



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2017101703, 19.01.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.01.2017Дата регистрации:
24.10.2017

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 19.01.2017

(45) Опубликовано: 24.10.2017 Бюл. № 30

Адрес для переписки:

119049, Москва, Ленинский пр-кт, 8, ФГБУ
"НМИЦССХ им. А.Н. Бакулева" Минздрава
России, отдел интеллектуальной собственности,
Юшкевич Т.И.

(72) Автор(ы):

Рогальская Екатерина Анатольевна (RU),
Климович Людмила Григорьевна (RU),
Плющ Марина Георгиевна (RU),
Самсонова Наталья Николаевна (RU),
Ярустовский Михаил Борисович (RU),
Абрамян Марина Владимировна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение "Национальный медицинский
исследовательский центр
сердечно-сосудистой хирургии имени А.Н.
Бакулева" Министерства здравоохранения
Российской Федерации (ФГБУ "НМИЦССХ
им. А.Н. Бакулева" Минздрава России) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: М.Б.Ярустовский и др. Опыт
применения селективной адсорбции
эндотоксина у пациентов с тяжелым
сепсисом после открытых операций на
сердце. Анестезиология и реаниматология,
2014, N3, стр. 39-46. Е.С.Бажина. Коррекция
тканевой перфузии методами
экстракорпоральной детоксикации в
лечении абдоминального сепсиса.
Диссертация на соиск. учён. степени (см.
прод.)

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОКАЗАНИЙ К ПРОВЕДЕНИЮ СЕЛЕКТИВНОЙ АДСОРБЦИИ ЭНДОТОКСИНА У ПАЦИЕНТОВ С СЕПСИСОМ, ВЫЗВАННЫМ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к клинической лабораторной диагностике сепсиса, вызванного граммотрицательными микроорганизмами, в отделении реанимации и интенсивной терапии. Способ определения показаний к проведению селективной адсорбции эндотоксина у пациентов с сепсисом, вызванным граммотрицательными микроорганизмами, включает исследование температуры тела, общего количества лейкоцитов, нейтрофильного сдвига, уровня прокальцитонина в плазме крови,

определение активности эндотоксина с помощью хемоллюминесцентного анализа в тесте ЕАА; при температуре тела менее 36°C и более 38°C, общем количестве лейкоцитов менее $4 \times 10^9/\text{л}$ и более $12 \times 10^9/\text{л}$, нейтрофильном сдвиге более 10%, содержании прокальцитонина более 2 нг/мл и активности эндотоксина, равной или более 0,6, показано проведение процедур селективной сорбции эндотоксина, при выявлении активности эндотоксина менее 0,6 оценивают ответ

нейтрофилов по уровню показателя "Response" в тесте ЕАА, при уровне "Response" менее 0,5 дополнительно исследуют содержание в крови пациента пресепсина, при концентрации

пресепсина 1500 пг/мл и выше назначают процедуры селективной адсорбции эндотоксина. 1 пр., 1 табл.

(56) (продолжение):

к.м.н., 2016. **М.В.Четвериков. Селективная адсорбция эндотоксина при хирургическом сепсисе у онкологических больных. Автореферат на соиск. учен. степени к.м.н., 2015.**

R U 2 6 3 4 2 6 2 C 1

R U 2 6 3 4 2 6 2 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2017101703, 19.01.2017

(24) Effective date for property rights:
19.01.2017Registration date:
24.10.2017

Priority:

(22) Date of filing: 19.01.2017

(45) Date of publication: 24.10.2017 Bull. № 30

Mail address:

119049, Moskva, Leninskij pr-kt, 8, FGBU
"NMITSSSKH im. A.N. Bakuleva" Minzdrava
Rossii, otdel intellektualnoj sobstvennosti,
Yushkevich T.I.

