοσπορινών (Al-Shuneigat και συνεργάτες, 2005). Αυτό το είδος θεωρείται ως μη παθογόνο, αλλά μερικά στελέχη σχετίζονται με ευκαιριακές λοιμώξεις του ανθρώπου. Επιπλέον μερικά στελέχη *Staphylococcus xylosus* έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν βιουμένια (Akhaddar και συνεργάτες, 2010).

Υπάρχει μια μακροχρόνια συζήτηση ως προς το αν η πεπτιδογλυκάνη των Gram θετικών βακτηρίων ενεργοποιεί μια απόκριση στη δοκιμασία LAL. Στην παρούσα Διπλωματική Εργασία υπήρξε μια τέτοια περίπτωση όπου το στέλεχος με κωδική ονομασία S1E17

έδειξε θετικό αποτέλεσμα ως προς την παρουσία ενδοτοξίνης ενώ στη συνέχεια και μετά την ταυτοποίηση αυτού του στελέχους το αποτέλεσμα έδειξε ότι ήταν θετικά κατά Gram βακτήριο (*Staphylococcus xylosus*). Η πεπτιδογλυκάνη (PEG), είναι το κύριο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των Gram θετικών βακτηρίων ενώ υπάρχει και σε ένα λεπτό στρώμα στα Gram αρνητικά όπως περιγράφεται και στο Κεφάλαιο 1. Απελευθερώνεται κατά τη λύση του κυτταρικού τοιχώματος και επομένως ταιριάζει στον ορισμό της ενδοτοξίνης. Ωστόσο σε σύγκριση με τα LPS, η δράση του PEG είναι σχετικά περιορισμένη. Λαμβάνοντας υπόψη ότι περιπτώσεις σήψης από Gram θετικά βακτήρια αποτελούν το 50% αυτών των περιπτώσεων, ο ρόλος του PEG σε περιπτώσεις πυρετού, σήψης και φλεγμονής έχει μελετηθεί ελάχιστα (Angus και συνεργάτες 2001, Cohen και Abraham +1999). Το PEG και τα παράγωγά του έχει βρεθεί ότι εμπλέκονται σε μια σειρά γνωστών νόσων, ιδιαίτερα αυτά που ενεργοποιούν το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα, ενώ έρευνες έχουν δείξει ότι σε πολλές περιπτώσεις οι πεπτιδογλυκάνες συνδέονται και με τη σήψη. Αποδεικνύεται ότι το PEG μοιράζεται πολλές από τις ιδιότητες των LPS όταν πρόκειται για φλεγμονώδης ιδιότητες και από αυτή την άποψη το PEG πρέπει να θεωρηθεί ως ενδοτοξίνη, αν και οι μηχανισμοί με τους οποίους τα κύτταρα αναγνωρίζουν τα LPS και το PEG είναι διαφορετικοί (Myhre και συνεργάτες 2006). Παρόλο που τα πυρετογόνα, μη ενδοτοξινικής προέλευσης είναι θεωρητικά παρόντα, οι κίνδυνοι που μπορεί να προκαλέσουν είναι χαμηλοί στις περισσότερες διαδικασίες. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι απαιτούνται σημαντικές ποσότητες μικροβιακού υλικού για τη πρόκληση πυρετού. Για παράδειγμα στις περιπτώσεις μόλυνσης με *Staphylococcus* απαιτείται συγκέντρωση 1 µg/kg για να προκαλέσει πυρετογόνο απόκριση σε σύγκριση με την ενδοτοξίνη που απαιτείται 0,5 EU (0,05 ng/kg) (Novitsky, 2002). Έχοντας αναφέρει και στο Κεφάλαιο 1 μια σειρά μικροβιακών πυρετογόνων, το ερώτημα που τίθεται είναι αν υπάρχει κίνδυνος από μικροβιακά πυρετογόνα που δεν προέρχονται από ενδοτοξίνη σε φαρμακευτικές διεργασίες. Πρόβλημα επίσης θεωρείται και το γεγονός ότι συστατικά από Gram θετικά βακτήρια μπορούν να διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα, όπως πεπτιδογλυκάνες, λιποθεϊκά οξέα και άλλα, χωρίς να μπορούν να ανιχνευτούν από τις δοκιμασίες LAL. Το συστατικό που μπορεί να ανιχνευτεί τις περισσότερες φορές από αυτή τη δοκιμασία είναι μόνο η πεπτιδογλυκάνες (Morath και συνεργάτες, 2005). Συμπερασματικά υπάρχουν αντιγόνα εκτός από αυτά των LPS, τόσο από Gram αρνητικά όσο και από Gram θετικά βακτήρια που μπορούν να δώσουν θετικό αποτέλεσμα στην αντίδραση LAL. Επίσης στην περίπτωση του στελέχους *Staphylococcus xylosus* το πήκτωμα με τη χρώση νιτρικού αργύρου δεν έδειξε καθόλου

πρότυπες ζώνες όπως αυτές εμφανίζονται στη περίπτωση των LPS και συνεπώς το πρωτόκολλο εκχύλισης και καθαρισμού των LPS που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία δεν μπορεί να εφαρμοστεί στην περίπτωση των πεπτιδογλυκανών.

