

# **Значение современной иммунодиагностической тест-системы ЕАА (анализ активности эндотоксина) в оценке комплексной интенсивной терапии инфекционно-септических осложнений у кардиохирургических больных.**

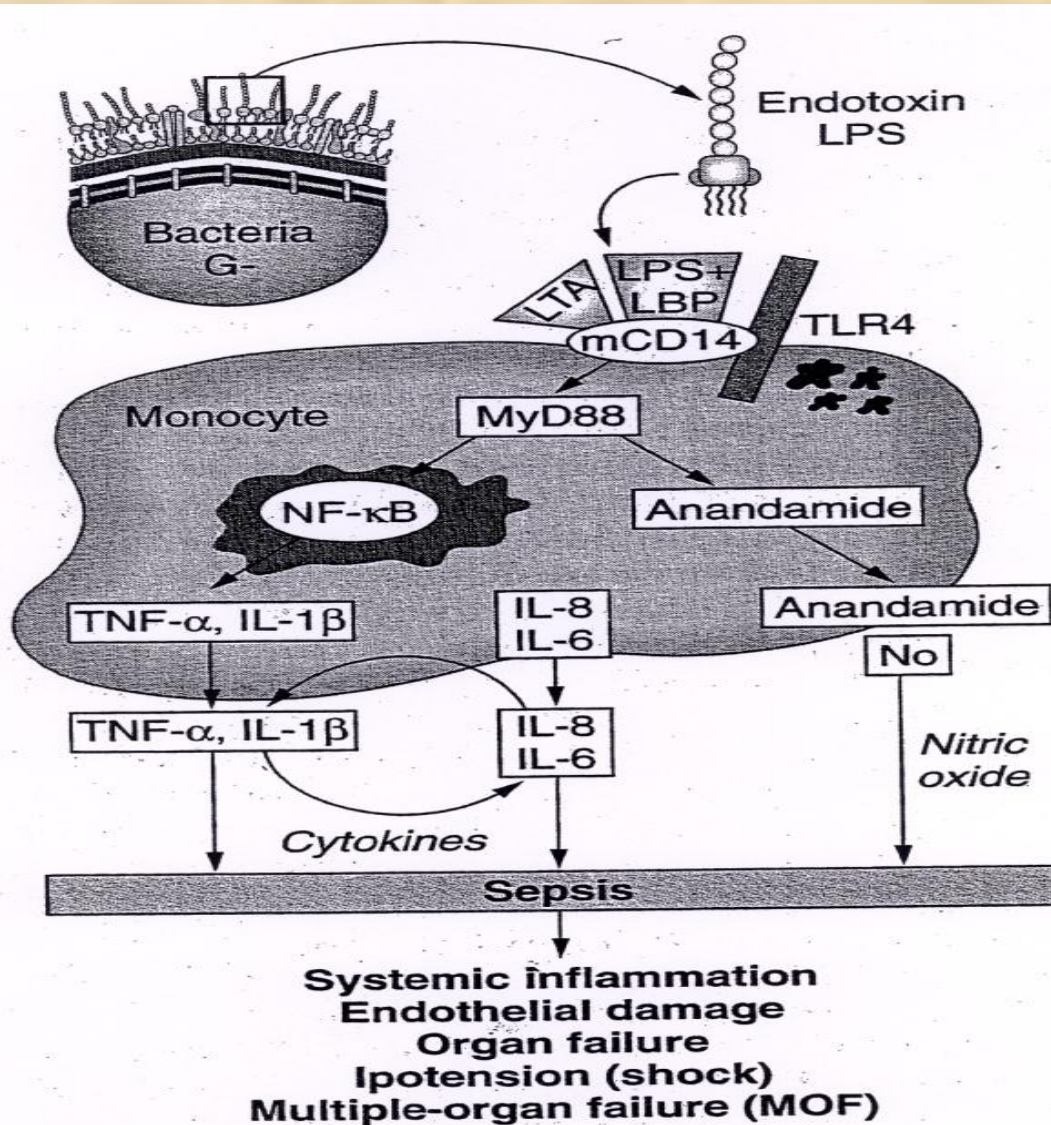
**М.Г. Плющ, М.Б. Ярустовский, М.В. Абрамян, О.О. Подщеколдина,  
З.В. Попок, Б.С. Мамазакирова, Д.А. Попов**

***Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН***



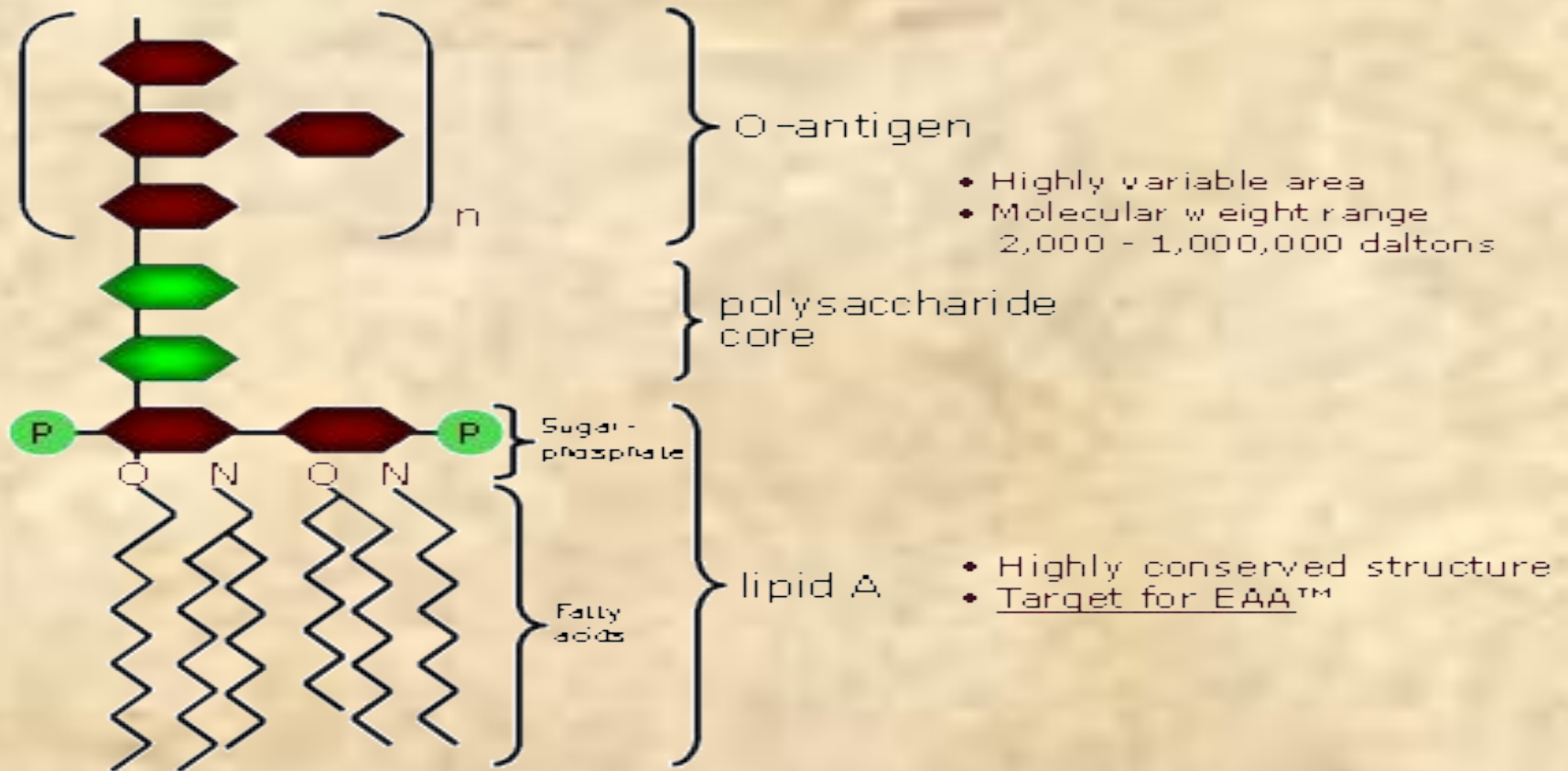
# РОЛЬ ЭНДОТОКСИНА В ПАТОГЕНЕЗЕ СЕПСИСА

G.Guadagni et al. Critical Care Neph. Ch.284: 1557-560



**Эндотоксин описан в 1892 Ричардом Пфайфером.  
Липидная часть А эндотоксина всех видов грамотрицательных бактерий  
является мишенью при анализе активности эндотоксина.**

### LIPOPOLYSACCHARIDE

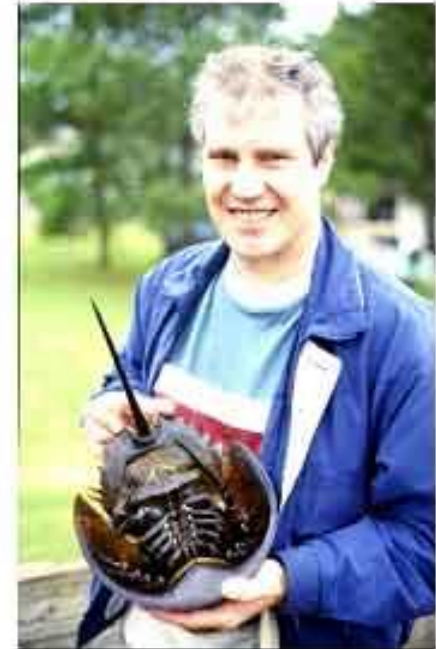




## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭНДОТОКСЕМИИ

Методы количественного определения уровней эндотоксина известны более 40 лет [Douglas G.W., 1963], и основаны на LAL-тесте.