(72) Inventor(s):

Rogalskaya Ekaterina Anatolevna (RU),
Klimovich Lyudmila Grigorevna (RU),
Plyushch Marina Georgievna (RU),
Samsonova Natalya Nikolaevna (RU),
Yarustovskij Mikhail Borisovich (RU),
Abramyan Marina Vladimirovna (RU)

(73) Proprietor(s):

Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe
uchrezhdenie "Natsionalnyj meditsinskij
issledovatel'skij tsentr serdechno-sosudistoj
khirurgii imeni A.N. Bakuleva" Ministerstva
zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii (FGBU
"NMITSSSKH im. A.N. Bakuleva" Minzdrava
Rossii) (RU)

(54) **METHOD FOR DETERMINATION OF INDICATIONS FOR SELECTIVE ADSORPTION OF ENDOTOXIN IN PATIENTS WITH SEPSIS CAUSED BY GRAM-NEGATIVE MICROORGANISMS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: method for determination of indications for selective adsorption of endotoxin in patients with sepsis caused by gram-negative microorganisms includes examination of body temperature, total leukocyte count, neutrophil shift, plasma procalcitonin level, determination of endotoxin activity by means of chemiluminescence analysis in the EAA test; at a body temperature less than 36°C and more than 38°C, total number of leukocytes less than $4 \times 10^9/l$ and more than $12 \times 10^9/l$, neutrophil shift of

more than 10%, procalcitonin content of more than 2 ng/ml and endotoxin activity equal to or greater than 0.6, selective sorption of endotoxin is prescribed, when the endotoxin activity of less than 0.6 is detected, neutrophils response is assessed according to the level of the "Response" index in the EAA test, at the "Response" level of less than 0.5, presepsin content in the patient's blood is further examined, at a presepsin concentration of 1500 pg/ml and above, selective adsorption of endotoxin is prescribed.

EFFECT: accuracy and objectivity increase.
1 ex, 1 tbl

RU 2 634 262 C1

RU 2 634 262 C1

Изобретение относится к медицине, а именно к клинической лабораторной диагностике сепсиса, вызванного грамотрицательными микроорганизмами, в отделении реанимации и интенсивной терапии.

Использование новых высокотехнологичных подходов в лечении больных сепсисом, вызванным грамотрицательными микроорганизмами, связано с необходимостью экспресс-диагностики эндотоксинемии.

Известен способ определения показаний селективной адсорбции эндотоксина (Кулабухов В.В., Чижов А.Г., Кудрявцев А.Н. Селективная липополисахаридная гемосорбция как ключевое звено патогенетически обоснованной терапии грамотрицательного сепсиса. Медицинский алфавит. Неотложная медицина. - 2010. №3. С. 60-66), который включает определение совокупности параметров: клинические признаки септического шока, бактериологический анализ, температура тела, общее количество лейкоцитов, нейтрофильный сдвиг, концентрация прокальцитонина, значения ЛАЛ-теста. Процедуры селективной адсорбции эндотоксина назначают при гипертермии более 38°C, общем количестве лейкоцитов более 12×10^9 /л, нейтрофильном сдвиге более 10%, концентрации прокальцитонина более 2,0 нг/мл, значениях ЛАЛ-теста 1,40 ЕдЭ/мл.

Однако в современной литературе имеются многочисленные данные о высокой частоте ложноположительных результатов ЛАЛ-теста. Поскольку сходство факторов коагуляции мечехвоста, клетки которого используются в ЛАЛ-тесте, с факторами свертывающей системы млекопитающих очень высоко, гелирование лизата могут вызывать тромбин и тромбопластин человека. Помимо взаимодействия с компонентами плазмы пациента, получению ложноположительных значений способствуют условия постановки теста. Даже незначительные колебания температуры (36°C или 38°C вместо положенных 37°C) или рН используемых реактивов (6,0 или 8,0 вместо 7,0) увеличивают частоту положительных результатов «гель-тромб» ЛАЛ-теста в 1,5 и 5,0 раз соответственно.

К другим затруднениям интерпретации результатов ЛАЛ-теста относят отсутствие в клинических исследованиях взаимосвязи значений теста с уровнем активации системы комплемента и экспрессией цитокинов мононуклеарными клетками, вызванной грамотрицательной микрофлорой; обнаружение положительных значений теста при наличии грибковой инфекции в системном кровотоке, что связано с активацией коагуляционного каскада теста (1→3)-β-D-глюканами.