Πολλές τεχνικές έχουν εφαρμοστεί στο παρελθόν, για την εκχύλιση και καθαρισμό των λιποπολυσακχαριτών από τα Gram αρνητικά βακτήρια. Μερικές από αυτές είναι δύσκολες και στην εφαρμογή τους ή ακόμα και καρκινογόνες, ενώ άλλες είναι απλές, οικονομικά αποδοτικές και το τελικό προϊόν είναι υψηλής καθαρότητας (Perdomo και Montero-Alejo, 2006, Rezanian και συνεργάτες 2011). Το βακτηριακής προέλευσης ένζυμο, Proteinase K που χρησιμοποιήθηκε στη μέθοδο ζεστής φαινόλης νερού οδηγεί σε εξαιρετικά καθαρά LPS χωρίς πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα (Apicella 2008, Rezanian και συνεργάτες 2011). Η εκχύλιση των LPS με τη μέθοδο ζεστής φαινόλης νερό και Proteinase K έδωσε εξαιρετικά καθαρά LPS όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.16. Η απουσία επιμόλυνσης θα μπορούσε να οφείλεται στην επεξεργασία με ένζυμο που επιτρέπει την έγκαιρη αποβολή των μολυσματικών παραγόντων όπως επίσης και στην απομάκρυνση υπολειμματικών ενζύμων (Rezanian και συνεργάτες 2011). Καθώς αυτά τα βήματα έλειπαν από τη μέθοδο μεθανόλης – χλωροφορμίου το πήκτωμα με χρώση Coomassie Blue έδειξε την παρουσία μόλυνσης από πρωτεΐνες (Εικόνα 3.20). Ακόμα, η μέθοδος ζεστής φαινόλης νερού παρουσία Proteinase K έδωσε καθαρό προϊόν (LPS) σε σχέση με τη δεύτερη μέθοδο που εφαρμόστηκε. Στην παρούσα εργασία αυτό φάνηκε και στη χρώση του πηκτώματος με νιτρικό άργυρο καθώς στην πρώτη περίπτωση η εικόνα έδειξε το χαρακτηριστικό πρότυπο των LPS, (Εικόνα 3.17) σε σύγκριση με τη δεύτερη περίπτωση που το προϊόν ήταν μολυσμένο και η εικόνα των LPS στο πήκτωμα δεν ήταν η αναμενόμενη (Εικόνα 3.21). Παρόλο το αποτέλεσμα της παρούσας Διπλωματικής Εργασίας ως προς την αναποτελεσματικότητα της εκχύλισης καθαρού LPS με τη μέθοδο μεθανόλης χλωροφορμίου αποτελέσματα παρόμοιων ερευνών έδειξαν ότι η εκχύλιση που πραγματοποιήθηκε με αυτή τη μέθοδο έδωσε καθαρά LPS (Wang και συνεργάτες, 2015). Το ερώτημα σχετικά με τον τρόπο με τον οποίο μπορεί να γίνει εκχύλιση των ενδοτοξινών με οικονομικό και αποτελεσματικό τρόπο έχει προσελκύσει την προσοχή πολλών ερευνητών. Η συζήτηση σχετικά με την απομάκρυνση των ενδοτοξινών από βιολογικά παρασκευάσματα και η εξέταση τέτοιων προσεγγίσεων είναι υποχρεωτικές προκειμένου να αναπτυχθούν στο μέλλον πιο εξευγενισμένες μέθοδοι. Ωστόσο το ζήτημα δεν έχει επιλυθεί ακόμα ικανοποιητικά (Apicella, 2008).

Στην παρούσα Διπλωματική Εργασία στην τεχνική με χρώση νιτρικού αργύρου για την ανίχνευση των LPS χρησιμοποιήθηκε μια τροποποιημένη μέθοδος (Fomsgaard και συνεργάτες, 1990) στην οποία παραλείπεται το πρώτο στάδιο της κλασικής μεθόδου (Tsai και Frasc, 1982). Ενώ στην κλασική μέθοδο το πρώτο στάδιο της τεχνικής περιλαμβάνει την παραμονή του πηκτώματος πολυακρυλαμίδης σε διάλυμα 40% αιθανόλη- 5% οξικό οξύ για 24 ώρες, στη τροποποιημένη μέθοδο αυτό δεν έγινε και το πήκτωμα τοποθετήθηκε αμέσως σε διάλυμα 40% αιθανόλη 5% οξικό οξύ και 0,7% περιοδικό οξύ όπως περιγράφεται αναλυτικά και στο Κεφάλαιο 2.8.2.