- Впервые тест был включен в Фармакопею США в 1985 г.  
В России зарегистрирован с 2001 года.



# Модификации методов LAL-теста

**Метод А. Качественный гель-тромб тест.**

**Метод В. Количественный гель-тромб тест.**

- Точность определения содержания эндотоксина этим методом не очень высокая. Поэтому в Европейской фармакопее метод называется полуколичественным анализом. Несмотря на это, количественный гель-тромб тест достаточно широко используется в научно-исследовательских работах.

**Метод С. Кинетический турбидиметрический тест.**

**Метод D. Кинетический хромогенный тест.**

**Метод Е. Хромогенный тест по конечной точке.**

**Метод F. Турбидиметрический тест по конечной точке.**

*«Бактериальные эндотоксины», Европейская фармакопея*

# LAL Test



*Il mesolimulus walchi (150 milioni di anni fa)*

- Определения уровня эндотоксина в плазме крови проводили при помощи гель-тромб теста
- (вариант методики в Техническом Бюллетене BioWhittaker (Cambrex) №12)

- Принцип метода:  
эндотоксин

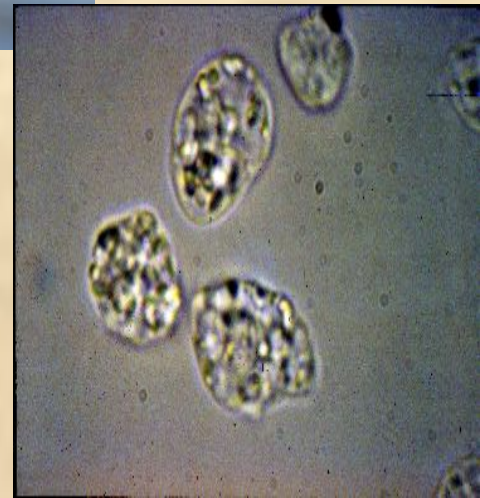
- Профермент → Коагулаза

- фермент

- Коалулоген → Коагулин



- В основе лежит реакция взаимодействия эндотоксина и лизата амёбоцитов *Limulus*, полученного из амёбоцитов мечехвоста рода *Limulus*. В ходе реакции эндотоксин вызывает помутнение лизата и образование геля. Концентрация эндотоксина измеряется в единицах эндотоксина на 1 мл (ЕДэ/мл)





# ЕАА – определение уровня активности эндотоксина

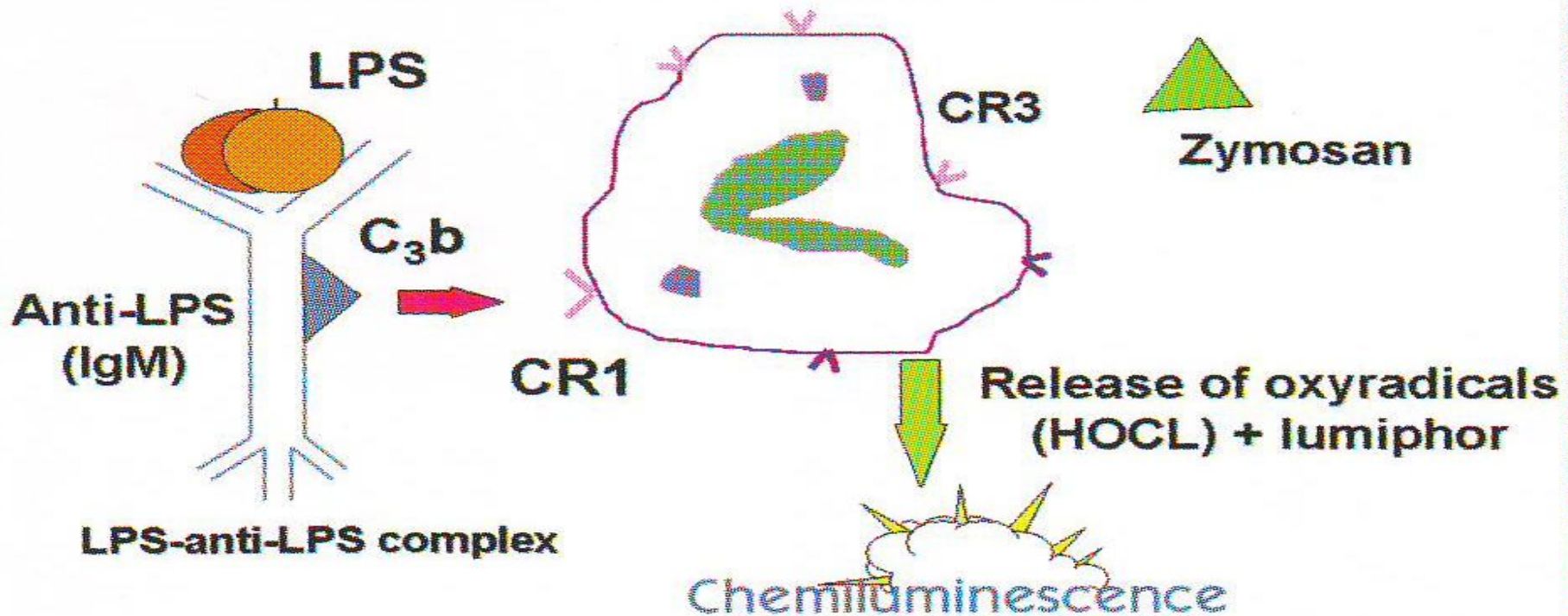
- ЕАА - представляет собой экспресс-анализ цельной крови, позволяющий диагностировать наличие LPS в крови при грамотрицательной бактериальной инфекции, а также прогнозировать риск возникновения тяжелого сепсиса.
- ЕАА является единственным количественным лабораторным тестом утвержденным Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA).
- В России тест-система зарегистрирована 18 августа 2009 года (№ФСЗ 2009/04982).



