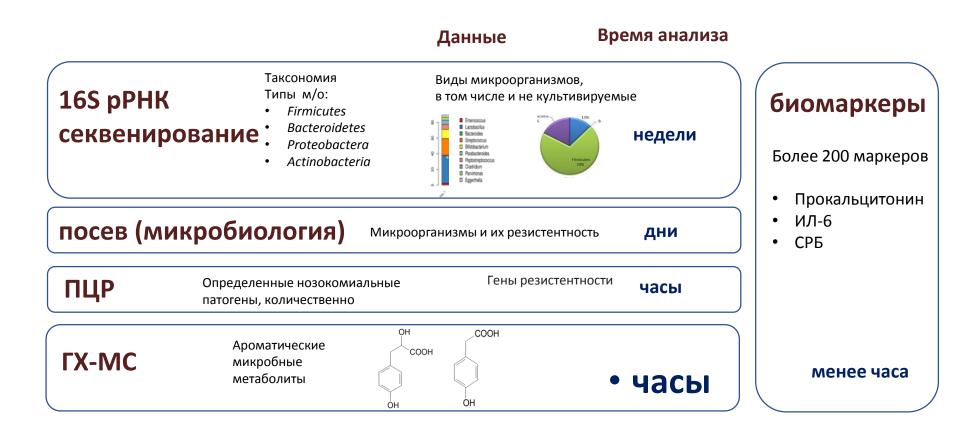
Вебинар для медицинских специалистов Тверской области 18 марта 2021 года

Лабораторные маркеры бактериальной инфекции и сепсиса

ведущий научный сотрудник, к.б.н. Черневская Е.А.

ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии НИИ общей реаниматологии им.В.А. Неговского, Москва

Методы диагностики



Биомаркеры, используемые для диагностики сепсиса

TT	Acute phase protein (procalcitonin, c-reactive protein,			
Human				
	ceruloplasmin, ferritin, lipopolysaccharide-binding protein, calprotectin, pro-adrenomedulin, pentraxin-3)			
_	Cytokine/chemokine [IL2,4,6,8,10, MIP1,2, macrophage migration			
	inhibitory factor (MIF), TNF, RANTES]			
Park	Cell markers (mHLA-DR, mCD14, CD10,25,28,48,64)			
7.002.7	Receptors (CC chemokine receptor, Fas-receptor, Toll-like receptor			
100	2 and 4, TREM-1)			
4.8	Coagulation (antithrombin, D-dimers, PAI-1, protein C and S,			
NK.	thrombomodulin, plasmin-α2-antiplasmin complex)			
	Vascular endothelial damage (ADAMTS-13, endocan, neopterin,			
	ICAM-1, E-selectin, YKL-40)			
	Vasodilation (NO, vasoactive intestinal peptide, copeptin)			
	Heart, brain dysfunction (ANP, BNP, MR-proADM, GFAP, S100b,			
	endothelin)			
	Others (microRNAs, circulating free DNA)			
Microbes	Microbiologic cultures			
	LPS			
1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	DNA/RNA			
	Gut/Lung microbiota			
* 1 * 6				
Host-microbe	Motobolitos of			
	Metabolites of:			
interaction	Amino acids (glycine, alanine, histidine, creatine, phenylalanine, 3-			
	nitrotyrosine glutathione)			
COOH	Polyols (glucuronic acid, gluconic acid, myoinositol, maltose, ribitol,			
	ribonic acid, 3,4-dihydroxy-butanoic acid, 2,3,4-trihydro-xybutyric			
	acid)			
	Fatty acids (formic acid, 2-oxoiso-caproate, betaine, acetylacetic			
СООН	acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, 4,7,10,13,16-			
HO -	docosapenta-enoic acid , 4,7,10,13,16,19-docosa-hexaenoic acid,			
	phenylacetic acid, phenylpropionic acid, 4-hydroxy-phenylacetic			
	acid, homovanillic acid)			
	Hydroxy acids (3-hydroxybutyric acid, 2-hydroxyiso-valeric acid,			
но	phenyllactic acid, 4-hydroxy-phenyllactic acid)			
	Amines (ethanolamine, taurine, hypotaurine, phosphoethanol-amine,			
1	creatinine, proline, indoxyl sulfate)			
	creatinine, profine, maoxyr surface)			
	Nitrogen heterocycles, nucleotides (uracil, hypoxanthine, uric acid,			

258 биомаркеров

Помимо исследований Среактивного белка или прокальцитонина, только 26 биомаркеров были оценены в клинических исследованиях с количеством участников более 300.

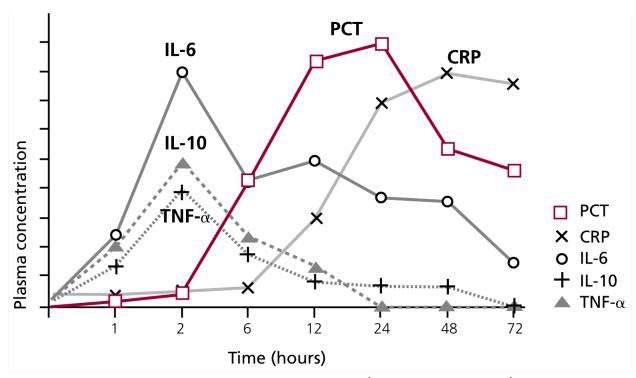
Pierrakos C, Velissaris D, Bisdorff M, Marshall JC, Vincent J. Biomarkers of Sepsis: Time for a reappraisal. Crit Care. 2020; 24: 287

Что мы хотим от диагностики?!

