

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

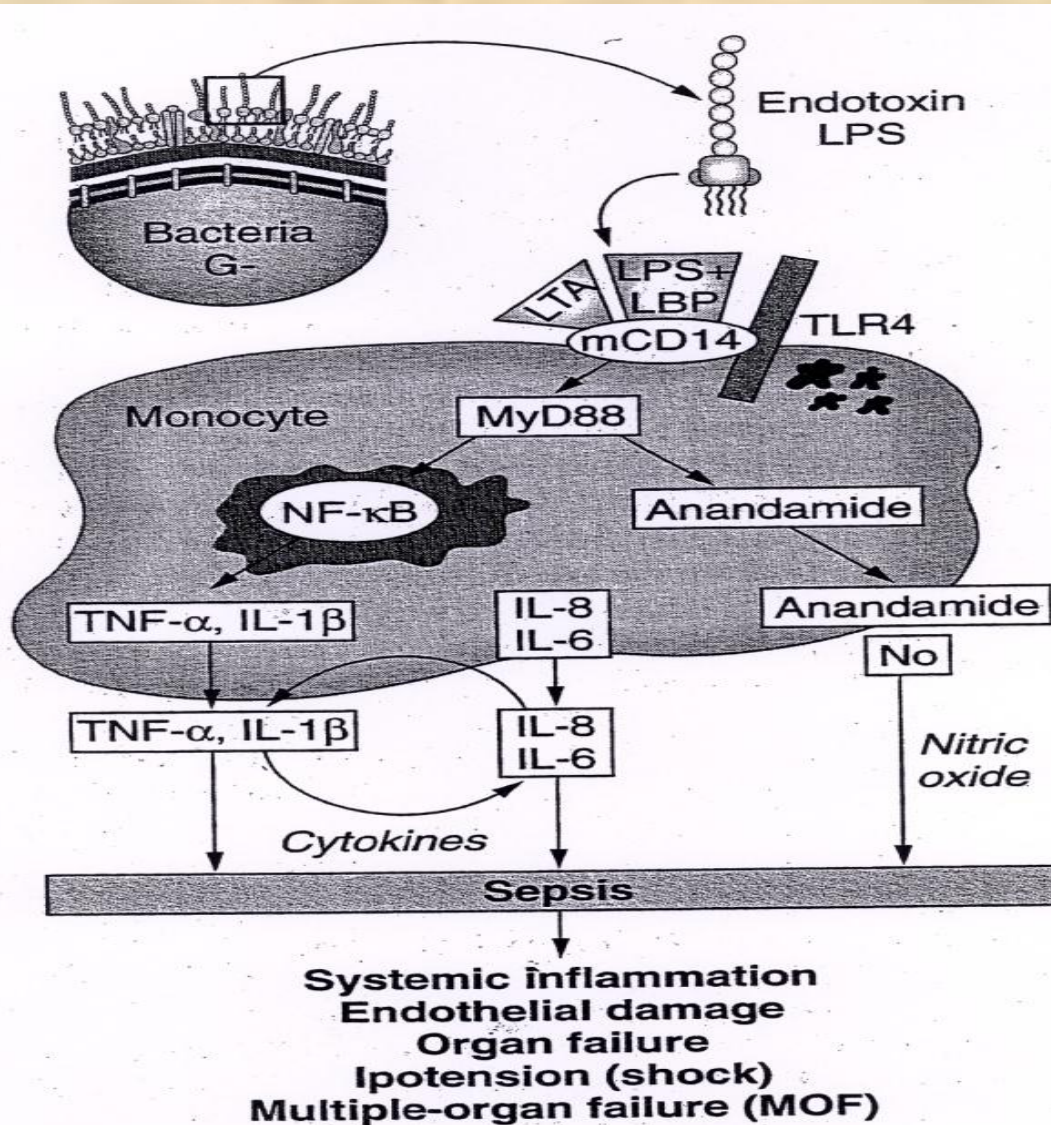
М.Г. Плющ, М.Б. Ярустовский, М.В. Абрамян, О.О. Подщеколдина,
З.В. Попок, Б.С. Мамазакирова, Д.А. Попов