Όπως αναφέρεται και βιβλιογραφικά (Kalambhe και συνεργάτες, 2017) η κλασική μέθοδος είναι τρεις έως τέσσερις φορές πιο ευαίσθητη από την τροποποιημένη μέθοδο χρώσης με νιτρικό άργυρο για την ανίχνευση LPS που προέρχονται από βακτήρια του γένους *Escherichia*, *Salmonella* κ.α. Η μείωση της ευαισθησίας στη τροποποιημένη μέθοδο οφείλεται στη παράλειψη του πρώτου μέρους αν και η κλασμάτωση των LPS στο πήκτωμα κατά τη διάρκεια οξείδωσης μπορεί να εξαρτάται από τις δομές των τμημάτων των λιπιδίων Α. Πιο αναλυτικά μετά την οξείδωση των LPS από το περιοδικό οξύ (2.10.2) οι εξόζες που υπάρχουν στο Λιπίδιο-Α καθιστούν τις ομάδες αλδεϋδης διαθέσιμες για αντίδραση με τον νιτρικό άργυρο. Αυτός είναι και ο λόγος όπου οι ζώνες στο πήκτωμα εμφανίζονται με πιο έντονο χρώμα από τον άργυρο σε σχέση με τις ζώνες του Ο-Αντιγόνου. Παρόλα αυτά οι Fomsgaard και συνεργάτες τους (1990) αποκάλυψαν ότι η κλασική μέθοδος δεν χρωματίζει ορισμένα παρασκευάσματα LPS που περιέχουν χαμηλό αριθμό λιπαρών οξέων, τα οποία εκπλύθηκαν από τα πηκτώματα κατά τη διάρκεια του αρχικού σταδίου. Στην τροποποιημένη μέθοδο η αύξηση του χρόνου οξείδωσης σε περιοδικό οξύ από 5 σε 20 λεπτά, αποδείχτηκε αποτελεσματική και την ικανότητα ανίχνευσης όλων των LPS (Tan και Grewal, 2002). Συμπερασματικά κάθε μία από τις δύο μεθόδους έχει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά της. Η κλασική μέθοδος είναι πιο ευαίσθητη, αλλά χρονοβόρα. Επιπλέον, δεν ανιχνεύει εκείνα τα LPS που περιέχουν χαμηλό αριθμό λιπαρών οξέων. Αντίθετα, η τροποποιημένη μέθοδος είναι απλούστερη και ταχύτερη και ανιχνεύει LPS που δεν μπορούν να ανιχνευτούν με την κλασική μέθοδο. Προτείνεται, όπως έγινε και στην παρούσα μελέτη, η χρήση και των δύο μεθόδων για μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα των λιποπολυσακχαριτών.

Ενώ υπάρχουν πολλές μέθοδοι ανίχνευσης LPS (Fomsgaard, 1990, Tsai και Frasc 1982) οι περισσότερες από αυτές δεν παρέχουν τη δυνατότητα για την άμεση ανίχνευση τους σε δείγματα όπως το αίμα ή νερό. Μια ιδανική μέθοδος για την ανίχνευσή των LPS θα



πρέπει να είναι αρκετά ευαίσθητη ώστε να ανιχνεύει χαμηλές συγκεντρώσεις και να χρησιμοποιεί αντισώματα ή θέσης πρόσδεσης που παρέχουν επιλεκτικότητα (Schreiber και συνεργάτες, 2005). Πολλές νέες προσεγγίσεις έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση LPS, που όμως δεν είναι όλες λειτουργικές ή δεν έχουν την απαιτούμενη ευαισθησία ή ευκολία χρήσης. Ένας σημαντικός λόγος για αυτό είναι η αποτυχία ενσωμάτωσης των ιδιοτήτων του O-αντιγόνου των LPS στην προτεινόμενη μεθοδολογία. Ενώ η μέθοδος LAL είναι οι πιο ευαίσθητη για τον έλεγχο της ενδοτοξικότητας, η ταυτοποίηση του O-αντιγόνου με υψηλό βαθμό επιλεκτικότητας παραμένει αόριστη και περιορίζεται σε μεθόδους όπως ELISA (Reither και συνεργάτες, 2009). Η χρήση PAMPs (Pathogen-associated molecular pattern) με επιφάνειες σχεδιασμένες, για τη μέγιστη δέσμευση και αναγνώριση των LPS είναι μια πιθανή λύση για την επίτευξη ενός τέτοιου σκοπού. Πολλές προηγμένες μέθοδοι όπως φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής σύνθετης αντίστασης (Electrochemical Impedance Spectroscopy-EIS) [Kim και συνεργάτες, 2012], η χρήση αντιμικροβιακών ουσιών, όπως πολυμυξίνη (Ding και συνεργάτες 2017), η χρήση συνθετικών πολυμερών (Lan και συνεργάτες, 2012), οι οπτικές ανοσοδοκιμασίες (Monoclonal antibody-MAb) (Kerr και συνεργάτες, 2001) και οι δοκιμασίες διπλής στιβάδας λιπιδίων (Lipid dileysers) (Stromberg και συνεργάτες, 2016) έχουν εφαρμοστεί για την ανίχνευση των LPS. Αυτές οι μεθοδολογίες περιλαμβάνουν τη λειτουργία βιοαισθητήρων με πρωτεΐνες ή μόρια για την απομάκρυνση του LPS από ένα δείγμα.

## ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Τους καλοκαιρινούς μήνες και τους μήνες του φθινόπωρου εμφανίζεται μεγαλύτερη βακτηριακή συγκέντρωση στους χώρους της Φαρμακοβιομηχανίας. Αυτό αντιστοιχεί με τη συγκέντρωση βακτηρίων που υπάρχει στο εξωτερικό περιβάλλον αυτούς τους μήνες βάση βιβλιογραφίας.
2. Αποδείχθηκε ότι στη γραμμή παραγωγής φαρμακευτικών προϊόντων αλλά και παραγωγής απιονισμένου νερού μπορεί να υπάρξουν βακτηριακά στελέχη με δυνατότητα απελευθέρωσης ενδοτοξίνης.
3. Περιβαλλοντικά βακτηριακά στελέχη έχουν τη δυνατότητα απελευθέρωσης ενδοτοξίνης κάτω από συνθήκες λύσης της κυτταρικής τους μεμβράνης.
4. Ύστερα από τη δοκιμασία LAL στα στελέχη, φάνηκε η δυνατότητα ανίχνευσης της πεπτιδιγλυκάνης που απελευθερώνεται από τα Gram θετικά βακτήρια όπως το *Staphylococcus xylosus* S1E17.
5. Το τροποποιημένο πρωτόκολλο για τη χρώση με νιτρικό άργυρο φάνηκε να είναι πιο αποτελεσματικό για την ανίχνευση LPS που απελευθερώνονται από περιβαλλοντικά δείγματα.
6. Πιο αποτελεσματική μέθοδος για την εκχύλιση των LPS, φάνηκε να είναι η μέθοδος ζεστής φαινόλης-νερού με Proteinase K καθώς δίνει καθαρά LPS χωρίς πρωτεϊνικά κατάλοιπα.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akbar J.B., Kamaruzzaman B.Y., Jalal K.C.A. & Kassim Z. (2012) TAL – a source of bacterial endotoxin detector in liquid biological samples. *International Food Research Journal* 19, 423–425.
- Akhaddar A., Elouennass M., Naama O. & Boucetta M. (2010) *Staphylococcus xylosus* isolated from an otogenic brain abscess in an adolescent. *Surg. Infect.* 11, 559-561.
- Al-Shuneigat J., Cox S.D. & Markham J.L. (2005) Effects of a topical essential oil-containing formulation on biofilm-forming coagulase-negative staphylococci. *Lett. Appl. Microbiol.* 41, 52-55.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A., Zhang Z., Miller W. & Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402.
- Amato P., Ménager M., Sancelme M., Laj P., Mailhot G. & Delort, A.M. (2005) Microbial population in cloud water at the Puy de Dôme: implications for the chemistry of clouds. *Atmos. Environ.* 39, 4143-4153.
- American Society for Microbiology (1957). *Manual of Microbiological Methods*.
- Angus D.C., Linde-Zwirble W.T., Lidicker J., Clermont G., Carcillo J. & Pinsky M.R. (2001) Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical Care Medicine* 7, 1303-1310.
- Anspach F.B. (2001) Endotoxin removal by affinity sorbents. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 49, 665-681.
- Anwar M.A. & Choi S. (2014) Gram-Negative Marine Bacteria: Structural Features of Lipopolysaccharides and Their Relevance for Economically. *Marine drugs* 12, 2485-2514.
- Apiccela M.A. (2008) Isolation and characterization of lipopolysaccharides. *Methods Mol Biol* 4313-4318.
- Atlas R. (1993). *Handbook of microbiological media* (3rd ed.). (L. Parks, Ed.) CRC Press, Boca Raton, USA.
- Beutler B. & Rietschel E.T. (2003) Innate Immune Sensing and Its Roots: The Story of Endotoxin. *Nature Reviews Immunology* 3, 169–176.
- Bidne K., Dickson M., Ross J.W., Baumgard L.H. & Keating A.F. (2018) Disruption of female reproductive function by endotoxins. *Society for Reproduction and Fertility* 169-181.
- Bowers R. M., McCubbin I. B., Hallar A. & Fierer N. (2012). Seasonal variability in airborne bacterial communities at a high-elevation site. *Atmospheric Environment* 50, 41-49.
- Brodie E.L., DeSantis T.Z., Moberg Parker J.P., Zubietta I.X., Piceno Y.M. & Andersen G.L. (2007) Urban aerosols harbor diverse and dynamic bacterial populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 299-304.
- Chaby R. (2004) Lipopolysaccharide-binding molecules: Transporters, blockers and sensors. *Cell. Mol. Life Sci.* 6, 1697–1713.