- Короткий период полураспада (быстрое увеличение и быстрое снижение концентрации)
- Высокая чувствительность (100%) и специфичность (> 85%)
- Определение этиологии сепсиса
- Уровень не должен повышаться с другими сопутствующими заболеваниями
- Своевременность
- Возможность ориентироваться для старта и прекращения антибиотикотерапии
- Стандартизированное значение

- Должен быть надежным и точным
- Точно предсказать тяжесть заболевания
- Должен помочь в прогнозировании
- Тест должен быть легко выполнимым
- Метод измерения должен быть легко доступным
- Экономически эффективным
- Короткое время выполнения заказа
- Результаты сопоставимы между различными лабораториями
- Требуется очень небольшое количество образца

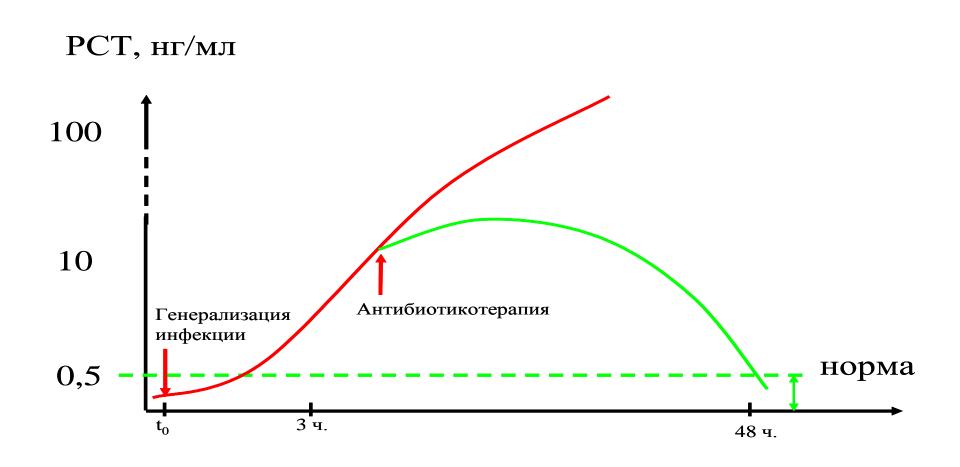
Кинетика биомаркеров



- Быстрое повышение уровня ПКТ (в теч. 3-4 часов), высокодинамичная зависимость
- Широкий диапазон концентраций от 0.05 нг/мл до 1000 нг/мл
- Короткий полупериод существования (~ 24 ч), независимый от функции почек
- Легкий в определении в плазме и сыворотке крови стабильный *in vivo* и *in vitro*

Делать вовремя!

Перед началом или сменой АБТ!



Тест на прокальцитонин

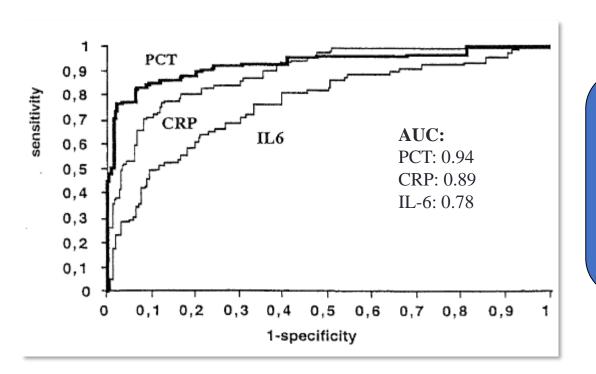
- оптимизация антибиотикотерапии
- прогностический критерий при тяжелых бактериальных инфекциях, раннее выявление больных с высоким риском развития инфекционных осложнений после операций
- дифференциальная диагностика бактериальных инфекций различной локализации

Дифференциальная диагностика бактериальной vs. вирусной инфекции

Comparison of procalcitonin with C-reactive protein, interleukin 6 and interferon-alpha for differentiation of bacterial *vs. viral infections*

Ретроспективное, обсервационное исследование, 360 новорожденных и детей:

46 с тяжелой бактериальной инфекцией, 78 – локальная бактериальная инфекция, 236 - вирусная



Лучшая cut-off для РСТ: 1 ng/ml
Чувствительность: 83%
Специфичность: 98%

Отличие РСТ vs CRP/IL6
P<0.001

Gendrel D. et al., Pediatr Infect Dis , J. 1999;18:87.5-81

Дифференциальная диагностика бактериальной инфекции у детей.

Бакт vs. Вирусная / Системная бакт vs. локальная

Gendrel, Pediatr Infect Dis J. 1999

ПКТ

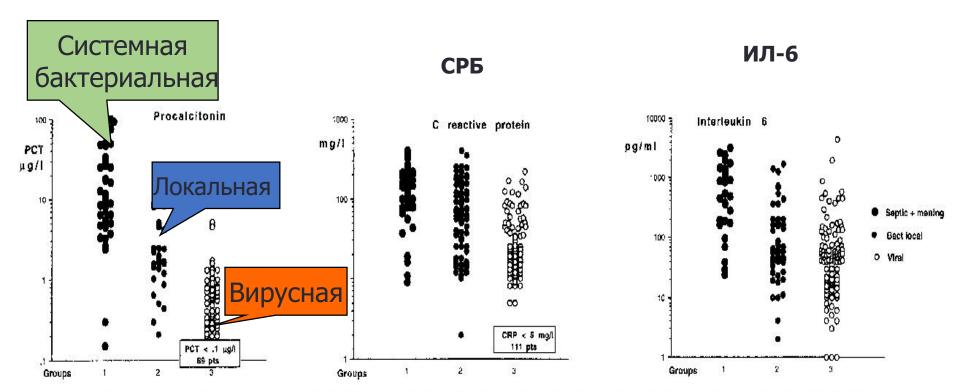


Fig. 1. Individual values of procalcitonin, C-reactive protein and interleukin 6 in the three groups of patients.

Управление антибиотикотерапией

1131 пациентов ОРИТ

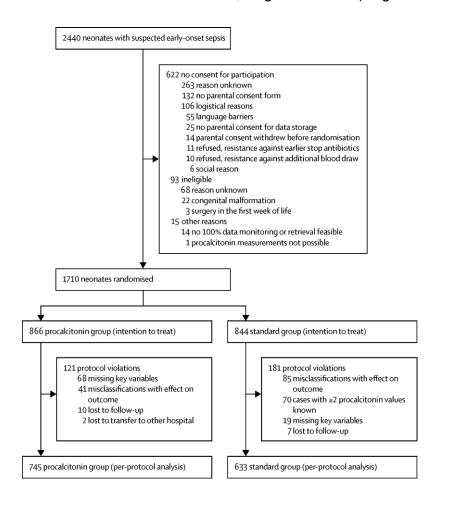
(взрослых n=1010; новорожденных n= 121)

