



Københavns Universitet

Gram-positive bakteriers pyrogener er meget varmestabile

Moesby, Lise; Hansen, Erik Wind; Christensen, Jens Juul Dencker; Timm, Michael; Bartelt, Stine

Published in:
Lægemiddelforskning

Publication date:
2007

Document version
Også kaldet Forlagets PDF

Citation for published version (APA):
Moesby, L., Hansen, E. W., Christensen, J. J. D., Timm, M., & Bartelt, S. (2007). Gram-positive bakteriers pyrogener er meget varmestabile. *Lægemiddelforskning*, 8-9.

Gram-positive bakteriers pyrogener er meget varmestabile

Varmebehandling ødelægger ikke feberfremkaldende stoffer fra Gram-positive bakterier. Derfor bør det undersøges, om disse pyrogener er et reelt problem i sterile lægemidler. En ny laboratorietest kan påvise pyrogenerne, så man ikke behøver at bruge kaniner.

Af Lise Moesby, Erik Wind Hansen, Jens D. Christensen, Michael Timm, Stine Bartelt



Vor viden om Gram-positive bakterier og deres feberfremkaldende egenskaber er meget begrænset. Det skyldes, at man har manglet en egnet målemetode til at vurdere bakteriernes evne til at fremkalde feber. Vi har nu udviklet en laboratorietest, som kan måle Gram-positive bakteriers feberfremkaldende egenskaber og brugt den nye test til at undersøge, om Gram-positive bakteriers feberfremkaldende stoffer er resistente over for varmesterilisation.

Til studiet valgte vi den Gram-positive bakterie *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Stafylokokker er almindelige hudbakterier, som normalt er harmløse, men i visse tilfælde kan de være sygdomsfremkaldende, især ved infektion af syge og svækkede mennesker. Bakterierne danner en række toksiner, som medfører, at de kan forårsage feber, fødevarerforgiftning og toksisk shock-syndrom.

Ny laboratorietest kan spare forsøgsdyr

Feberfremkaldende stoffer kaldes for pyrogener, og de forårsager feber ved injektion i blodbanen på mennesker og højerestående dyr. Hvis pyrogener ind-

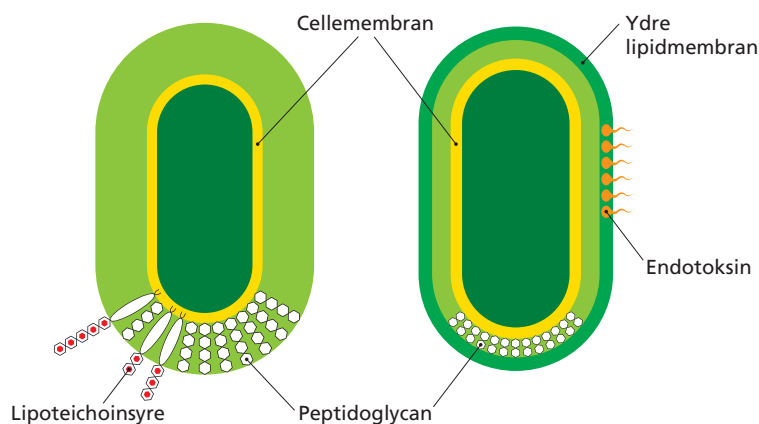
spørges i blodbanen, kan de ud over feber medføre alvorlige konsekvenser som anafylaktisk shock. Det er derfor vigtigt at have metoder til at undersøge, om lægemidler til injektion er forurenede med pyrogener.

Til sikring af et lavt indhold af pyrogener i lægemidler anvendes i dag to analyser: En kanin-pyrogen test og en endotoksintest. Endotoksintesten kan kun måle endotoksiner fra Gram-negative bakterier. Kaninpyrogen-testen kan påvise alle slags pyrogener. Kaniner anvendes til test for pyrogener, fordi deres følsomhed over for feberfremkaldende stoffer ligner menneskets. Princippet i metoden er, at stoffet, der ønskes undersøgt, indsprøjtes i kaninens blodbane, hvorefter man registrerer, om injektionen medfører en temperaturstigning. Men da det både er tidskrævende, dyrt og etisk problematisk at anvende forsøgsdyr, har vi udviklet en laboratorietest til måling af pyrogener.