- Cohen J. & Abraham E. (1999). Microbiologic findings and correlations with serum tumor necrosis factor- $\alpha$  in patients with severe sepsis and septic shock. *Journal of Infection Diseases* 180, 116-121.
- Cohen J. (2002) The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420, 885–891.
- Ding J.L. & Ho B. (2001) A new era in pyrogen testing. *Trends Biotechnol* 19, 277–281.
- Ding S.J., Chang B.W., Wu C.C. & Chen C.J. (2017) A new method for detection of endotoxin on polymyxin B-immobilized gold electrodes. *Electrochemistry Communications* 2, 1206-1211.
- Dullah E.C. & Ongkudon C.M. (2016) Current trends in endotoxin detection and analysis of endotoxin-protein interactions, *Critical Reviews in Biotechnology* 37, 251-261.
- Dziarski R. & Gupta D. (2006) The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). Protein family review *Genome Biol.* 7, 232.1-232.13.
- Fijita Y., Tokunaga T., & Kataoka H. (2010) Saline and buffers minimize the action of interfering factors in the bacterial endotoxins test. *Analytical Biochemistry* 409, 46-53.
- Fiske M., Ross A., VanDerMeid K. & McMichael J.C. (2001) Method for reducing endotoxin in *Moraxella catarrhalis* UspA2 protein preparations. *Journal of Chromatography B: Biomedical Science and Applications* 753, 269-278.
- Fomsgaard M.A., Freudenberg C. & Galanos J. (1990). Modification of the silver staining technique to detect lipopolysaccharide in polyacrylamide gels. *Clin. Microbiol.* 28, 2627-2631.
- Foukas L.C., Katsoulas, H.L., Paraskevopoulou N., Metheniti A., Lambropoulou M. & Marmaras V.J. (1998) Phagocytosis of *Escherichia coli* by insect hemocytes requires both activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway for attachment and  $\beta$ 3 integrin for internalization. *J. Biol. Chem.* 41, 14813-14818.
- Gutsmann, T., Hagge, S.O., David, A., Roes, S., Bohling, A., Hammer, M.U. & Seydel, U. (2005) Lipid-mediated resistance of Gram-negative bacteria against various spore-forming antimicrobial peptides. *J. Endotoxin Res.* 167-173.
- Harald, F.M. (2001) Gleanings of a chemiosmotic eye. *Bioessays* 23, 848-855.
- Haught C., Wilkinson D.L., Zgafas K. & Harrison R.G. (1994). A method to insert a DNA fragment into a double-stranded plasmid. *Biotechniques*, 16, 46-48.
- Hauser A.R., Stevens D.L., Kaplan L. & Schlievert M. (1991) Molecular analysis of pyrogenic exotoxins from *Streptococcus pyogenes* isolates associated with toxic shock-like syndrome. *J Clin Microbiol.* 29, 1562–1567.
- Hideharu S. (2016) Validation Study and Quality Assurance of Pharmaceutical Water, Waterborne Microorganisms and Endotoxins. *Biocontrol science* 29, 203-214.
- Hirayama C. & Sakata M. (2002) Chromatographic removal of endotoxin from protein solutions by polymer particles. *J Chrom* 781, 419-432.
- Hoffmann S., Peterbauer A., Schindler S. & Hartung T. (2005) International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoïd cells. *Journal of Immunological Methods* 298, 161-173.
- Holtje, J.V. (1998) Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 181-203.

- Hopwood D.A., Bibb M.J., Chater K.F., Kieser T., Bruton C.J., Kieser H.M., Lydiat D. J., Smith C.P., Ward J.M. & Schrepf H. (1985) Genetic manipulation of *Streptomyces*. A laboratory manual. John Innes Foundation, Norwich, UK
- Hort, E. C. & Penfold, W. J. (1912) Microorganisms and their relation to fever: Preliminary communication. *J Hyg* 12,361-390.
- Hurley J. (1995) Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. *Clinical Microbiology Review* 8, 268–292.
- Jang H., Kim H.S. & Moon S.C. (2009) Effect of protein concentration and detergent on endotoxin reduction by ultrafiltration. *BMB reports* 42, 462–466.
- Jiminez L. (2004) Microorganisms in the Environment and their relevance to Pharmaceutical Processes. In Jiminez, L. (Ed.) *Microbial Contamination Control in the Pharmaceutical Industry* 8-9.
- Johnson R.A., Uddin T., Aktar A., Mohasin M., Alam M. M., Chowdhury F., Harris J.B., Yu Y., Freeman Y.W., Sarracino D., Charles R.C. & Ryan E.T. (2015) Comparison of Immune Responses to the O-Specific Polysaccharide and Lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladeshi Adult Patients with Cholera. *Clinical and Vaccine Immunology* 1712-1721.
- Kalambhe D.G., Zade N.N., & Chaudgari S.P. (2017) Evaluation of Two Different Lipopolysaccharide Extraction Methods for Purity and Functionality of LPS. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 6, 1296-1302.
- Kawai M., Yamagishi J., Yamaguchi N., Tani K., & Nasu, M. (2004). Bacterial population dynamics and community structure in a pharmaceutical manufacturing water supply system determined by real-time PCR and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Applied Microbiology* 97, 1123-1131.
- Kembel, S.W., Jones, E., Kline, J., Northcutt, D., Stenson, J., Womack, A.M., Bohannan, B.J.M. & Brown, G.Z. (2012) Architectural design influences the diversity and structure of the built environment microbiome. *J. 6*, 1469–1479.
- Kerr P., Chart H., Finlay D., Pollock D.A., MacKie D.P. & Ball H.J. (2001) Development of a monoclonal sandwich ELISA for the detection of animal and human *Escherichia coli* O157 strains. *Journal of Applied Microbiology* 90,543-549.
- Kim S.E., Su W., Cho M., Lee Y. & Choe W.S (2012) Harnessing aptamers for electrochemical detection of endotoxin. *Analytical Biochemistry*. Elsevier Inc. 424,12-20
- Koizumi N., Morozumi A., Imamura M., Tanaka E., Iwahana H. & Sato R. (1997) Lipopolysaccharide-binding proteins and their involvement in the bacterial clearance from the hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*. *Eur. J Biochem* 248, 217–24.
- Kumar S., Pandey R., Bharti V., Sharma N., Singh J., Chanchal A. & Ahmad S. (2017) Evaluation of nanoparticles pyrogenicity. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences* 168-183.
- Lan M., Wu J., Liu W., Zhang W., Ge J. & Zhang H. (2012) Copolythiophene-derived colorimetric and fluorometric sensor for visually supersensitive determination of lipopolysaccharide. *Journal of the American Chemical Society* 134, 6685-6694.
- Lehtola M.J., Miettinen I. T. & Keinanen M.A. (2004) Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes. *Water Research* 38, 3769-3779.