- реализации алгоритма на основе прокальцитонина может снизить продолжительность антибиотикотерапии пациентов ОРИТ без ухудшения клинического состояния

Kopterides P et al..Crit Care Med. 2010 Nov

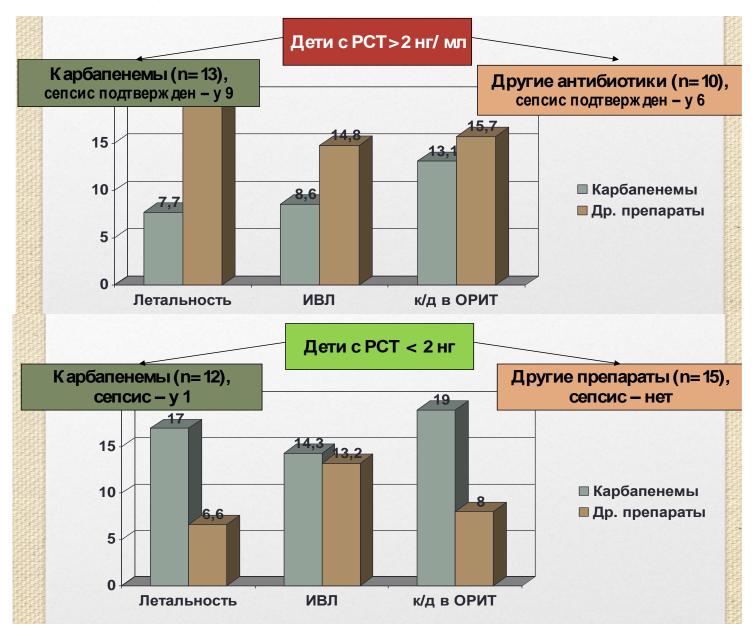
Procalcitonin-guided decision making for duration of antibiotic therapy in neonates with suspected early-onset sepsis: a multicentre, randomised controlled trial (NeoPlns)

Martin Stocker, MD, Dr Wendy van Herk, MD, Salhab el Helou, MD, Sourabh Dutta, et al **The Lancet** Volume 390, Issue 10097, Pages 871-881 (August 2017) DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31444-7



Протокол, с использованием прокальцитонина приводил с снижению продолжительности антибактериальной терапии у новорожденных с подозрением на сепсис

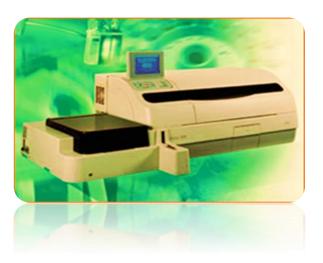
Антибиотики должны назначаться по показаниям:



Белобородова Н.В., Гребенников В.А., Траубе М.А. РМЖ 2007

Неонатальный скрининг с применением биомаркеров (PCT + S100)

- В исследование включались новорожденные в критическом состоянии, поступающие в реанимационное отделение ДГКБ №13 им. Н.Ф. Филатова
- Уровень биомаркеров **прокальцитонина** и **белок S-100** в момент госпитализации определен у **69 пациентов**
- Среди обследованных пациентов недоношенных 32 (46%) ребенка, доношенных 37 (54%).



Elecsys \$100: объем исследуемой пробы (сыворотка, плазма) - 20 мкл.
Время анализа — 18 мин. Аналитическая точность метода ≤0,005 мкг/л. Функциональная чувствительность метода <0,02 мкг/л. Диапазон измерения 0,005-100 мкг/л.

Дмитриева И.Б., Белобородова Н.В., Черневская Е.А. «Общая реаниматология», 2013, №3

АЛГОРИТМ ВЫБОРА АНТИМИКРОБНОЙ ТЕРАПИИ с учетом биомаркеров РСТ, \$100b, ДНК

ПРИ ПОСТУПЛЕНИИ новорожденного в критическом состоянии исследуются биомаркеры РСТ + S 100b+ ДНК РСТ норма PCT > 2 нг/мл РСТ 0,5-2 нг/мл Режим режим Режим «СТАРТОВЫЙ» «МАКСИМАЛЬНЫЙ» «РАБОЧИЙ» или продолжение ранее назначенной терапии НА 2-3 ДЕНЬ ЛЕЧЕНИЯ В СЛУЧАЕ УХУДШЕНИЯ КЛИНИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ повторно исследуются биомаркеры РСТ + S 100b+ ДНК РСТ повысился РСТ снизился Смена антибиотиков S 100b S 100b S 100b ве с учетом количества повысился CHRIBACH **ВЗМЕВВЛСЯ** днк дообследование, исключить проблемных поиск «неинфекционных» возбудителей причин ухудшения МОНИТОРИНГ БИОМАРКЕРОВ В КОРРЕКЦИЯ АНТИМИКРОБНОЙ ТЕРАПИИ при недостаточной эффективности лечения РСТ не повышен РСТ повышен при высоком количестве и/или нарастании ДНК ДНК грибов проблемных возбудителей Candida albicans флюконазол. Candida non-albicans -ДНК грам(+) MRS вориконазол, каспофунгин - занкомицин, линезолид ДНК грам (-) Pseudomonas aeruginosa - амикацин, меропенем, азтреонам, пиперациллин/тазобактам Klebsiella - карбапенемы (эртапенем, имипенем, меропенем) Acinetobacter - цефоперазон/сульбактам, тикарциллин/клавуланат, пиперациллин/тазобактам

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт общей реаниматологии им.В.А.Неговского» Российской академии медицинских наук

