

I LIPOPOLISACCARIDI BATTERICI COME COMPLICANZE NELLA TERAPIA ENDOVENOSA



Bononi I. *, Gaeta S. §, Martini F. *, Pancaldi C. *, Balatti V. *, Campioni C. * e Tognon M. *

*Cattedra di Biologia Applicata, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Ferrara, Ferrara, § G.V.S. S.p.A., Zola Predosa, Bologna

INTRODUZIONE

La terapia endovenosa (E.V.) nella pratica medica è molto diffusa ed offre numerosi vantaggi. Tuttavia, tale approccio terapeutico può fornire agli agenti infettivi una via diretta al circolo sanguigno. Per ovviare a questo inconveniente si utilizzano i filtri in linea convenzionali da 0,2 µm che trattengono tutti i microrganismi prevenendone l'infusione nel paziente. Tali filtri però non sono in grado di trattenere le endotossine batteriche o lipo-poli-saccaride (LPS, Figura 1), che sono una componente integrante della membrana esterna dei batteri Gram negativi (Gram -).

LPS è costituito da tre frazioni molecolari denominate Antigene-O, core oligosaccaridico e Lipide A. Tali componenti hanno caratteristiche biologiche, chimiche, genetiche e sierologiche diverse.

L'Antigene-O è un eteropolisaccaride formato dalla ripetizione di una serie di subunità tri-, tetra- e penta-saccaridiche che comprendono zuccheri diversi ed una varietà di zuccheri non comuni. L'Antigene-O costituisce la frazione antigenica del LPS, ed è altamente variabile ma specifico per ogni specie batterica.

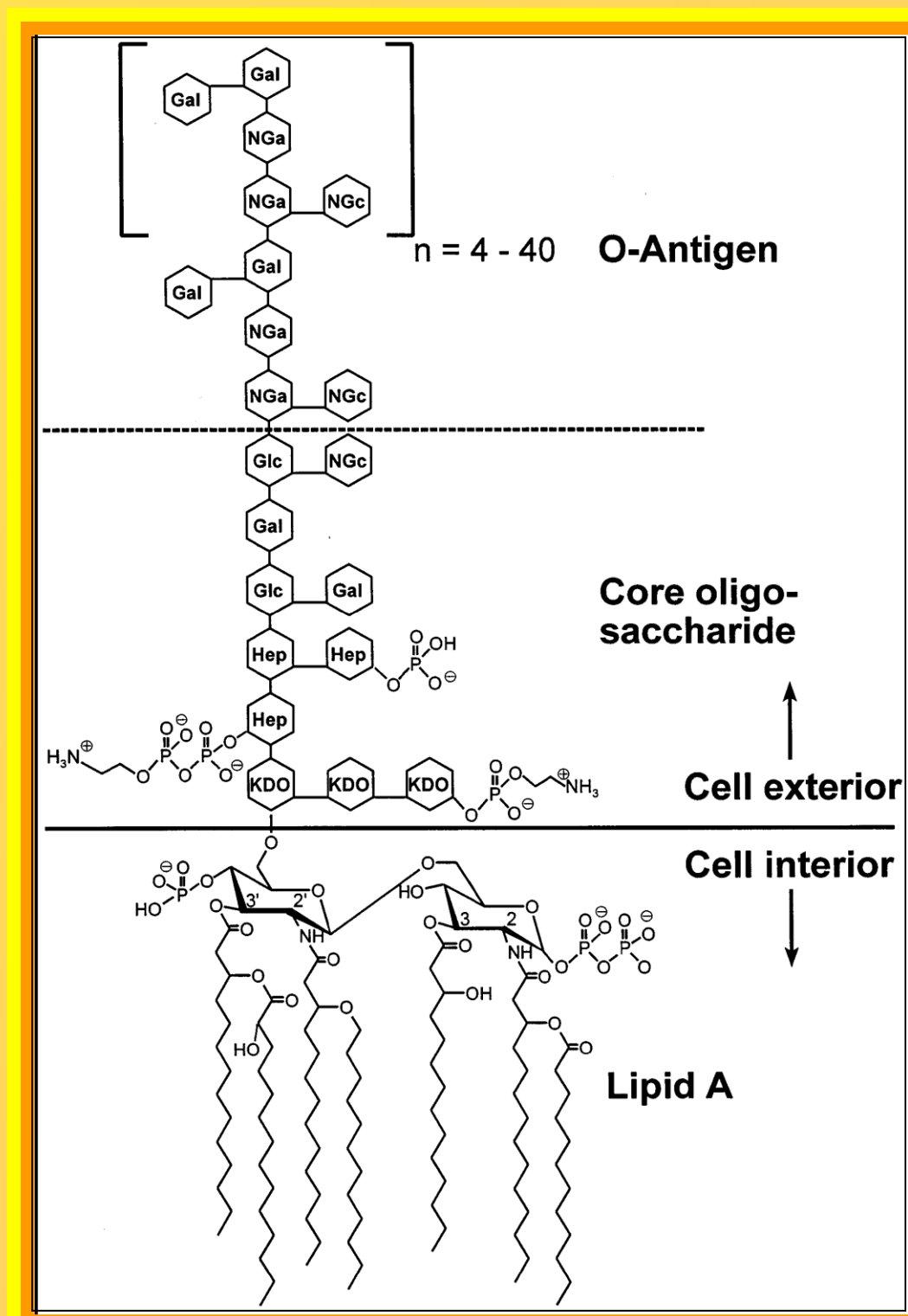
Il core oligosaccaridico è una struttura mediamente conservata con una regione interna ricca di acido chetodeossioctonico (KDO) ed eptosi, con una regione esterna ricca di esosì.