- Lin M.F., Williams C., Murray M.V. & Ropp, P.A. (2005) Removal of lipopolysaccharides from protein-lipopolysaccharide complexes by nonflammable solvents, *Journal of Chromatography* 816, 167–174.
- Lopes A., Magalhães P., Mazzola P., Rangel-Yagui C., João C., Thereza C., Penna, V. & Pessoa P. (2010) LPS Removal From an E. Coli Fermentation Broth Using Aqueous Two-Phase Micellar System. *Biotechnology Progress* 26, 1644-1653.
- Magalhães P.O., Lopes A.M., Mazzola G.M., Rangel-Yagui C., Penna, T.C.V. & Pessoa A. Jr. (2007) Methods of Endotoxins Removal from Biological Preparations: a Review. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 10, 388-404.
- Mak T. & Saunders W. (2006) Immunity of Pathogens, *The Immune Response*, 641-694.
- Mandal, J. & Brandl, H. (2011) Bioaerosols in indoor environment—a review with special reference to residential and occupational locations. *Open Environ Biol Monit J* 4, 83–96.
- Martinic M., Hoare A., Contreras A. & Alvarez S. (2011) Contribution of the Lipopolysaccharide to Resistance of *Shigella flexneri* 2a to Extreme Acidity. *Plos One* 10, 25557.
- Mazgaen L. & Gurung P. (2020) Recent Advances in Lipopolysaccharide Recognition Systems. *International Journal of Molecular Sciences* 1-18.
- McGowan C.C., Necheva A., Thompson S.A., Cover T.L. & Blaser M.J. (1998) Acid-induced expression of an LPS-associated gene in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 30, 19–31.
- Michael R., Davis & Joanna B. Goldberg (2012) Purification and Visualization of Lipopolysaccharide from Gram-negative bacteria by hot Aqueous-phenol Extraction. *Journal of Visualized Experiments* 36.
- Miller C.S., Handley K.M., Wrighton K.C., Frischkom K.R., Thomas B.C., Banfield J.F. (2013) Short-Read Assembly of Full-Length 16S Amplicons Reveals Bacterial Diversity in Subsurface Sediments *PLOS ONE*
- Morath S., von Aulock S., & Hartung T. (2005) Structure/function relationships of lipoteichoic acids. *Journal Endotoxin Res.* 11,348-356.
- Moschandreas D.J, Pagilla K.R & Storino L.V. (2003) Time and space uniformity of indoor bacteria concentrations in Chicago area residences. *Aerosol Sci Technol.* 37, 899-906.
- Myhre A.E., Aasen A.O., Thiemermann C., & Wang J. E. (2006) Peptidoglycan - An endotoxin in its own right? *Shock* 25, 227-235.
- Novitsky T.J (2002) *Biomedical Applications of Limulus Amebocyte Lysate*. Springer Science & Business Media 315-359 .
- Papo N. & Shai Y. (2005) A Molecular Mechanism for Lipopolysaccharide Protection of Gram-negative Bacteria from Antimicrobial Peptides. *Journal of Biological Chemistry* 18. 10378-10387.
- Park, H. K., Han, J.-H., Joung, Y., Cho, S.-H., Kim, S.-A., & Kim, S. B. (2014). Bacterial diversity in the indoor air of pharmaceutical environment. *Journal of Applied Microbiology* 116, 718–727.