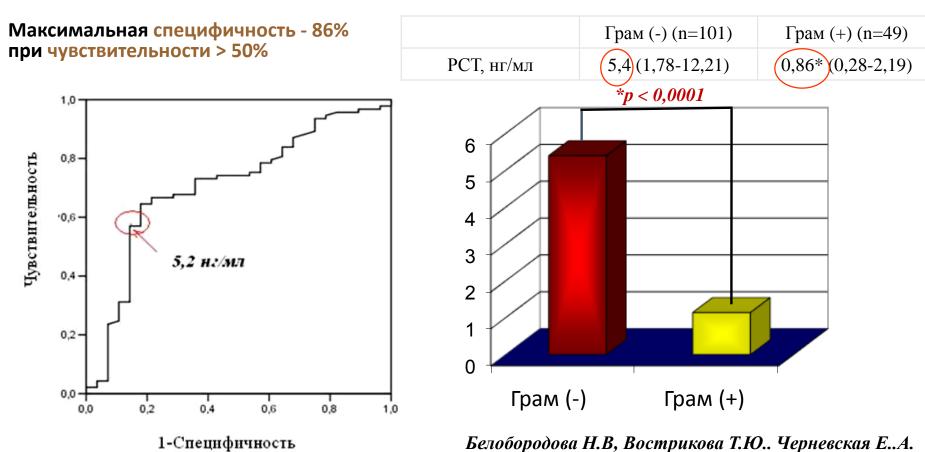
ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА АНТИМИКРОБНОЙ ТЕРАПИИ при критических состояниях новорожденных

Методические рекомендации 2013

Уровень прокальцитонина РСТ (нг/мл) выше при грамотрицательной бактериемии

Площадь под кривой (AUC) равна 0,702, что свидетельствует о хорошей прогностической способности данной модели (согласно экспертной шкале для значений AUC).

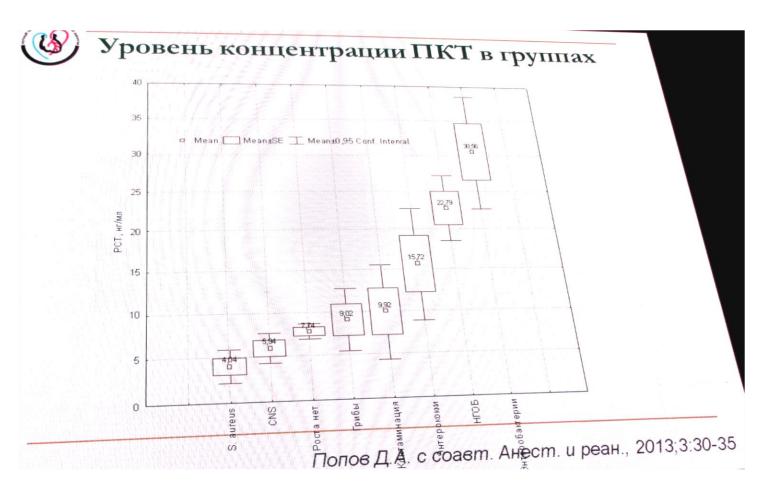
Порог отсечения ($cut - off \ value$) PCT = 5,2 нг/мл



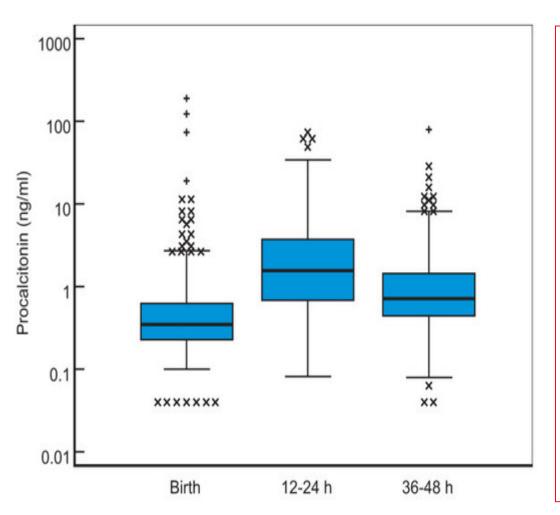
Анестезиология и реаниматология, №4, 2008

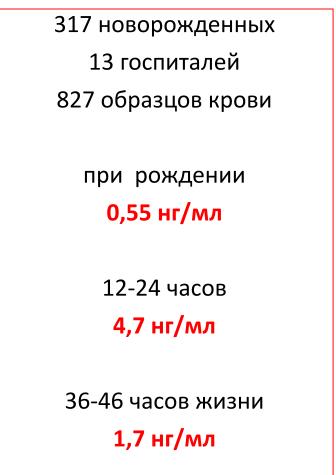
Прокальцитонин и бактериемия

За 6 лет 10158 образцов от 4113 пациентов (возраст от 2х дней до 98 лет), взятых одновременно с определением уровня ПКТ в сыворотке крови. У пациентов с бактеримиями уровень ПКТ был статистически значимо выше, чем у пациентов с грамотрицательной гемокультурой. Более высокие уровни ПКТ (cut-off 2,47 нг/мл) характерны для грамотрицательной инфекции