Il Lipide A è la parte più conservata del LPS. Esso è composto da un disaccaride di glucosammina in cui i due zuccheri sono uniti da un legame β-1,6; il disaccaride è fosforilato ed esterificato con diversi acidi grassi saturi. Il Lipide A è la porzione tossica del LPS e la sua attività biologica sembra dipendere dalla peculiare conformazione della molecola. Il Lipide A, che è la parte idrofobica dell'endotossina, adotta un arrangiamento esagonale ordinato che risulta in una struttura molto rigida a confronto con il resto del LPS. I gruppi fosfato del Lipide A determinano la carica negativa del LPS (1).

LPS può rappresentare una complicanza nella terapia E.V. poiché se infuso nel paziente può causare pirogenicità, tossicità e reazioni infiammatorie. L'attuale ricerca nel settore biotecnologico e farmaceutico è incentrata sugli approcci tecnologici tesi ad eliminare LPS con specifici filtri (2).

Figura 1:

Struttura molecolare del Lipopolisaccaride (LPS)



SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo dello studio è di analizzare diversi tipi di filtri in linea per dimostrare se il dispositivo di filtrazione in esame trattiene l'Endotossina Standard di Controllo (CSE) presente in una soluzione a concentrazione nota.

RISULTATI

Nelle nostre ricerche abbiamo utilizzato dei set da filtrazione costituiti da un tubo in silicone per pompa peristaltica collegato al filtro da saggiare, che a sua volta era collegato ad un secondo tubo in PVC. In questo modo sono stati assemblati quattro tipi di filtri:

- Filtro A: Filtro Speedflow, con membrana caricata positivamente, prodotto da GVS
- Filtro B: Filtro per adulti, con membrana caricata positivamente, prodotto dalla concorrenza
- Filtro C: Filtro per adulti, con membrana standard, prodotto dalla concorrenza
- Filtro D: Filtro Speedflow, con membrana standard, prodotto da GVS

Il razionale che ha portato a creare una membrana carica positivamente si basa sul fatto che essa dovrebbe trattenere le endotossine in quanto esse hanno una carica negativa grazie ai gruppi fosfato presenti nel Lipide A.

Esperimenti preliminari hanno dimostrato che la CSE non veniva adsorbita da nessuno dei contenitori utilizzati.

Tutti i test sono stati ritenuti validi poiché la soluzione non filtrata ha mostrato una concentrazione simile (1 EU/ml) dall'inizio alla fine di ciascun esperimento.

La misurazione dell'endotossina sulla soluzione filtrata dei filtri A e B indica che la quantità di endotossine batteriche che passa attraverso i filtri durante tutto il tempo dell'esperimento di infusione (96 ore) è minore di 0,03 EU/ml.

Al contrario la soluzione filtrata dai filtri C e D mostra una quantità di endotossina simile a quella della soluzione non filtrata (1 EU/ml). Questi risultati evidenziano che le endotossine passano attraverso questi ultimi due filtri durante tutto il tempo dell'esperimento (Tabella 1).

CONCLUSIONI

I nostri dati indicano che i filtri A e B, equipaggiati con una membrana caricata positivamente, trattengono le endotossine batteriche, mentre i filtri C e D, equipaggiati con membrana standard (non carica), permettono il passaggio delle endotossine batteriche nella soluzione filtrata.

RINGRAZIAMENTI

Il presente studio è stato in parte finanziato dal Consorzio Spinner e dalla Regione Emilia Romagna con l'impiego della Sovvenzione Globale nell'ambito del Fondo Sociale Europeo per il trasferimento tecnologico di un protocollo di analisi della presenza e della concentrazione di endotossine batteriche

Figura 2A



Figura 2: Impianto per l'analisi dei filtri: Con l'utilizzo di una pompa peristaltica è stata fatta passare in ciascun set, e quindi attraverso ciascun filtro, una soluzione di CSE alla concentrazione di 1 EU/ml utilizzando l'impianto mostrato nella foto in figura 2A e schematizzato nella figura 2B. Sono stati raccolti campioni di soluzione non filtrata (SNF) e di soluzione filtrata (SF) dopo 0, 8, 24, 48, 72 e 96 ore di filtrazione.