- Pearce D., Hughes K., Lachlan-Cope T., Harangozo S. & Jones A. (2010) Biodiversity of air-borne microorganisms at Halley station, Antarctica. *Extremophiles* 14, 145-159
- Perdomo- Morales R. & Montero-Alejo V. (2006) Purification of *E. coli* 055: B 5 lipopolysaccharides by size exclusion chromatography *Biotechnologia Aplicada* 23, 124-129.
- Peterbauer A., Eperon S., Jungi T.W., Werner R. & Werner-Felmayer G. (2000) Interferon-gamma-primed Monocytoid Cell Lines: Optimizing Their Use for in Vitro Detection of Bacterial Pyrogens. *Journal of Immunological Methods* 233, 67-76.
- Petsch D. & Anspach F.B. (2000) Endotoxin removal from protein solutions. *Journal of Biotechnology* 76, 97-119.
- Raetz C.R.H. & Whitfield C. (2001) Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71, 635–700.
- Rastegar H., Mirzaei A., Hedayati M., Ashtiani H.R.H. & Rahbar M (2011). A simple method for non phenolic extraction of lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* with high purity and pyrogenicity in rat. *Scientific Research and Essays*, 1101-1105.
- Reasoner D. & Geldreich E. E. (1985). A New Medium for the Enumeration and Subculture of Bacteria from Potable Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 49, 1-7.
- Reichelt P., Schwarz C. & Donzeau M. (2006) Single step protocol to purify recombinant proteins with low endotoxin contents, *Protein Expr Purif.* 46, 483-488.
- Reither K., Saathoff E., Jung J., Minja L.T., Kroidl I. & Saad E. (2009) Low sensitivity of a urine LAM-ELISA in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *BMC Infectious Diseases*. 9,141.
- Rezania S., Amirmozaffari N., Tabattaei B., Jeddi-Tehrani M., Zarrei O., Alizadeh R., Masjedian R. & Zarnani A.H. (2011) Extraction, Purification and Characterization of Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. *Avicenna J Med Biotechnol* 3, 3-9.
- Rintala H., Pitkäranta M., Toivola M., Paulin L. & Nevalainen A. (2008) Diversity and seasonal dynamics of bacterial community in indoor environment. *BMC Microbiology* 8, 56.
- Robert B., Brown A, & Julie A. (2008) Current technics for single-cell lysis *J. R. Soc. Interface* 5, S131–S138.
- Sambrook J.F. & Russell D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3-Volume Set). Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sampath V. P. (2015) Bacterial endotoxin-lipopolysaccharide; structure, function and its role in immunity in vertebrates and invertebrates. *Agriculture and Natural Resources* 115-120.
- Sandle T. (2004) Three aspects of LAL testing: Glucans, depyrogenation and water system qualification. *Pharmaceutical MIG News* 16, 3-12.
- Sandle T. (2013) Avoiding Contamination of Water Systems, *The Clinical Services Journal* 12, 33-36.

- Sandle T. (2015 α) Assessing Non-endotoxin Microbial Pyrogens in Relation in Pharmaceutical Processing. IVT.
- Sanlde T. (2015 β) Characterizing the Microbiota of a Pharmaceutical Water System-A Metadata Study. SOJ Microbiology & Infectious Diseases 1-8
- Sanlde T. (2016) Endotoxin and Pyrogen testing. Pharmaceutical Microbiology, 131-145.
- Sandle T. (2017) Design & Control of Pharma Water System to Minimize Microbiological Contamination. Pharmaceutical Engineering.
- Saraswat M., Musante L. & Ravidá A. (2013) Preparative Purification of Recombinant Proteins: Current Status and Future Trends, BioMed Research International, 1-18.
- Savini V., Catavittello C., Talia M., Manna A., Pompetti F., Favaro M., Fontana C., Febbo F., Balbinot A., Di Berardino F., Di Bonaventura G., Di Zacomo S., Esattore F. & D'Antonio D. (2008) Multidrug-resistant *Escherichia fergusonii*: a case of acute cystitis. Journal of Clinical Microbiology. 46, 1551–2.
- Schindler S., Aulock S. & Daneshian M. (2009) Development, validation and applications of the monocyte activation test for pyrogens based on human whole blood. Altex 26, 265–277
- Schreiber A., Humbert M., Benz A. & Dietrich U. (2005). Localization of conformational epitopes within three-dimensional structures of proteins. Journal of Computational Chemistry. 26, 879-887
- Schromm A.B., Brandenburg K., Loppnow H., Moran A.P., Koch M.H.J., Rietschel E.T. & Seydel U. (2000) Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion. European Journal of Biochemistry 267, 2008-2013.
- Shintani H. (2016) Validation Study and Quality Assurance of Pharmaceutical Water, Waterborne Microorganisms and Endotoxins. Biocontrol science 21, 203-214
- Soldatos A.N., Metheniti A., Mamali I., Lambropoulou M. & Marmaras V.J. (2003) Distinct LPS-induced signals regulate LPS uptake and morphological changes in med fly hemocytes. Insect Biochem. Mol. Biol. 33, 1075-1084.
- Steimle A., Autenrieth I.B. & Frick J.S. (2016) Structure and function: Lipid A modifications in commensals and pathogen. International Journal of Medical 306, 290-301.
- Stewart J. (2012) Immunity in Bacterial Infections. Medical Microbiology 151-155.
- Stromberg L.R., Hengartner N.W., Swingle K.L., Moxley R.A., Graves S.W. & Montañó GA. (2016) Membrane insertion for the detection of lipopolysaccharides: Exploring the dynamics of Amphiphile-in-Lipid Assays. PLoS ONE 11, 1-20
- Su W. & Ding X. (2015) Methods of endotoxin detection. Journal of laboratory automation 20, 354-364.
- Suzuki H., Ikezaki H., Chandiwalla R., Hong D. & Rubinstein I. (2001) Effects of *Pseudomonas aeruginosa* endotoxin on vasodilation in the intact spinotrapezius muscle. J Appl Physiol 91, 351–356.
- Taik Oh W., Woo Jun J., Sankar Giri S., Yun S., Joong Kim H., Guen Kim S., Wha Kim, S., Jin Han, S., Kwon, J. & Chang Park, S. (2019) Isolation and characterisation of pVa-21, a giant bacteriophage with anti-biofilm potential against *Vibrio alginolyticus*. Scientific Reports, 6284