# ПРИНЦИП МЕТОДА ЛЮМИНОЛЬНОЙ

## ХЕМОЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

### The Chemiluminescent Assay



*Romaschin, J. Immunol. Methods 212:169, 1998*

- Принцип метода: Присутствующий в крови эндотоксин распознается и связывается антиэндотоксиновыми антителами (иммуноглобулины М), после чего доставляется к нейтрофилам через комплементные рецепторы. В присутствии зимозана нейтрофилы подвергаются респираторному взрыву, который сопровождается излучением света. Количество испускаемого света, определяемого на хемолюминометре пропорционально количеству эндотоксина.



# Определение активности эндотоксина (ЕАА™) методом хемолюминисценции



10 мин.



**Инкубация**  
образца цельной крови 1мл.

10 мин.

15 мин.

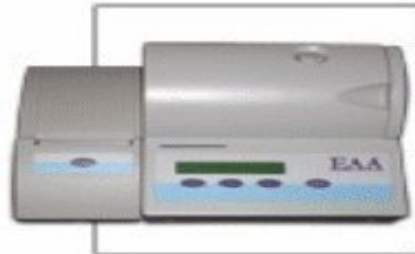


**Добавление реактива**  
3 пробирки  
40 мкл. крови

1мл. реагента

25 мин.

1 мин. на  
образец



Пробирки 1, 2, 3  
Люминисцентное считывание

**Автоматический расчёт ААЭ**

Анализ до 3-х образцов и  
1 контроль качества за раз.

около 30 мин.

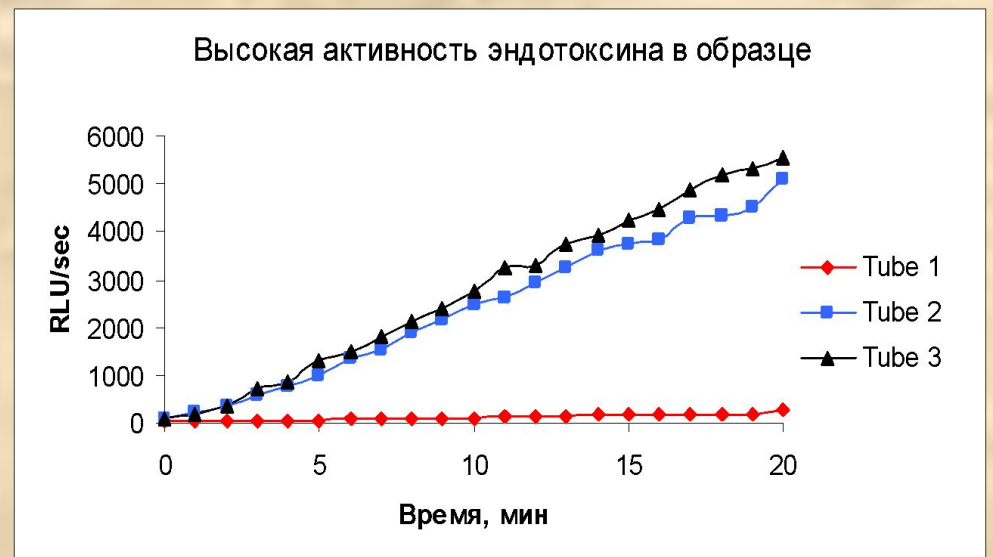
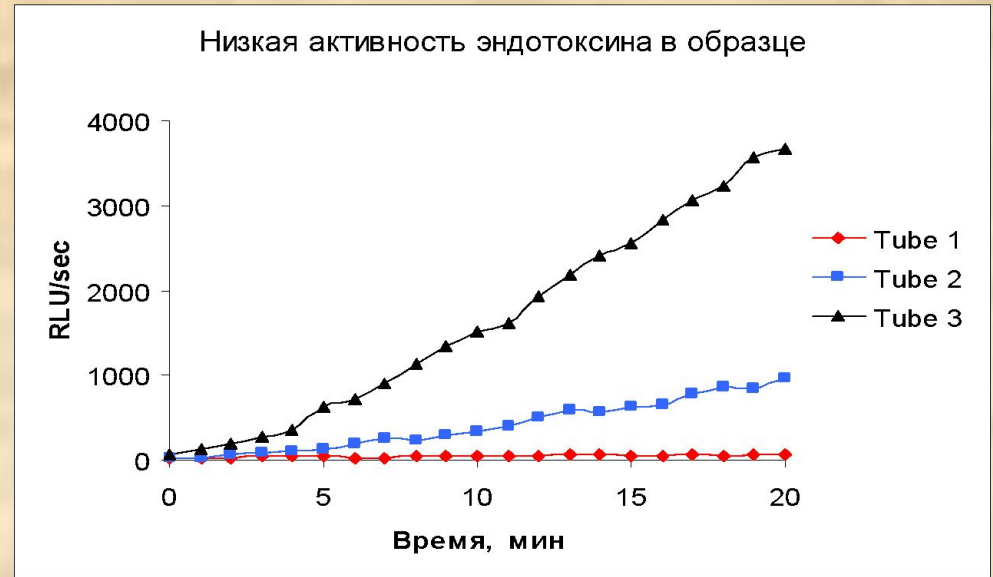
**Необходимые принадлежности:** пипеточный дозатор, 0.5 мл. пипетка, таймер, 1.0 мл. стерильные наконечники для пипетки, 0.5 мл. стерильные наконечники для пипетки, 12.5 мл. наконечники для пипетки.