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



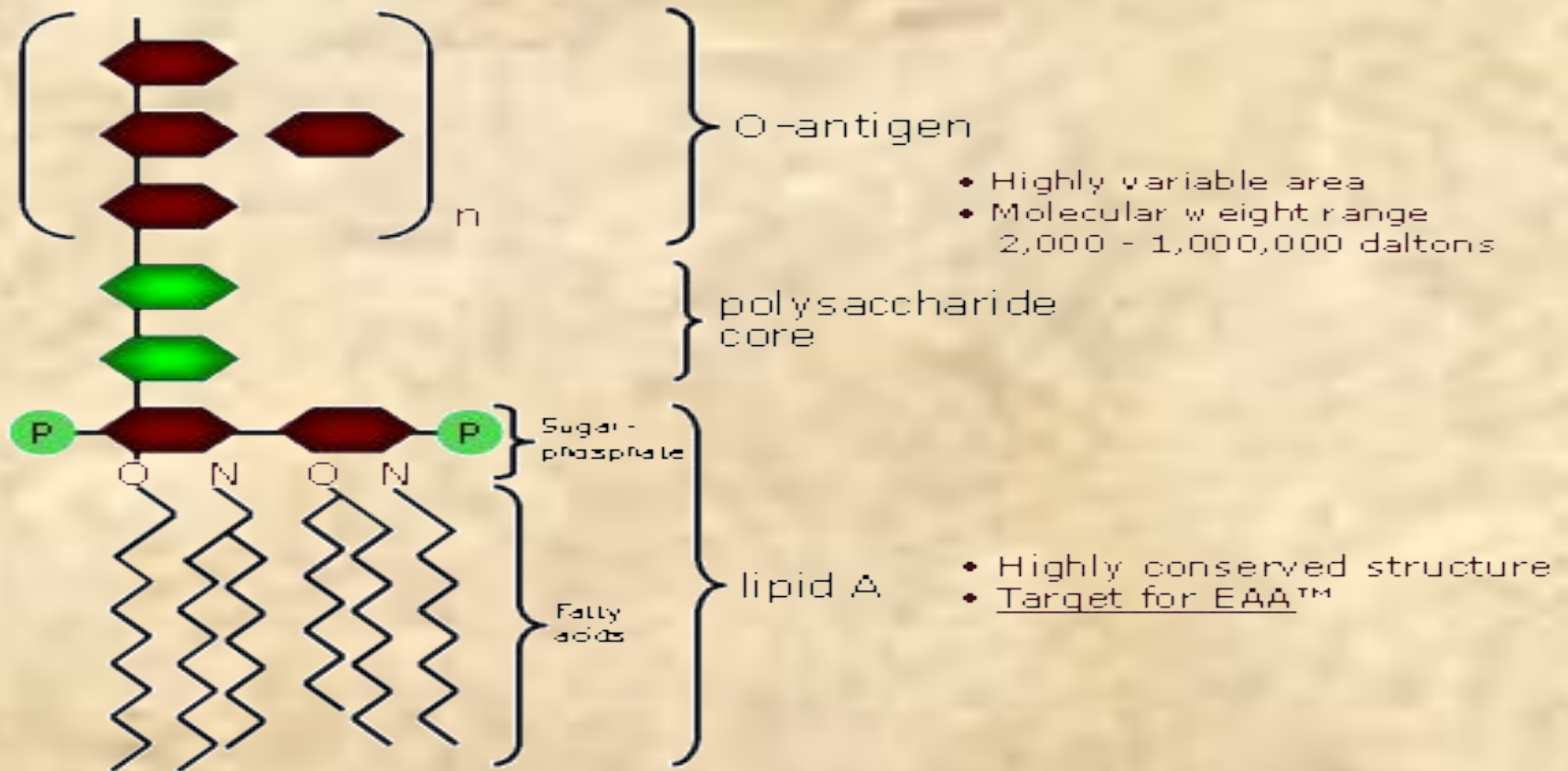
РОЛЬ ЭНДОТОКСИНА В ПАТОГЕНЕЗЕ СЕПСИСА

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)