Из литературы также известно, что для оценки эндотоксиновой нагрузки используется определение уровня активности эндотоксина ЕАА (Endotoxin Activity Assay). В основу этого теста положена реакция моноклональных антител к липиду А эндотоксина. Этот комплекс антиген-антитело (АГ-АТ) активирует нейтрофилы и вызывает в них окислительный «взрыв». Активные формы кислорода, вырабатываемые нейтрофилами, измеряются с помощью хемилюминесцентной реакции с люминолом (Romaschin A.D., Harris D.M., Ribeiro M.B., Paice J., Foster D.M., Walker P.M., Marshall J.C. A rapid assay of endotoxin in whole blood using autologous neutrophil dependent chemiluminescence // Journal of Immunological Methods. Elsevier; 1998; 212: 169-185).

Известен способ определения показаний к проведению селективной адсорбции эндотоксина у больных сепсисом (Попок З.В. Селективная сорбция эндотоксина в комплексной интенсивной терапии сепсиса у больных после кардиохирургических операций // Автореферат дис. канд. мед. наук. Москва, 2010. - 24 с.), при котором определяют температуру тела, общее количество лейкоцитов, нейтрофильный сдвиг, наличие очага инфекции и недостаточности органов и систем, уровень активности

эндотоксина (ЕАА), титр эндотоксина по ЛАЛ-тесту, концентрацию прокальцитонина.

Процедуры селективной адсорбции эндотоксина назначают при следующих значениях показателей: гипертермия более 38°C, общее количество лейкоцитов более 12×10⁹/л или менее 4×10⁹/л, нейтрофильный сдвиг более 10%, наличие очага инфекции и недостаточность более 2 органов и систем, уровень активности эндотоксина (ЕАА) более 0,6, титр эндотоксина по ЛАЛ-тесту более 0,72 ЕдЭ/мл, концентрация прокальцитонина более 2 нг/мл. При уровне ЕАА менее 0,6 селективная адсорбция эндотоксина не показана. Однако известный способ не учитывает дополнительный показатель "Response" в тесте ЕАА, который отражает уровень способности нейтрофилов пациента к окислительному «взрыву» (маркер фагоцитарной активности нейтрофилов *in vitro*).

Известен также способ назначения процедур селективной адсорбции эндотоксина у пациентов с сепсисом, вызванным грамотрицательными микроорганизмами (Четвериков М.В. Селективная адсорбция эндотоксина при хирургическом сепсисе у онкологических больных // Дис.канд. мед. наук. Ростов-на-Дону, 2015. - 131 с.), выбранный за прототип, при котором учитывают показатель "Response", температуру тела, частоту сердечных сокращений, частоту дыхания или парциального давления углекислого газа в артериальной крови, общее количество лейкоцитов, нейтрофильный сдвиг, значения теста ЕАА и концентрацию прокальцитонина. Назначение процедур селективной адсорбции эндотоксина проводят при наличии гипертермии более 38,3°C или гипотермии менее 36°C, тахикардии более 90 уд./мин, тахипноэ более 20 вдохов/мин или парциального давления углекислого газа в артериальной крови (раСО₂) менее 32 мм вод.ст., общего количества лейкоцитов более 12×10⁹/л и менее 4×10⁹/л, нейтрофильного сдвига более 10%, значений теста ЕАА более 0,6 или 0,4-0,6 при уровне "Response" менее 0,5, прокальцитонина более 2 нг/мл. Недостатком известного способа является то, что он не учитывает пациентов со значениями ЕАА менее 0,4 при уровне "Response" менее 0,5 и высокой фагоцитарной активностью резистентных нейтрофилов, которые также нуждаются в процедурах селективной адсорбции эндотоксина.

Технической проблемой является создание более точного и информативного способа определения показаний к проведению селективной адсорбции эндотоксина у пациентов с сепсисом, вызванным грамотрицательными микроорганизмами.