# Интерпретация результатов

**ЕАА < 0,40** – характеризует низкую концентрацию эндотоксина в крови и невысокий риск развития инфекционно-септических осложнений.

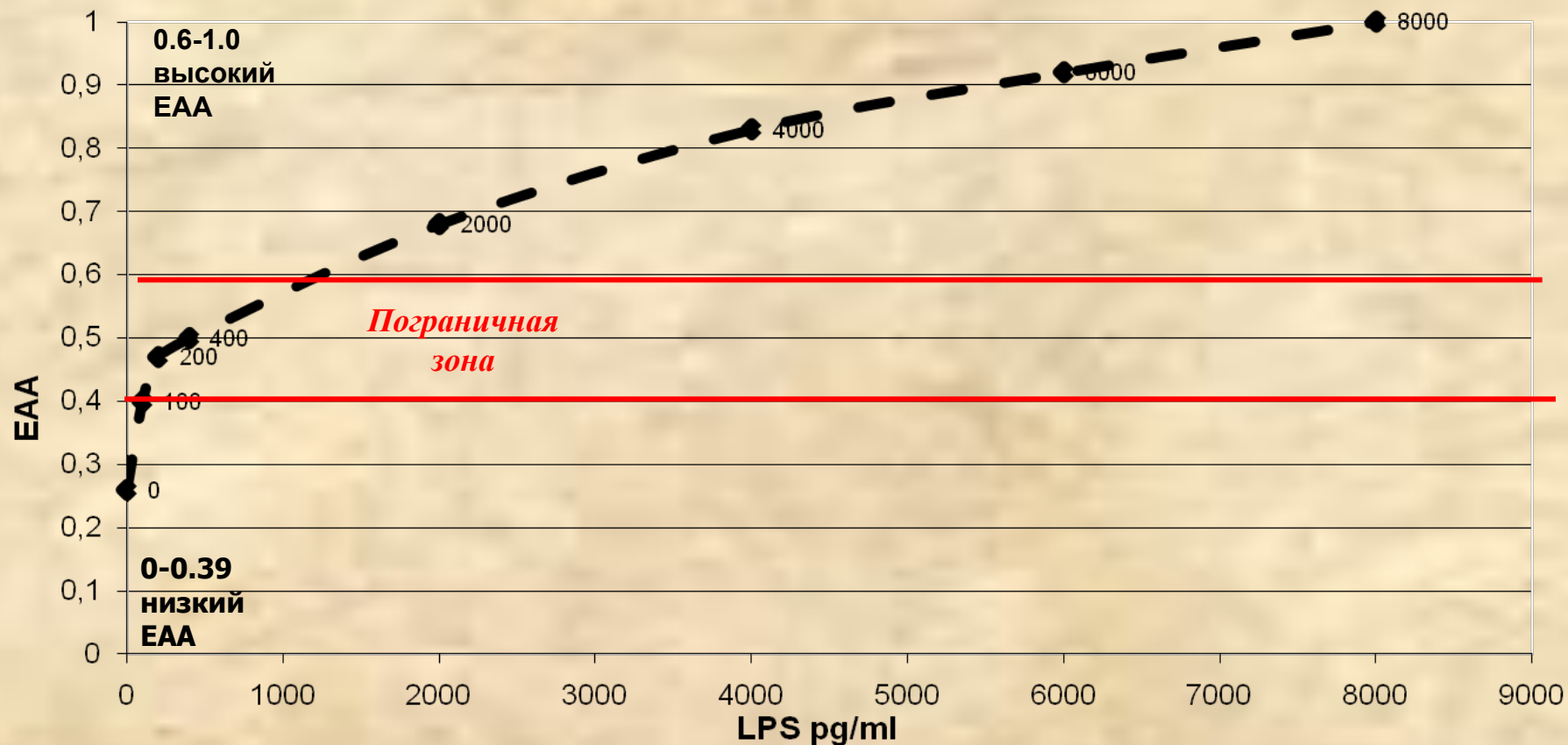
**ЕАА 0,40-0,59** – характеризует средний уровень концентрации эндотоксина в крови и представляет повышенный риск развития тяжелого сепсиса