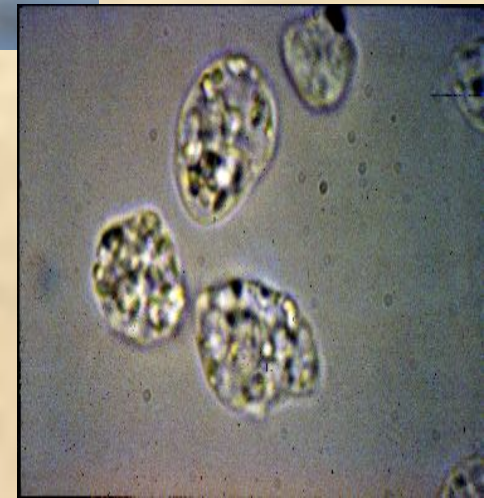
- Принцип метода:
эндотоксин

■ 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

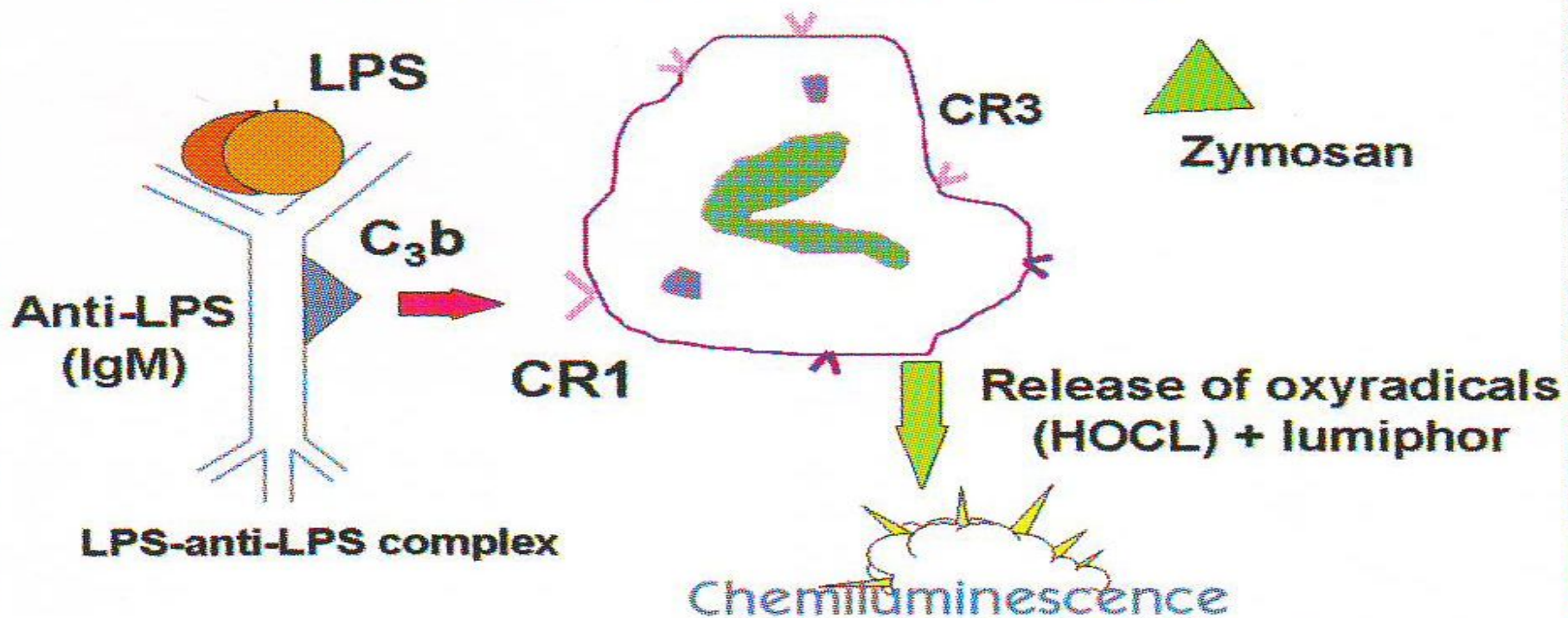
- ЕАА - представляет собой экспресс-анализ цельной крови, позволяющий диагностировать наличие LPS в крови при грамотрицательной бактериальной инфекции, а также прогнозировать риск возникновения тяжелого сепсиса.
- ЕАА является единственным количественным лабораторным тестом утвержденным Управлением по 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



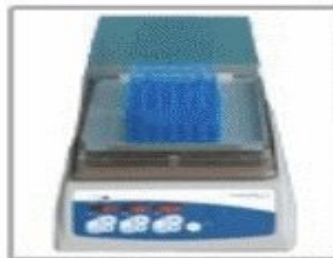
Romaschin, J. Immunol. Methods 212:169, 1998

- 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.