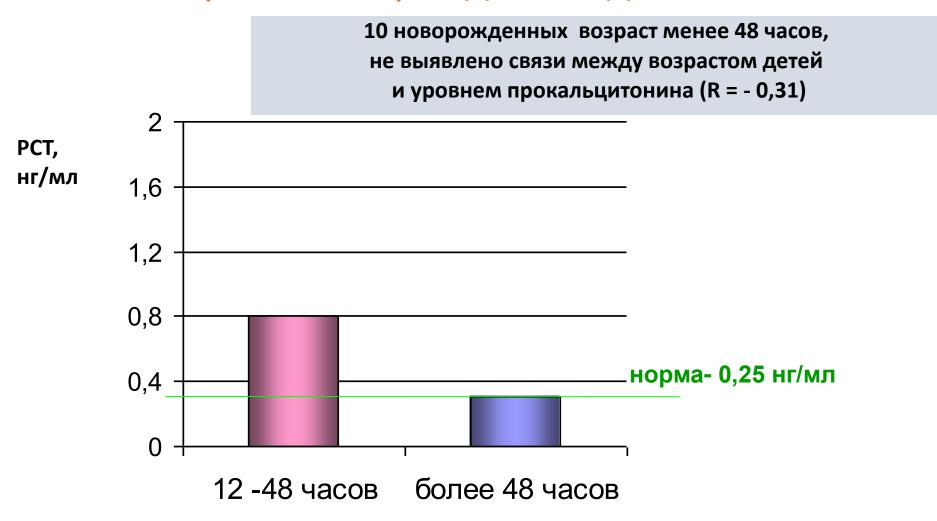


Особенности применения теста на прокальцитонин в неонатологии и педиатрии



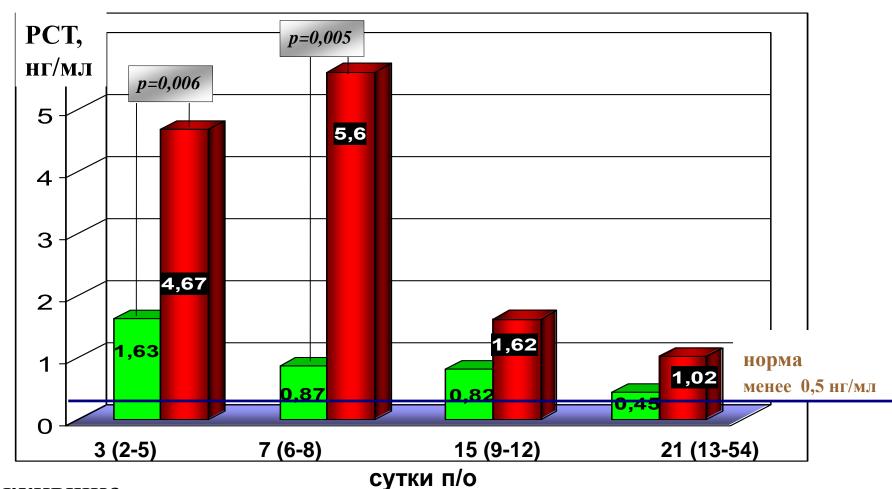


Уровень прокальцитонина не зависел от возраста новорожденных детей



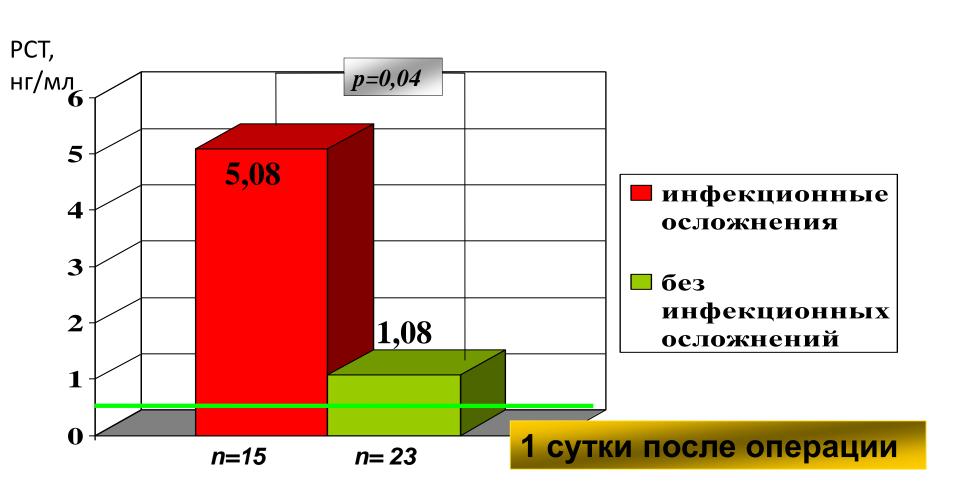
PCT — ценный инструмент для дополнительной диагностики неонатального сепсиса (Scand J Infect Dis. 2010)

Уровень прокальцитонина в послеоперационном периоде (РСТ, медиана, нг/мл) выше у пациентов с неблагоприятным исходом

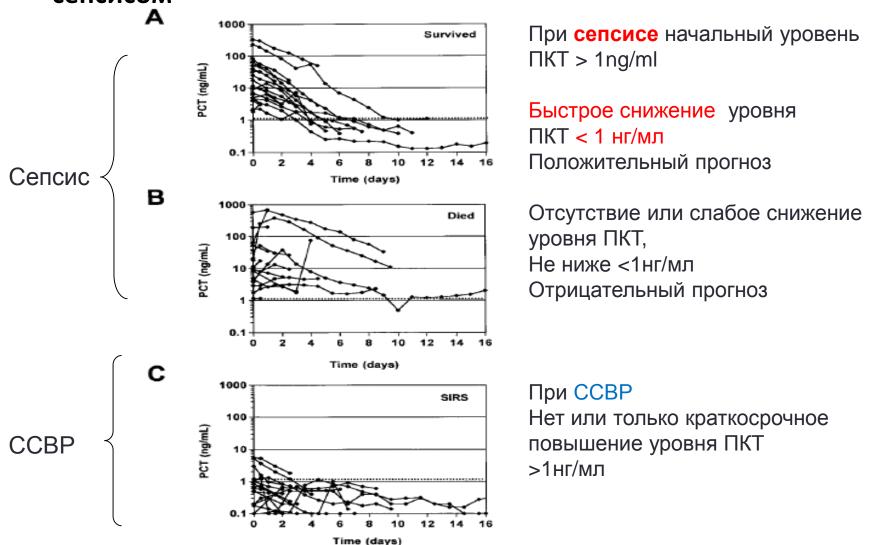


выжившие летальный исход

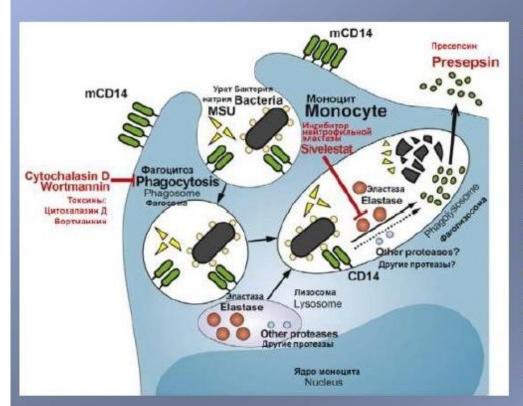
Прокальцитонин (РСТ) предиктор инфекционных осложнений у новорожденных в раннем послеоперационном периоде (медиана)



Кинетика ПКТ - важная прогностическая информация у пациентов с сепсисом



Механизм образования пресепсина



1.Секреция ПСП моноцитами индуцируется фагоцитозом бактерий или стерильными стимулами фагоцитоза (кристаллы моноурата Na) Ингибиторы фагоцитоза цигохалазин и вортманнин ингибируют секрецию пресепсина. 2. Эластаза (сериновая протеиназа содержащаяся в моноцитах, расшепляет CD14, с образованием пресепсина (мол. масса 13 Кда) Ингибитор эластазы – сивелестат ингибирует секрецию пресепсина.