**ЕАА > 0,60** – характеризует высокий уровень концентрации эндотоксина в крови и представляет высокий риск развития тяжелого сепсиса



# Зависимость уровня активности эндотоксина (ЕАА) от концентрации LPS

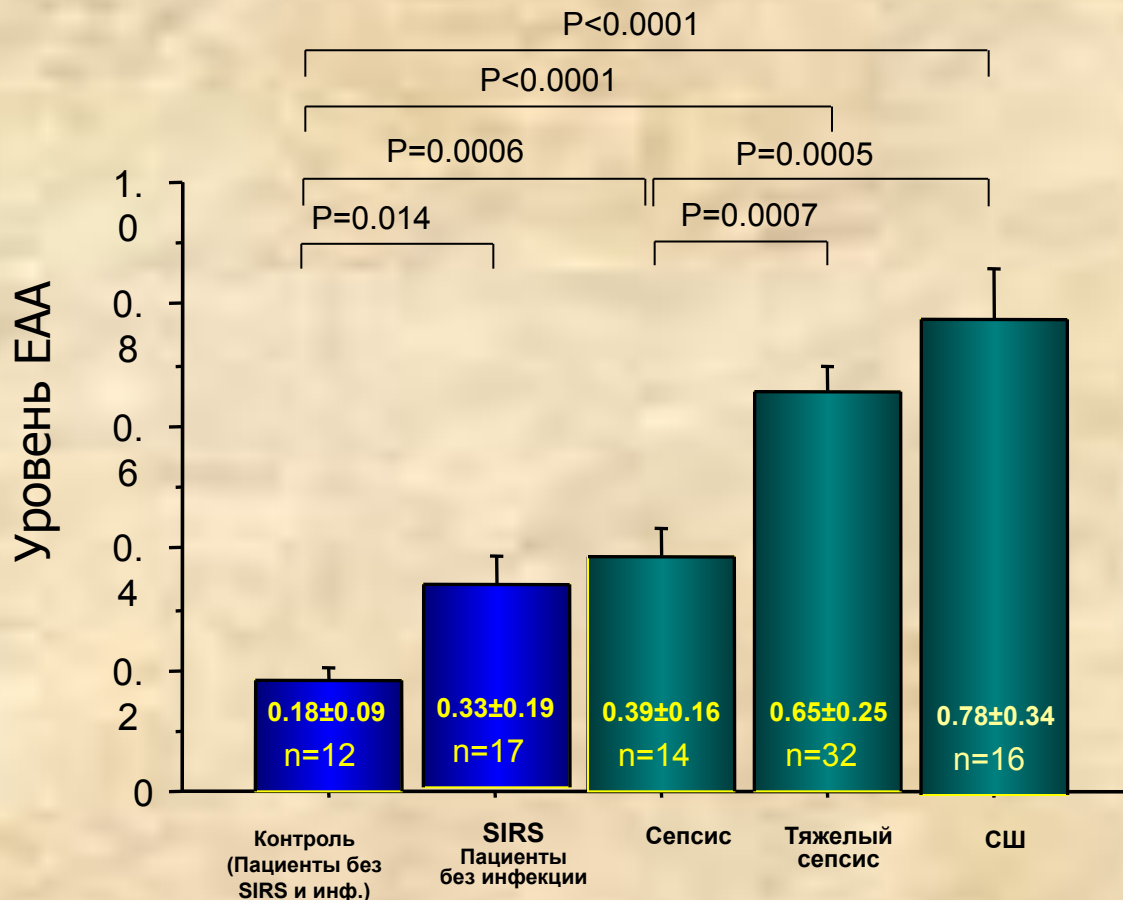
*John Marshall et al., Journal Infect. Dis., 2004, 190, 527*