Når et menneske får pyrogener i blodet, påvirkes nogle af de hvide blodlegemer, monocytterne, til at udskille signalstoffer, som kaldes cytokiner. Cytokinernes opgave er at regulere immunforsvaret ved infektion, sårheling og feber. Man kan isolere monocytter fra frisk humant blod og bruge dem til at teste stoffers pyrogene aktivitet. Isolerede monocytter vil, ligesom i blodbanen, udskille cytokiner, hvis der er pyrogener til stede. Det er dog problematisk at bruge blod fra mennesker til forsøg, bl.a. på grund af smittefare. Derfor har vi udviklet en laboratorietest, som er baseret på en standardiseret cellelinie af monocytter, som kaldes Mono Mac 6. Mono Mac 6-cellerne udskiller cytokinet interleukin-6, når de udsættes for pyrogener. Når et stofs pyrogene egenskaber skal testes, dyrkes Mono Mac 6-celler i nærvær af stoffet, og jo større mængde pyrogener stoffet indeholder, jo større er udskillelsen af interleukin-6.

GRAM-POSITIV BAKTERIE

GRAM-NEGATIV BAKTERIE

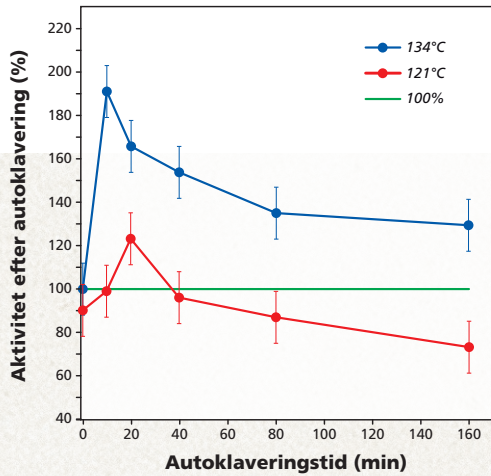


GRAM-POSITIV OG GRAM-NEGATIV BAKTERIER

Bakterier kan inddeles i to grupper: Gram-positive og Gram-negative bakterier. Opdelingen er baseret på opbygningen af bakteriernes cellevæg.

Gram-negative bakteriers cellemembran er omgivet af et tyndt lag peptidoglycan, og uden på dette lag har de endnu en lipidmembran. De Gram-negative bakteriers opbygning gør dem modstandsdygtige over for kemiske påvirkninger, mens de er mere følsomme over for fysiske påvirkninger end Gram-positive bakterier. Gram-negative bakterier har i deres ydre lipidmembran nogle særdeles potente feberfremkaldende stoffer, som kaldes endotoksiner. Endotoksiner er meget modstandsdygtige over for fysiske og kemiske påvirkninger, hvilket bl.a. betyder, at de ikke inaktiveres ved varmebehandling.

Gram-positive bakteriers cellemembran er omgivet af et tykt lag af peptidoglycan, som gør dem meget modstandsdygtige over for fysiske påvirkninger. Lipoteichoinsyre er forankret i cellemembranen og stritter ud gennem peptidoglycanlaget. Både lipoteichoinsyre og peptidoglycan er feberfremkaldende.



Pyrogen aktivitet af *Staphylococcus aureus* efter autoklaving: Bakterierne blev autoklaveret ved 121° C eller 134° C, og derpå blev deres pyrogene aktivitet undersøgt i Mono Mac 6-celler. Aktiviteten udregnet i procent af aktiviteten af ubehandlede bakterier, idet ubehandlede bakterier har 100 procent aktivitet.



Ph.d. Lise Moesby er lektor ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.



Ph.d. Erik Wind Hansen er lektor ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.



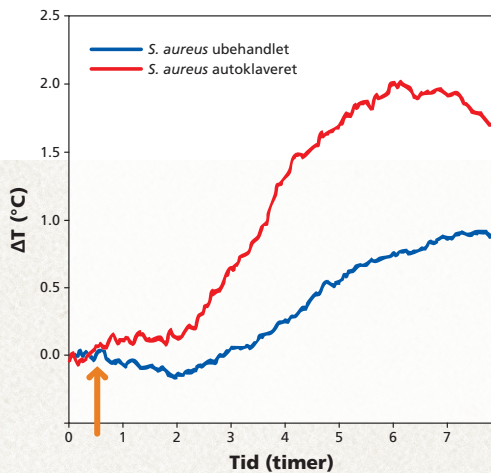
Ph.d. Jens D. Christensen er lektor ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.