Tutti i campioni sono stati testati per la presenza di endotossine batteriche tramite il LAL test. Per determinare la presenza e la concentrazione delle endotossine batteriche abbiamo utilizzato il LAL test con il metodo di gelificazione.

Figura 2B

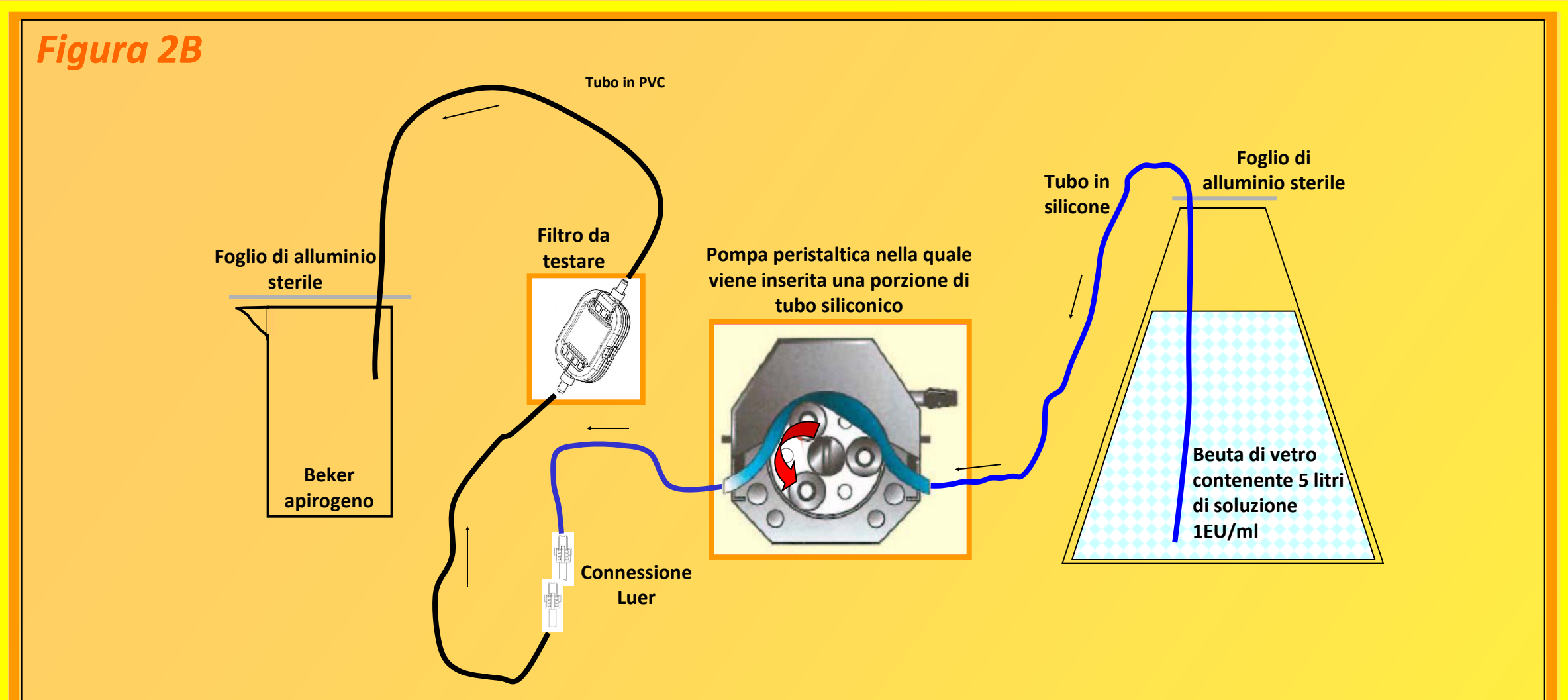


Tabella 1: Risultati ottenuti dall'analisi dei filtri (i dati sono espressi in EU/ml)

Soluzione	Filtro ore	A	B	C	D
		Soluzione non filtrata			
	0	1	1	1	1
	8	1	1	1	1
	24	1	1	1	0,5
	48	2	1	1	1
	72	1	1	1	1
	96	1	1	1	0,5
Soluzione filtrata					
	0	<0,03	<0,03	0,125	<0,03
	8	<0,03	<0,03	0,25	0,5
	24	<0,03	<0,03	1	1
	48	<0,03	<0,03	1	2
	72	0,03	<0,03	2	0,5
	96	<0,03	<0,03	1	0,5

BIBLIOGRAFIA

1. Medical Microbiology. 4th ed. Baron, Samuel, editor. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch; c1996
2. Petsch D., Anspach FB. Endotoxin removal from protein solutions. J Biotechnol. 2000 Jan 21;76(2-3):97-119. Review.