# Зависимость между уровнем активности эндотоксина и тяжестью состояния пациентов

(Ya.Kakihara, анализ одноцентрового исследования, 2007)



Данные представлены на XII Ежегодном конгрессе «Endotoxemia in Critical Care», Фукуока, Япония, 29.02. 2008

# Уровень активности эндотоксина- как предиктор летальности

*Klein D, Monti G, Bottiroli S et al. Crit Care Med dec. 2009*





## Характеристика больных

- Обследованы 48 взрослых пациентов с инфекционно-септическими осложнениями после операций на сердце. Средний возраст 55,5 (51-61,5) лет.
- 36 больным выполнена хирургическая коррекция клапанной патологии
- 7 больным произведено шунтирование коронарных артерий
- 3 пациентам выполнено хирургическое лечение гипертрофической кардиомиопатии
- 2 больным проведена ортотопическая трансплантация сердца





# Лабораторные исследования

- **Определение активности эндотоксина (ЕАА)** (Spectral Diagnostics Inc, Canada)
- **LAL-тест** (BioWhittaker, Cambrex, USA)
- **Прокальцитонин** (PCT B.R.A.H.M.S., Germany)
- **Бактериологическое исследование**
- **Количество лейкоцитов**
- **Количество тромбоцитов**



**48 пациентов**

**1 группа  
n=3  
ЕАА < 0,4  
6%**

**2 группа  
n=11  
ЕАА 0,4-0,6  
23%**

**3 группа  
n=34  
ЕАА > 0,6  
71%**



## Дизайн исследования

- ✓ Одноцентровое, проспективное исследование
- ✓ 34 пациентам, которые имели повышенные уровни ЕАА ( $\geq 0,6$ ) и были в стабильном клиническом состоянии в комплекс интенсивной терапии включена LPS-сорбция, проводимая с использованием селективных сорбентов - применялись сорбционные колонки Toraymixin – PMX-F (Toray, Japan).
- ✓ Проводились 2 стандартные процедуры LPS-сорбции для каждого пациента.
- ✓ Мониторинг лабораторных тестов: до первой процедуры, в течение 24 часов после нее и через 24 часа после второй процедуры





Диаграмма строения Тореймиксина РМХ-В

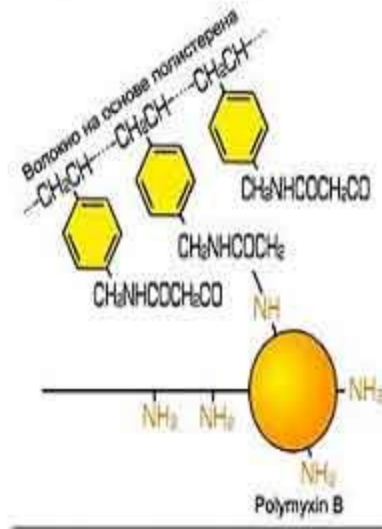


Рис.1

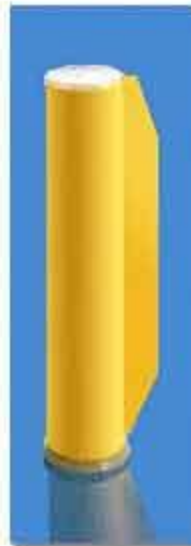


Рис.4



Рис.5



Рис.6

**Колонка Toraymixin** представляет собой **волоконный сорбент**, на который **иммобилизован полимиксин В**, способный **нейтрализовать биологическую активность эндотоксина** путем **связывания липида А**, являющегося **активным центром эндотоксина**. **Элиминация эндотоксина из крови позволяет предотвратить каскад воспалительной реакции при сепсисе.**