Пресепсин – циркулирующий белок, маркер фагоцитоза _{Агагу, М}

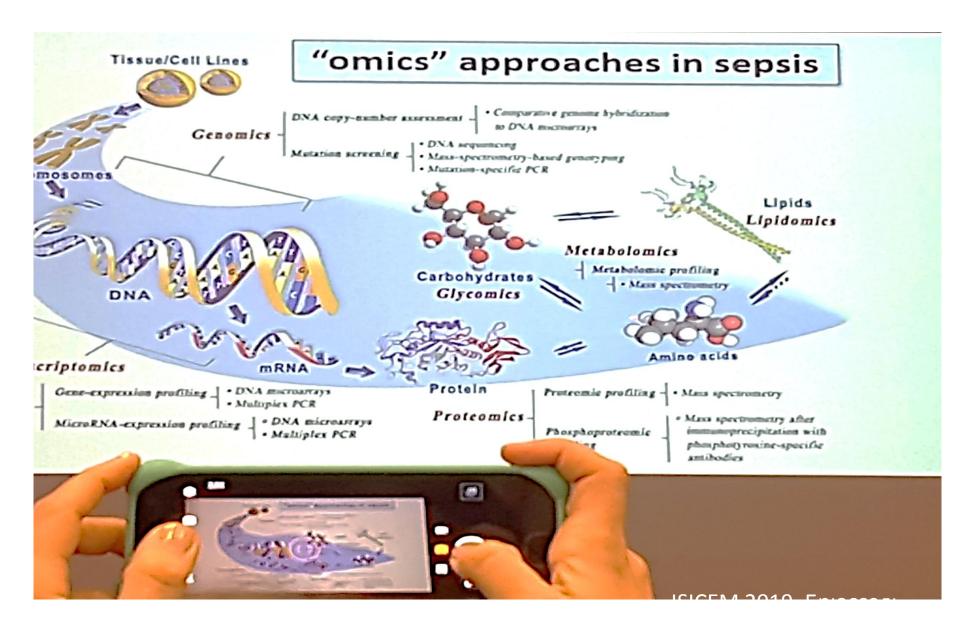
Arai Y, Mizugishi K, Nonomura K, Naitoh K, Takaori-Kondo A. Phagocytosis by human monocytes is required for the secretion of Presepsin. J Infect Chemother. 2015 Available online 6 May

ПОКАЗАТЕЛИ БИОМАРКЕРОВ В ДИНАМИКЕ

Ребенок Б. 1 месяц 11 дней с диагнозом: атрезия пищевода, реканализация трахеопищеводного свища. Операция. Реторакотомия по старому рубцу. Сформирована новая гастростома по Кадеру, трубка выведена через отдельный прокол. Разрезом на шее слева выделен пищевод и сформирована эзофагостома. Ранний послеоперационный период без особенностей.

	До операции	1-е сутки	3-и сутки
		после операции	после операции
РСТ, нг/мл	0,39	0,46	0,07
(норма 0-0,5 нг/мл)			
S100β, мкг/л	0,046	0,064	0,09
(норма 0-0,1 мкг/л)			
Psep, пкг/мл	856	3927	377
(норма 0-337)			

Перспективы диагностики



ОМИКС - технологии

собирательное название для ряда современных технологий, применяемых в молекулярной биологии. Данные технологии объединены тем, что их целью является проанализировать всю совокупность процессов, происходящих в клетке или целом живом организме. Результатом применения таких технологий является большой массив числовых данных, как правило, требующий автоматизированного компьютерного анализа. Примерами таких технологий являются секвенирование нового поколения (next-generation sequencing) и количественный анализ экспрессии генов (gene expression profiling)

- Протеомика
- Метагеномика
- Метаболомика
- Транскриптомика

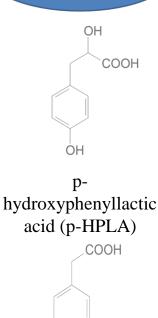


АРОМАТИЧЕСКИЕ МИКРОБНЫЕ МЕТАБОЛИТЫ

по химическому строению - НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФЕНИЛКАРБОНОВЫЕ КИСЛОТЫ (ФКК) ...

- В предыдущих исследованиях показано, что AMM продуцируются многими бактериями из состава микробиоты человека, в том числе основными возбудителями гнойновоспалительных заболеваний и госпитальных инфекционных осложнений (Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumonia, Escherichia coli, other enterobacteria and non-fermentic gramnegative bacteria)
- У больных в критическом состоянии одной из причин значительного повышения уровня АММ в крови является возрастание бактериальной нагрузки, максимально высокие цифры АММ в крови регистрируются у больных с сепсисом и ПОН и их суммарный уровень коррелирует с летальностью больных

Белобородова Н.В., Оленин А.Ю. и соавт., 2006

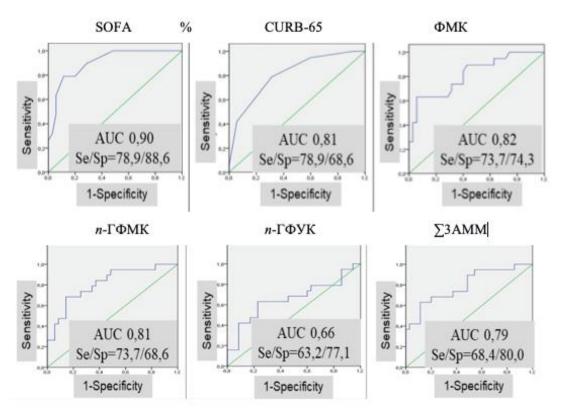


AMM

p-hydroxyphenylacetic acid (p-HPAA)