- Tan L. & Grewal S.P. (2002) Comparison of Two Silver Staining Techniques for Detecting Lipopolysaccharides in Polyacrylamide Gels. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 4372-4374.
- Tan Y. & Kagan J.C. (2014) A cross-disciplinary perspective on the innate immune responses to bacterial lipopolysaccharide. *Mol. Cell* 54, 212–223.
- Tanaka H. & Yamakawan M. (2011) Regulation of the innate immune responses in the silkworm, *Bombyx mori*. *Inf. Syst. J.* 8, 59-69.
- Todar K. (2012) *Todar's online Textbook of Bacteriology*
- Tsai, C.M. & Frasch, C.F. (1982) A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 119, 115–119.
- Unger R.E., Peters K., Sartoris A., Freese C. & Kirkpatrick J. (2014) Human endothelial cell-based assay for endotoxin as sensitive as the conventional Limulus Amebocyte Lysate assay. *Biomaterials*. 35, 3180–3187.
- Wang X., Zhang C., Shi Fe. & Hu X. (2010) Purification and Characterization of Lipopolysaccharide. *Sub-cellular biochemistry* 53, 27-51.
- Wang X., Zhou A., Cai W., Yu D., Zhu Z., Jiang C. & Jin L. (2015) Highly sensitive fluorescent stain for detecting lipopolysaccharides in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 36, 1795–1800
- Wellington D. & Williams S. (1978) Preservation of actinomycetes inoculum in frozen glycerol. *Microbiology Letters*, 6, 151-157.
- Westphal, O. and Jann, K. (1965) Bacterial Lipopolysaccharides Extraction with Phenol-Water and Further Applications of the Procedure. *Methods in Carbohydrate Chemistry* 5, 83-91.
- Williams K.L. (2001) Endotoxins: Pyrogens, LAL testing and Depyrogenation 2nd Edition. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences* chapters 1,2,7,8
- Wingender J., Neu T. R. & Flemming, H. C. (1999) What are bacterial extracellular polymeric substances? *Microbial Extracellular Polymeric Substances* 1-19.
- Woldie W.A., Sattar A., Liu J. & Jackson S. (2017) Evaluation of recombinant factor C assay for the detection of divergent lipopolysaccharide structural species and comparison with Limulus amebocyte lysate-based assays and a human monocyte activity assay. *Journal of Medical Microbiology* 66.
- Wragg P., La Ragione R.M., Best A., Reichel R., Anjum M.F., Mafura M. & Woodward M.J. (2009) Characterisation of *Escherichia fergusonii* isolates from farm animals using an *Escherichia coli* virulence gene array and tissue culture adherence assays. *Research in Veterinary Science* 1, 27-35
- Yamamoto A., Ochiai M., Fujiwara H., Asakawa S., Ichinohe K., Kataoka M., Toyozumi H. & Horiuchi Y. (2000) Evaluation of the applicability of the bacterial endotoxin test to antibiotic products. *Biologicals*. 28, 155–167.
- Yassin M.F. & Almouqatea S. (2010) Assessment of airborne bacteria and fungi in an indoor and outdoor environment. *International Journal Environ Sci Technol* 7, 535–543.
- Yu X.Q. & Kanost M.R. (2004) Immulectin-2, a pattern recognition receptor that stimulates hemocyte encapsulation and melanization in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 891-900.

YuFukase K., Matsumoto N., Ito T., Yoshimura S., Kotani & S. Kusumoto. (1992) Synthetic study on lipoteichoic acid of gram positive bacteria. I. Synthesis of proposed fundamental structure of Streptococcus pyogenes lipoteichoic acid. Bull. Chem. Soc. Jpn. 65, 2643–2654.

Καραγκούνη-Κύρτσου Α. (2001). Εργαστηριακές Ασκήσεις Γενικής Μικροβιολογίας. Εκδόσεις Σταμούλης.

Validation Protocol Επεξεργασίας δικτύου διανομής απιονισμένου νερού. WI-QC-10.76, Version: 1.0

## **Ιστότοποι**

Dead bacteria and pyrogens. Microbiology WordPress.com (<https://smallthingsmattermcc.wordpress.com/2016/10/30/dead-bacteria-and-pyrogens/>)

European Pharmacopoeia 5.0. Bacterial endotoxins 2.6.14 ([www.gmpua.com](http://www.gmpua.com))

European Pharmacopoeia 9.4. Purified Water Monograph [www.pharmamicroresources.com](http://www.pharmamicroresources.com)

[blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. [www.globalresearchonline.net](http://www.globalresearchonline.net)

[www.whatman.com](http://www.whatman.com)

[www.diagenode.com/en/protocols](http://www.diagenode.com/en/protocols) Protein extraction from Tissues and Cultured Cells.

[www.mbl.edu/marine\\_org](http://www.mbl.edu/marine_org) The history of Limulus and endotoxin , Marine Biological Laboratory. Retrieved 24 September 2008.

[www.nelabservices.com](http://www.nelabservices.com)

EDQM revises 5.1.10. Guidelines for using the Test for Bacterial Endotoxins ([www.gmp-compliance.org](http://www.gmp-compliance.org))

[www.mbl.com](http://www.mbl.com)