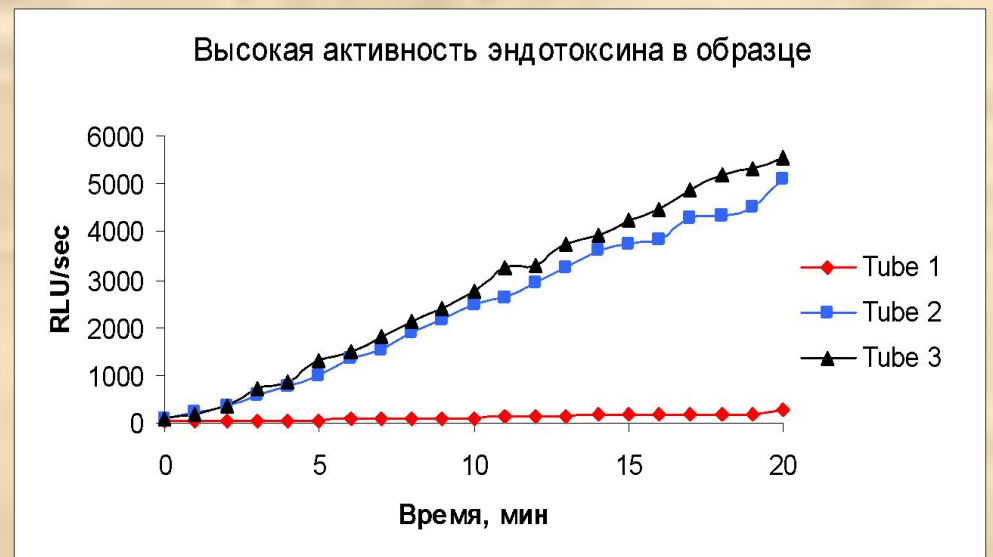
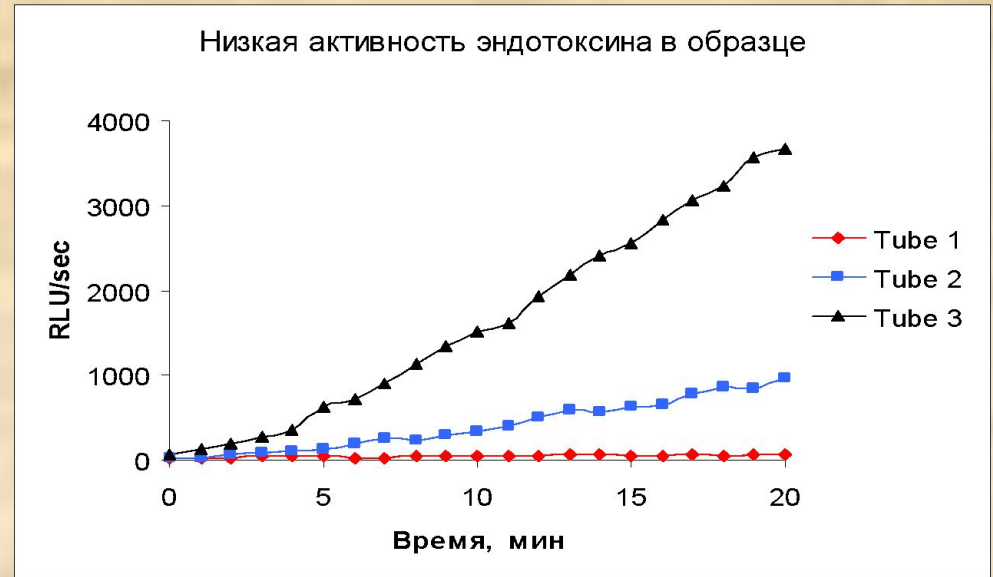
Необходимые принадлежности: пипеточный дозатор, 0.5 мл. пипетка, таймер, 1.0 мл. стерильные наконечники для пипетки, 0.5 мл. стерильные наконечники для пипетки, 12.5 мл. наконечники для пипетки.