48 пациентов

1 группа  
n=3  
ЕАА < 0,4  
6%

2 группа  
n=11  
ЕАА 0,4-0,6  
23%

3 группа  
n=34  
ЕАА > 0,6  
71%

Без LPS –  
сорбции  
100%  
n=3  
ЕАА-0,31  
LAL-0,24

Без LPS –  
сорбции  
45,5%  
n=5  
ЕАА-0,45  
LAL-0,36

LPS-сорбция-  
54,5%  
n=6  
ЕАА-0,6  
LAL-0,72

Без LPS –  
сорбции  
17,6%  
n=6  
ЕАА-0,79  
LAL-0,72

LPS-сорбция-  
82,4%  
n=28  
ЕАА-0,76  
LAL-1,44

Выживаемость  
100%

Выживаемость  
80%

Выживаемость  
50%

Выживаемость  
33%

Выживаемость  
57%

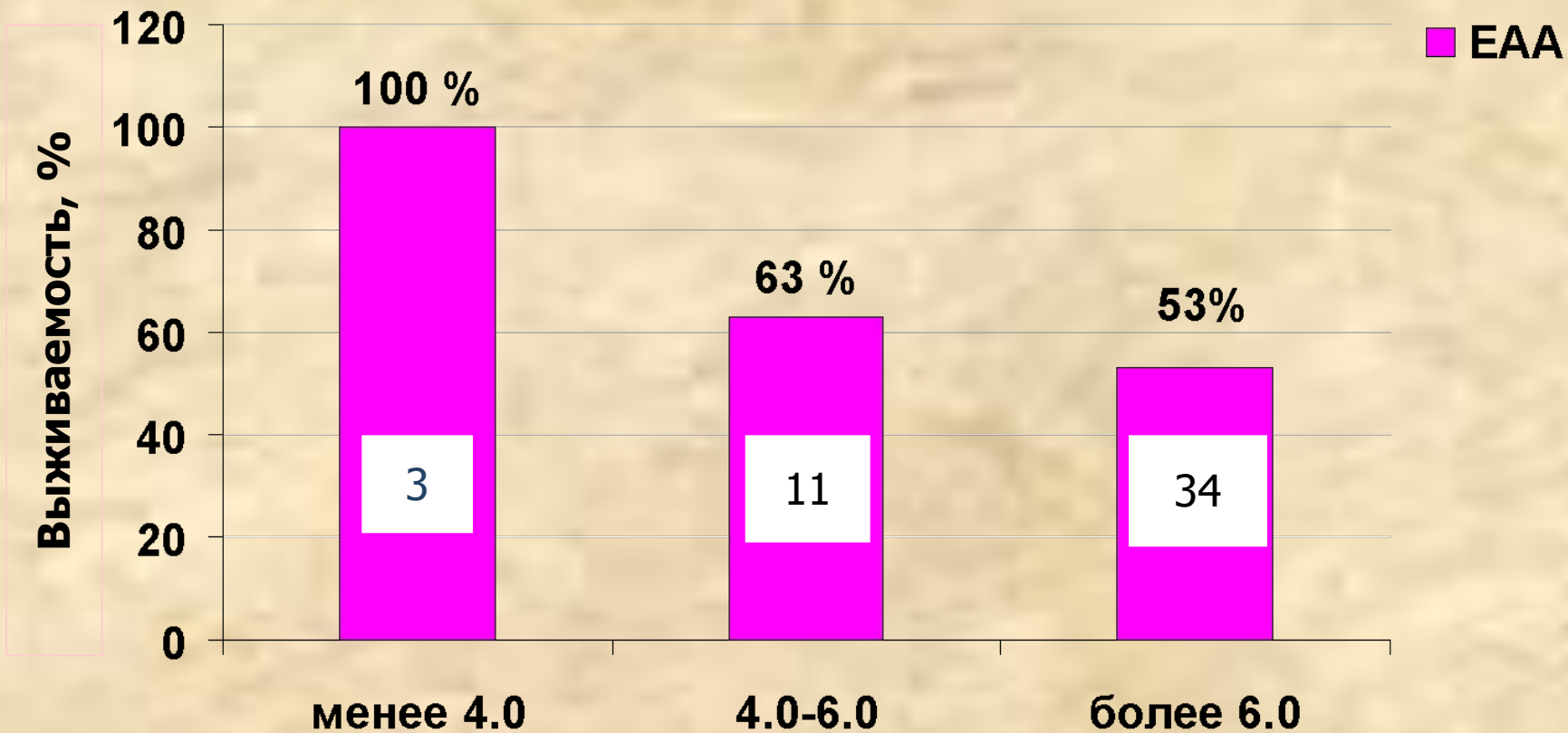


## Динамика клинических и лабораторных показателей до и после LPS-сорбции (n=34)

Показатель	До LPS-сорбции	После 2 процедуры LPS-сорбции	p
<u>EAA</u>	<u>0.73 (0.63-0.83)</u>	<u>0.58 (0.48-0.7)</u>	<u>&lt;0.001</u>
LAL- тест, едЭ/мл	0.72 (0.72-1.44)	0.72 (0.36-1.44)	0.3
PCT, нг/мл	6,65 (1.44-15.68)	1.3 (0.66-10.22)	0.01
L, 10 <sup>9</sup> /л	12.7 (9.1-19.5)	10.8 (7.4-14.3)	0.07
PLT, 10 <sup>9</sup> /л	88.5 (54-122)	77(50-115)	0.6
SOFA	12.5 (10-15)	11 (10-14)	0.14



# Зависимость между уровнем ЕАА и 28-дневной выживаемостью





# ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- ЕАА является ранним предиктором развития тяжелых инфекционно-септических осложнений.
- ЕАА быстрый (30 мин), информативный, надежный экспресс-тест количественного анализа.
- ЕАА позволяет на ранних сроках определить показания к проведению патогенетической интенсивной терапии.
- ЕАА способствует оценке эффективности терапии.
- ЕАА –прогностически значимый маркер при комплексной интенсивной терапии инфекционно-септических осложнений после кардиохирургических вмешательств.