Технический результат от использования способа заключается в расширении диагностических показателей экспресс-диагностики определения показаний к проведению селективной сорбции эндотоксина у пациентов с сепсисом, вызванным грамотрицательными микроорганизмами.

Измерение активности эндотоксина в тесте ЕАА напрямую связано со способностью нейтрофилов, опсонизированных иммунными комплексами «эндотоксин-АТ к эндотоксину», к фагоцитарной активности с последующим респираторным взрывом, интенсивность которого фиксируется автоматическим хемилюминометром. Принцип хемилюминесцентной оценки фагоцитарной активности основан на CR1/CR3-рецепторной активации нейтрофилов цельной крови к продуцированию оксидантов, вступающих в реакцию с люминолом. В тесте ЕАА имеется дополнительный показатель "Response", который отражает уровень способности нейтрофилов пациента к окислительному ответу.

Авторами обнаружено, что в группе пациентов с критически низким уровнем "Response" обращают на себя внимание низкие значения ЕАА и высокая концентрация пресепсина. Это обусловлено тем, что в системном кровотоке после связывания с

эндотоксином мембранный CD14 отщепляется от моноцита и в растворимой форме выходит в циркуляцию. Высвободившиеся в результате активации фагоцитоза лизосомальные протеиназы расщепляют растворимый CD14 с образованием фрагмента, который в настоящее время получил название пресепсин. Производитель позиционирует данный тест как показатель активации фагоцитоза. Таким образом, уровень пресепсина отражает фагоцитоз *in vivo*, тогда как тест на измерение активности эндотоксина ЕАА использует способность нейтрофилов к фагоцитозу *in vitro*.

Авторами сделано предположение, что нейтрофилы пациента не могут вступить в реакцию с иммунными комплексами в тесте ЕАА, поскольку их CR1/CR3-рецепторы заняты или истощены длительным поступлением в кровотоки массивных доз эндотоксина, вызывающих высокую фагоцитарную активность, которую отражает значительно увеличенная концентрация пресепсина (ПСП).

Анализ уровня "Response" помогает составить более полную и достоверную оценку клинического состояния пациента в каждом конкретном исследовании уровня эндотоксинемии, а использование значений "Response" и ПСП в способах назначения и мониторинга этиопатогенетической терапии сепсиса повышает информативность всего комплекса лабораторных исследований уровня эндотоксинемии и эффективность проводимой терапии в целом, что позволяет не пропустить пациентов с низкой иммунной реактивностью организма, нуждающихся в адсорбции.

Сущность изобретения состоит в следующем.

У пациентов с подозрением на сепсис, вызванный грамотрицательными микроорганизмами, оценивают температуру тела, общее количество лейкоцитов, нейтрофильный сдвиг, концентрацию прокальцитонина, активность эндотоксина тестом ЕАА и уровень адекватности ответа нейтрофилов "Response", концентрацию пресепсина. Селективная адсорбция эндотоксина показана при следующих значениях показателей: температура тела менее 36°C и более 38°C, общее количество лейкоцитов менее 4×10^9 /л и более 12×10^9 /л, нейтрофильный сдвиг более 10%, концентрация прокальцитонина 2 нг/мл. При содержании прокальцитонина, равном или более 2 нг/мл, определяют активность эндотоксина с помощью хемолюминесцентного анализа в тесте ЕАА. Назначают проведение процедур селективной адсорбции эндотоксина при активности эндотоксина, равной и более 0,6. При этом при выявлении активности эндотоксина менее 0,6 оценивают ответ нейтрофилов по уровню показателя "Response" в тесте ЕАА, характеризующего функциональную активность нейтрофилов. При уровне "Response" менее 0,5 дополнительно исследуют содержание в крови пациента пресепсина. При концентрации пресепсина 1500 пг/мл и выше назначают процедуры селективной адсорбции эндотоксина.

Способ осуществляется следующим образом.