Интерпретация результатов

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

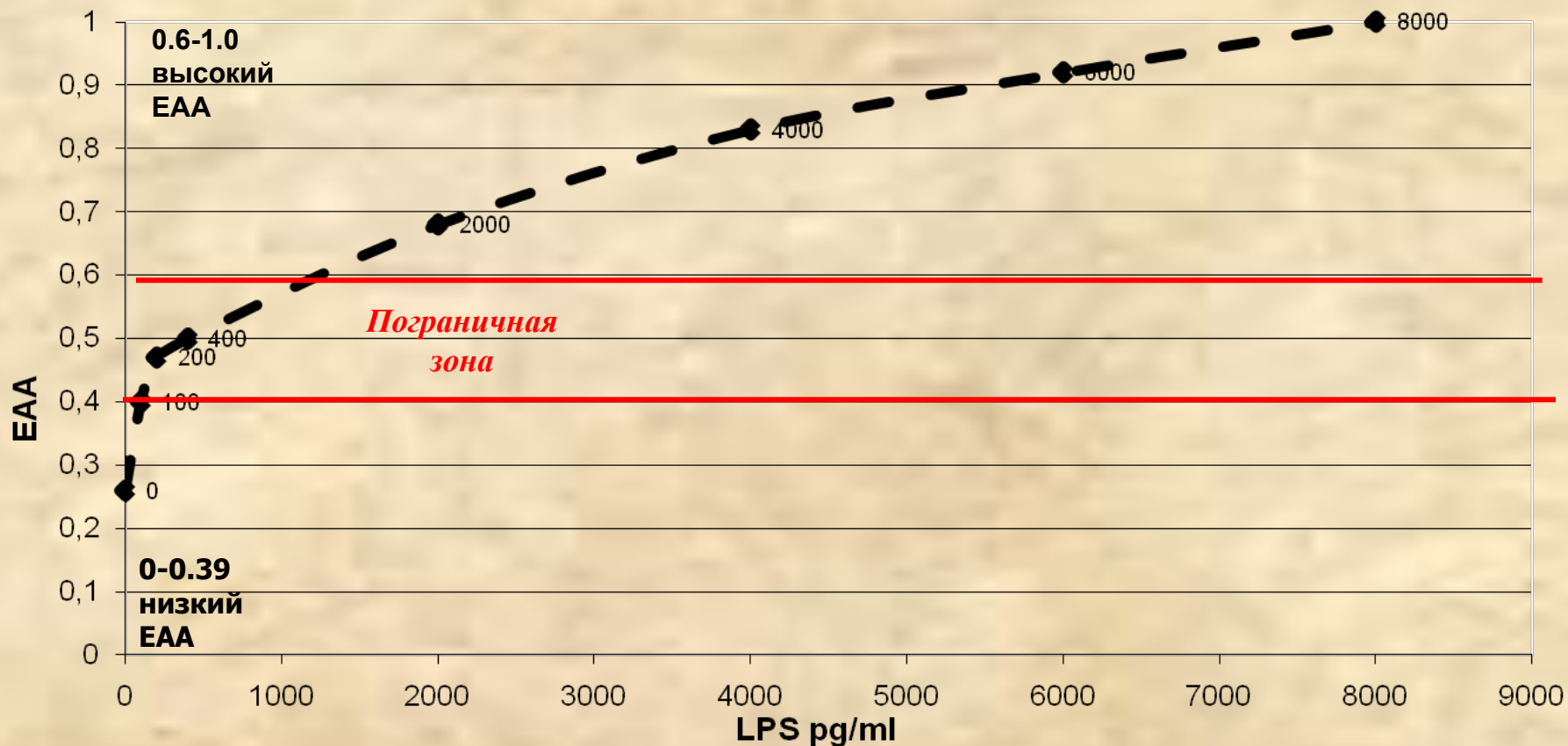
ЕАА 0,40-0,59 – характеризует средний уровень концентрации эндотоксина в крови и представляет повышенный риск развития тяжелого сепсиса