Прогнозирование органных дисфункций и исхода при тяжелой пневмонии



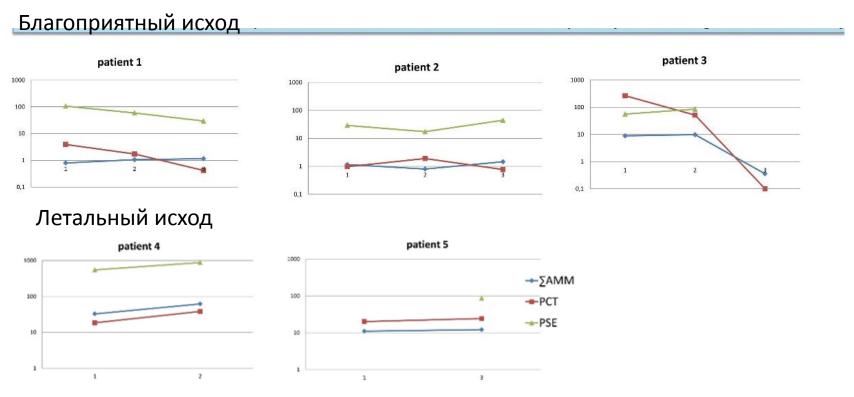
У пациентов с пневмонией (n=54) высокая прогностическая ценность AMM доказана:

- выявленной прямой корреляцией между концентрацией AMM и шкалой тяжести органных дисфункций SOFA;
- прямой корреляцией между концентрацией AMM и риском смерти;
- обратной корреляцией между п-ГФУК, ΣЗАММ и продолжительностью жизни до летального исхода.

. Белобородова Н.В. Журн. им. акад. Б.В. Петровского. 2020



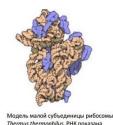
Динамика молекулярных маркеров



Обнаружены гены резистентности MBL группы NDM у 3 из 5 пациентов в эндотрахеальном аспирате, характерные для Klebsiella pneumoniae, именно она доминировала среди энтеробактерий у обследованных больных

Молекулярная диагностика — 2017 ISICEM -2017, Crit.care suppl.1 V21 2017)

Секвенирование по 16S рРНК АНАЛИЗ БАКТЕРИАЛЬНОГО СООБЩЕСТВА



оранжевым, белок синим

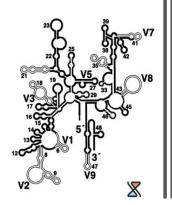
16S pPHK

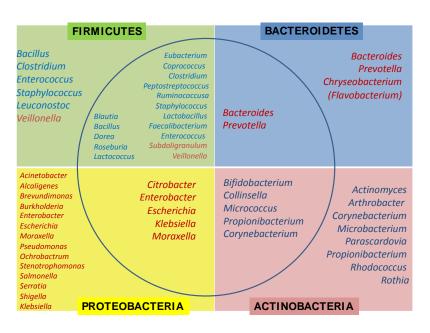
16S рибосомальная РНК — это компонент 30S малой субъединицы прокариотической рибосомы

Длина около 1500 оснований

Содержит 9 вариабельных регионов, ограниченных консервативными участками

Используется для классификации видов в веб-проекте Tree of Life.





Черневская Е.А., Белобородова Н.В. Общая реаниматология 2018



Home About Articles Submission Guidelines

Research | Open Access | Published: 08 June 2020

Serum and fecal profiles of aromatic microbial metabolites reflect gut microbiota disruption in critically ill patients: a prospective observational pilot study

Ekaterina Chernevskaya ⊠, Natalia Beloborodova, Natalia Klimenko, Alisa Pautova, Dmitrii Shilkin, Vitaliy Gusarov & Alexander Tyakht

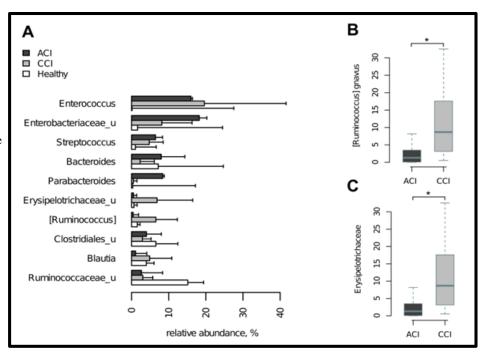
Critical Care 24, Article number: 312 (2020) Cite this article

Клиническая и лабораторная характеристика пациентов. Количественные данные представлены в виде медианы [25% и 75% квартилей];

ns - статистически не значимо

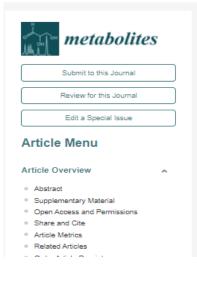
Параметр	Острая фаза	ХКС	р
Возраст, годы	58 (47-67)	45 (20-70)	ns
Баллы по шкале SOFA	5 (3-6)	4 (4-5.5)	ns
Индекс массы тела	26 (24.0-36.2)	21.8 (20.7-24.3)	< 0.05
РСТ (0.25 нг/мл)	1.84 (0.39 - 2.00)	0.04 (0.02-0.08)	< 0.05
Лейкоциты (4-9 × 10 ⁹)	12.7 (9.6-15.1)	9.6 (7.6-10.6)	ns
Инотропы	5/9	1/9	ns

Преобладающие виды микробиома кишечника для двух различных групп тяжелобольных пациентов. (A) - основные микробные роды в микробиоме кишечника в каждой из групп: острая фаза, ACI (N=24); XKC, CCI (N=22) и когорта здоровых людей из предыдущего исследования (N=215) [30]. (Б), (В) — Значительно различающимся между группами по содержанию таксоны острой фазы, CCI (N=22), и XKC, ACI (N=24).



Выявлены особенности микробиоты кишечника пациентов в остром и хроническом критическом состоянии в сопоставлении с метаболическим профилем

НИИ общей реаниматологии им. В.А. Неговского ФНКЦ РР



Open Access Article

Host-Microbiome Interactions Mediated by Phenolic Metabolites in Chronically Critically III Patients

by (☐ Ekaterina Chernevskaya 1.º.† ⊠ 0, (☐ Natalia Klimenko 2.3.† ⊠ 0, (☐ Alisa Pautova 1 ⊠, (☐ Irina Buyakova 1 ⊠, (☐ Alexander Tyakht 2.3 ⊠ 0) and (☐ Natalia Beloborodova 1 ⊠ 0)

- Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, 25-2 Petrovka Str., 107031 Moscow, Russia
- Atlas Biomed Group—Knomics LLC, 31 Malaya Nikitskaya Str., 121069 Moscow, Russia
- 3 Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences, 34/5 Vavilova Str., 119334 Moscow, Russia
- * Author to whom correspondence should be addressed.
- † These authors contributed equally to this paper.