Исследуем уровень прокальцитонина (ПКТ) у пациентов с подозрением на сепсис, вызванный грамотрицательными микроорганизмами, с гипертермией более 38°C или гипотермией менее 36°C, общим количеством лейкоцитов более 12×10^9 /л и менее 4×10^9 /л, нейтрофильным сдвигом более 10%. Анализ концентрации ПКТ необходим для выявления группы пациентов с предполагаемой бактериальной инфекцией среди пациентов с признаками воспаления, вызванными иммунным ответом на хирургическое лечение или вирусную инфекцию.

Измерение уровня ПКТ в плазме крови проводят на иммунохимическом анализаторе Elecsys 2010 (Roche) количественным электрохемилюминесцентным иммунотестом ECLIA - Elecsys BRAHMS PCT (BRAHMS Diagnostica GmbH). В основе метода лежит

способность антигенов и антител формировать «сэндвич-комплексы». В реакцию вступают антигены (ПКТ) исследуемого образца и моноклональные антипрокальцитониновые антитела (мышь), меченные рутениевым комплексом, и антитела, меченные биотиновой меткой.

5 На следующем этапе определяем уровень активности эндотоксина (ЕАА) и "Response" у пациентов с концентрацией ПКТ более 2 нг/мл. Измерение уровня активности эндотоксина необходимо для дифференциальной диагностики инфекции, вызванной грамотрицательными микроорганизмами.

10 В основе метода ЕАА лежит реакция эндотоксина цельной крови пациента с антиэндотоксиновыми антителами, содержащимися в реактиве. Белки комплемента опсонизируют образованные комплексы антитела/эндотоксин. Опсонизированные иммунные комплексы через комплементарные рецепторы к компонентам комплемента взаимодействуют с нейтрофилами, которые в присутствии зимозана подвергаются респираторному взрыву.

15 Продуцируемые нейтрофилами оксиданты вступают в реакцию с люминолом. Интенсивность хемилюминесценции пропорциональна уровню эндотоксина в исследуемом образце. Хемилюминесценция обнаруживается подсчетом фотонов в хемилюминометре. Измеренные прибором величины преобразуются расчетом в единицы эндотоксина, а единица его активности как пропорциональная суммарной возможной
20 активности (0-1,00). В тесте ЕАА имеется специальный параметр "Response", отражающий степень адекватности окислительного ответа нейтрофилов.

Оценку уровня хемилюминесценции проводят в трех прилагаемых к набору пробирках, отличающихся по составу добавленных в них реагентов, в которые добавляется цельная кровь пациента. Каждый ЕАА-тест состоит из «пробирки 1»
25 (контроль), «пробирки 2» (образец) и «пробирки 3» (максимум). В «пробирке 1» проводят измерение базальной активности, определяющей неспецифический оксидативный всплеск нейтрофилов больного в отсутствие специфических антиэндотоксиновых антител. В «пробирке 3» определяют уровень максимально возможного оксидативного ответа нейтрофилами больного. В «пробирке 2» проводят аналитическое измерение. Уровень
30 ЕАА рассчитывается нормализацией хемилюминесценции в исследуемой пробе («пробирка 2») относительно максимальной хемилюминесценции («пробирка 3») с коррекцией обоих результатов по базальной активности хемилюминесценции («пробирка 1»).

35 Пациентам с уровнем ЕАА более или равным 0,6 назначают процедуры селективной адсорбции эндотоксина.

На следующем этапе оцениваем адекватность ответа нейтрофилов по уровню "Response" у пациентов с ЕАА менее 0,6. Значения "Response" получаем автоматически при измерении уровня эндотоксина тестом ЕАА. Согласно комментариям производителя теста ЕАА, референсный диапазон показателя "Response" составляет 0,80-0,98. Оценку
40 уровня «Response» проводим, чтобы не исключить больных с низкой реактивностью нейтрофилов и поэтому ложно заниженными значениями ЕАА, которые также нуждаются в проведении селективной адсорбции эндотоксина.