Cand.pharm. Michael Timm er ph.d.-studerende ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.



Cand.scient. Stine Bartelt er amanuensis ved Institut for Farmakologi og Farmakoterapi.



Pyrogen aktivitet af *Staphylococcus aureus* i kaniner. *S. aureus* blev autoklaveret ved 121° C i 15 minutter, hvorpå bakteriesuspensionen blev indsprøjet i kaninen og dens kropstemperatur målt. Ændringen i kropstemperatur er afbildet som funktion af tiden. Pilen angiver injektionstidspunktet. Den røde kurve repræsenterer autoklaverede *S. aureus*, og den blå kurve viser resultaterne med ubehandlede, dræbte bakterier.

Staphylococcus aureus pyrogener tåler varmebehandling

Mono Mac 6-cellerne er meget anvendelige til måling af Gram-positive bakteriers pyrogener, hvilket giver mulighed for at undersøge disse pyrogens aktivitet efter autoklaving. Det er interessant, fordi autoklaving anvendes ved fremstilling af sterile lægemidler.

Autoklaving er en varmebehandling, som foretages i en slags trykkoger i mættet vanddamp ved 121° C i 15 minutter. Varmebehandlingen dræber bakterier og andre mikroorganismer, men de fjernes ikke fra lægemidlet. Vi har undersøgt effekten af autoklaving på den Gram-positive bakterie *S. aureus*. Ved forsøgene autoklaverede vi bakterierne og inkuberede dem derefter med Mono Mac 6-celler. Derpå målte vi mængden af pyrogener via cellernes udskillelse af interleukin-6 og sammenlignede med den aktivitet, som ubehandlede bakterier forårsager.

Resultaterne af forsøgene var meget overraskende! For den pyrogene aktivitet stiger faktisk efter varmebehandling af bakterierne i 15 minutter. Hvis behandlingstiden øges, falder aktiviteten igen og lander på omkring 80 procent af den aktivitet, som forårsages af ubehandlede bakterier. Forsøgene viste også, at man intet vinder ved at øge temperaturen til 134° C. Tværtimod synes aktiviteten at blive større end uden varmebehandling. Autoklaving ødelægger altså ikke den pyrogene aktivitet af *S. aureus*.

Vi havde på ingen måde regnet med, at den pyrogene aktivitet kunne blive større efter autoklaving. For at få resultaterne bekræftet, valgte vi derfor at undersøge den feberfremkaldende aktivitet af autoklaverede *S. aureus* i kaniner,

og til sammenligning målte vi også den pyrogene effekt af ubehandlede *S. aureus* i kaniner. For ikke at påføre kaninerne en infektion blev bakterierne dræbt med ultraviolet lys inden forsøget.

De målte feberkurver viser, at både ubehandlede og autoklaverede *S. aureus* giver feber efter injektion, og at de autoklaverede *S. aureus* medfører den største temperaturstigning i kaninerne. Resultatet bekræfter, at autoklaverede *S. aureus* er mere potente end ubehandlede bakterier, samt at de pyrogene egenskaber er meget varmestabile og kan øges ved autoklaving.

På sporet af en forklaring

Hvordan kan dette uventede fænomen forklares? De stoffer, som kan fremkalde feber, er lipoteichoinsyre og peptidoglycan, som sidder i bakteriernes cellevæg. Måske beskadiges cellevæggen ved autoklavingen, så de pyrogene stoffer bedre kan reagere med fx monocytter og dermed udøve deres aktivitet.

Derfor har vi anskaffet prøver af de feberfremkaldende stoffer lipoteichoinsyre og peptidoglycan fra *S. aureus* for at undersøge, om de i sig selv har de samme egenskaber som hele bakterier. Vore foreløbige resultater peger på, at både lipoteichoinsyre og peptidoglycan er meget varmestabile, men at deres aktivitet kan nedsættes ved autoklaving. På baggrund af vore overraskende resultater bør det undersøges, om Gram-positive pyrogener er et reelt problem i sterile lægemidler.