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



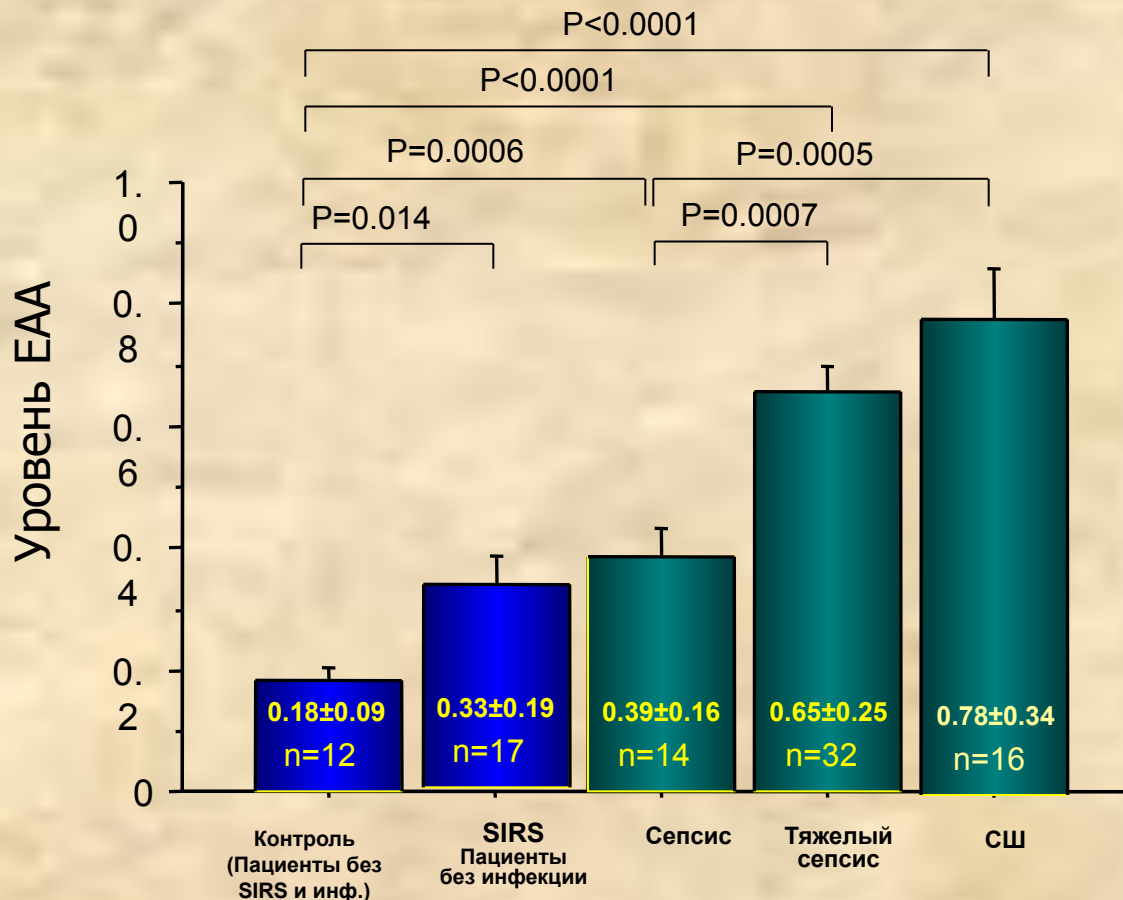
Зависимость уровня активности эндотоксина (ЕАА) от концентрации LPS

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-Р

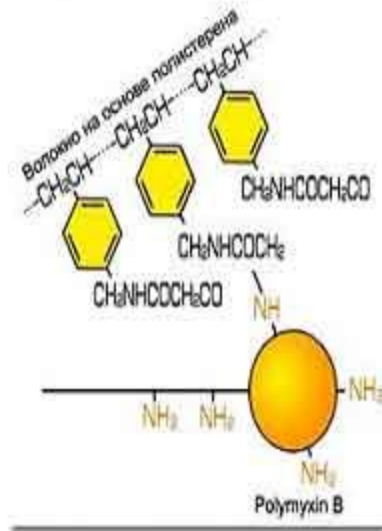


Рис.1

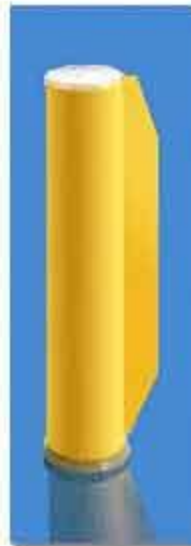


Рис.4



Рис.5



Рис.6

Колонка Toraymyxin представляет собой волокнистый 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
EAA < 0,4
6%