У пациентов с ЕАА менее 0,6 и "Response" менее 0,5 исследуем концентрацию пресепсина в цельной крови пациента. Измерения уровня ПСП необходимы, чтобы
45 подтвердить чрезмерную активацию иммунитета высокими уровнями циркулирующего в крови эндотоксина. Концентрацию пресепсина измеряют на анализаторе PATHFAST (Mitsubishi Chemical Medience Corp.) В основе тест-системы лежит метод хемилюминесцентного иммуноферментного анализа (CLEIA) с применением специальной

технологии разделения связанного и свободного материала промывкой магнитных частиц в наконечниках MAGTRATION (Precision System Science).

В тесте используются смесь моно- и поликлональных антител к пресепсину: поликлональные антитела дополнительно связаны со щелочной фосфатазой, моноклональные антитела - с магнитными частицами. При добавлении в реакционную смесь пробы исследуемой крови происходит образование иммунных комплексов - ПСП/ меченные ферментом АТ/АТ на магнитных частицах. После удаления несвязавшегося материала к этому комплексу добавляется хемилюминесцентный субстрат, ферментативное превращение которого инициирует люминесценцию. Интенсивность люминесценции пропорциональна концентрации пресепсина в пробе. Расчет результата проводится по стандартной калибровочной кривой.

Пациентам с концентрацией пресепсина 1500 пг/мл и выше назначают процедуры селективной адсорбции эндотоксина.

Приводим данные, подтверждающие возможность реализации заявленного назначения и достижения указанного технического результата.

Клинический пример. Послеоперационный период у пациента М. 48 лет после кардиохирургического вмешательства на клапане сердца осложнился грамотрицательным сепсисом, очагом инфекции явилась ИВЛ-ассоциированная пневмония; температура тела 38,5°C, общее количество лейкоцитов $3,0 \times 10^9$ /л. Описанным способом в крови пациента измерили концентрацию ПКТ, которая составила 5,5 нг/мл. Затем была измерена активность эндотоксина тестом ЕАА, которая составила менее 0,60 (0,00). Поэтому была проведена оценка адекватности ответа нейтрофилов в тесте ЕАА по уровню "Response", который составил 0,01. На последнем этапе была измерена концентрация ПСП, уровень которой составил 9482 пг/мл. Пациенту были назначены процедуры селективной адсорбции эндотоксина. После двух процедур селективной адсорбции эндотоксина способность нейтрофилов к оксидативному взрыву возросла до 37%, а значения активности эндотоксина достигли верхней границы диапазона, что можно связать с освобождением CR1/CR3-рецепторов полиморфноядерных нейтрофилов за счет снижения уровня эндотоксина. В таблице представлены результаты исследования пациента М. до и после селективной адсорбции эндотоксина. Пациент М. был переведен в отделение и выписан.

Таблица

ПОКАЗАТЕЛЬ	до адсорбции	после адсорбции
"Response"	0,01	0,37
ЕАА	0,00	0,99
ПКТ, нг/мл	5,5	8,7
Пресепсин, пг/мл	9482	8367

(57) Формула изобретения

Способ определения показаний к проведению селективной адсорбции эндотоксина у пациентов с сепсисом, вызванным грамотрицательными микроорганизмами, включающий исследование температуры тела, общего количества лейкоцитов,

нейтрофильного сдвига, уровня прокальцитонина в плазме крови, определение активности эндотоксина с помощью хемолюминесцентного анализа в тесте ЕАА; при температуре тела менее 36°C и более 38°C, общем количестве лейкоцитов менее $4 \times 10^9/\text{л}$ и более $12 \times 10^9/\text{л}$, нейтрофильном сдвиге более 10%, содержании прокальцитонина более 2 нг/мл и активности эндотоксина, равной или более 0,6, показано проведение процедур селективной сорбции эндотоксина, при выявлении активности эндотоксина менее 0,6 оценивают ответ нейтрофилов по уровню показателя "Response" в тесте ЕАА, отличающийся тем, что при уровне "Response" менее 0,5 дополнительно исследуют содержание в крови пациента пресепсина, при концентрации пресепсина 1500 пг/мл и выше назначают процедуры селективной адсорбции эндотоксина.

15

20

25

30

35

40

45