2 группа
n=11
EAA 0,4-0,6
23%

3 группа
n=34
EAA > 0,6
71%

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

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

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

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

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

Выживаемость
100%

Выживаемость
80%

Выживаемость
50%

Выживаемость
33%

Выживаемость
57%



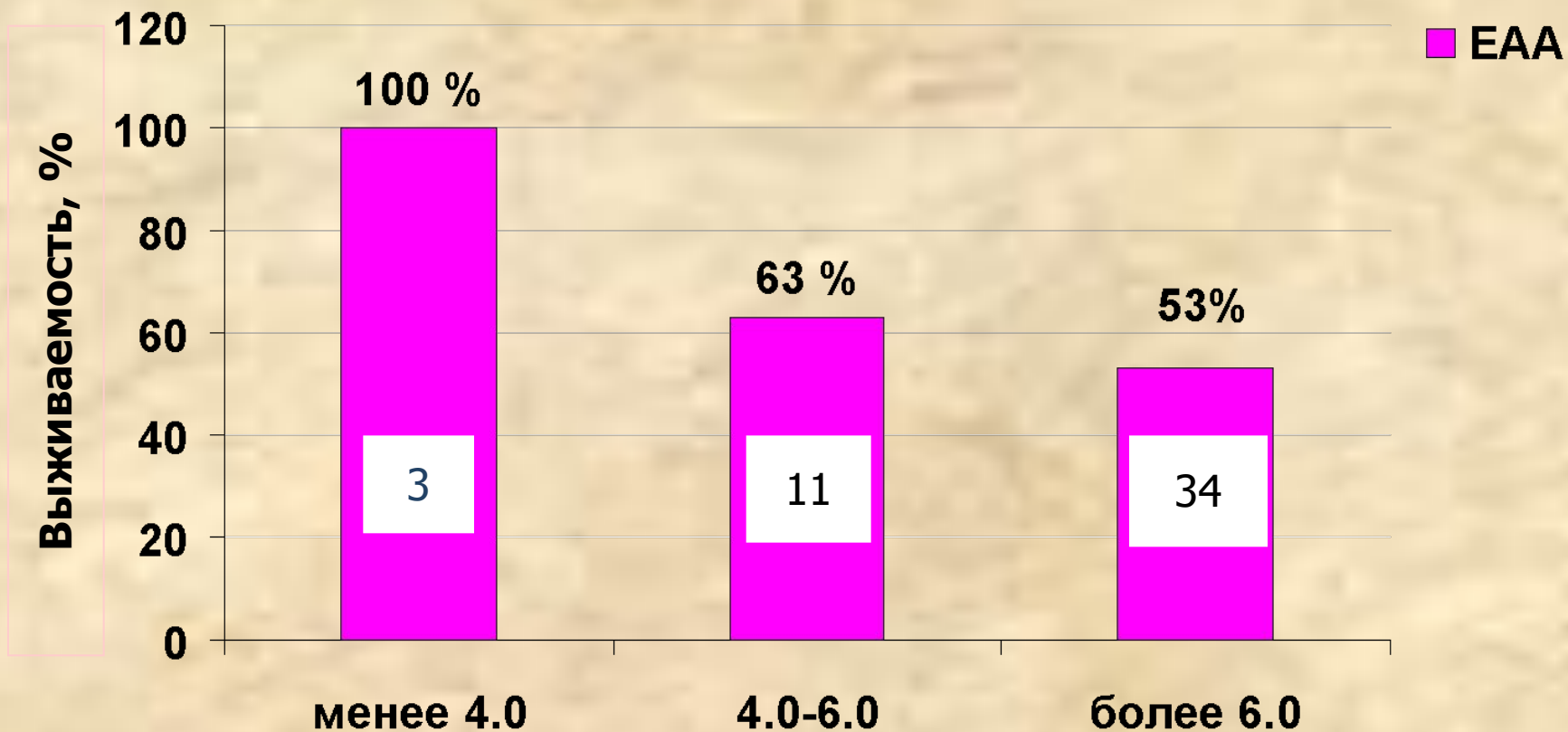
Динамика клинических и лабораторных показателей до и после LPS-сорбции

(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><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 ⁹ /л | 12.7 (9.1-19.5) | 10.8 (7.4-14.3) | 0.07 |
| PLT, 10 ⁹ /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.