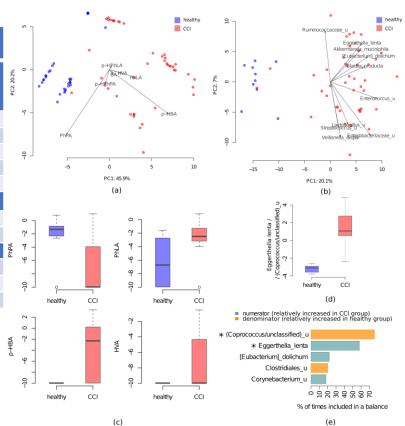
Academic Editors: Laura-Isobel McCall, Hosein Mohimani and Andrés Mauricio Caraballo-Rodríguez

Metabolites 2021, 11(2), 122; https://doi.org/10.3390/metabo11020122

Received: 31 December 2020 / Revised: 14 February 2021 / Accepted: 19 February 2021 / Published: 20 February 2021

Метаболиты	Пациенты ХКС (n=44)	Контроль*	FDR			
Микробные метаболиты (АММ), μМ						
PhLA	0.2 (0.1-0.4)	<lod **<="" th=""><th>1.9x10⁻⁷</th></lod>	1.9x10 ⁻⁷			
p-HPhAA	0.7 (0.3-1.8)	<lod **<="" th=""><th>>0.05</th></lod>	>0.05			
p-HPhLA	0.8 (0.6-1.1)	0.7 (0.6-1.0)	>0.05			
BA	0.5 (0.3-0.8)	0.4 (0.3-0.8)	>0.05			
p-HBA	0.2 (0-0.9)	<lod **<="" th=""><th>5.3x10⁻¹⁰</th></lod>	5.3x10 ⁻¹⁰			
Митохондриальные метаболиты (TCA), μ M						
Succinic Acid (SA)	6.3 (4.4–10.1)	22.0 (15.5-26.2)	6.3x10 ⁻⁶			
Fumaric Acid (FA)	0.6 (0.3-1.2)	1.8 (1.3-2.4)	6.3x10 ⁻⁶			
Биомаркеры***						
Прокальцитонин	0.06 (0.03-0.09)	0.25 ng/mL	-			
ИЛ-6	21 (12-33)	< 7 pg/mL	-			
S100	0.06 (0.04-0.1)	< 0.1 μg/L	-			

У пациентов в хроническом критическом состоянии выявлены выраженные нарушения таксономического состава микробиоты кишечника независимо от тяжести поражения ЦНС. Корреляции биомаркеров с некоторыми представителями микробиоты свидетельствуют в пользу концепции о связи в системе координат «головной мозг-кишечник»



Мониторинг ДНК «проблемных» микроорганизмов в О РИТ в биотопах дыхательных путей и кишечника

ПЦР в реальном времени, тест - системы производства **ФБУН «Центральный НИИ** эпидемиологии»

ДНК бактерий (общая)

ДНК сем. Enterobacteriaceae

ДНК E. coli

ДНК К. pneumoniae

ДНК P. aeruginosa

ДНК Staphylococcus spp.

ДНК Streptococcus spp

ДНК Candida spp.

Гены

антибиотикорезистентности:

mec

Карбапенемазы групп КРС/ОХА Металло-в-лактамазы (МБЛ)

групп NDM, IMP, VIM





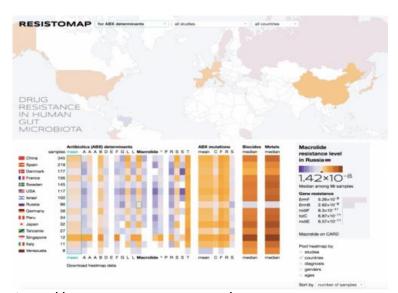


Скрининг с применением количественного определения ДНК микроорганизмов

Частота повышения уровня биомаркеров воспаления (РСТ и/или СРБ)
За 2011 -2012 год
более 1000 образцов пациенты ОРИТ ДГКБ № 13

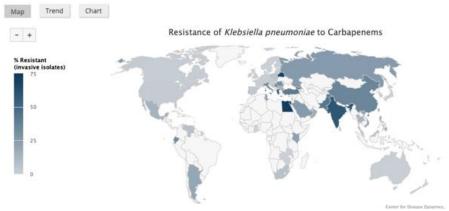
концентрация ДНК от 100 до 10^7 копий/мл 800-104 100-800 10⁴ и выше менее 100 Метициллинрезистент 58% 60% ные коагулазонегативные более 30 % подтверждено м/б стафилококкоки Pseudomonas aeruginosa 35% 30% более 30 % подтверждено м/б Candida albicans/ более 60 % подтверждено м/б C.glabrata/ C.krusei Черневская Е.А. с соавт. Справочник заведующего КДЛ. 2016

Антибиотикорезистентность



http://resistomap.rcpcm.org/

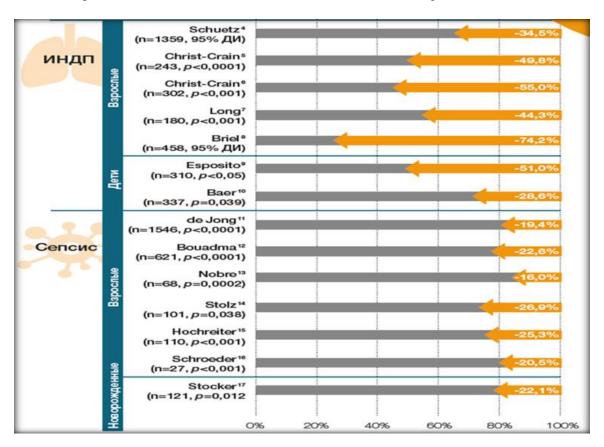
Antibiotic Resistance https://resistancemap.cddep.org/







ДОКАЗАНО: мониторинг прокальцитонина (РСТ) позволяет снизить частоту назначения антибиотиков и АБ-резистентность



Десятками исследований подтверждено, что и при **инфекции нижних дыхательных путей** (ИНДП) и **при сепсисе**

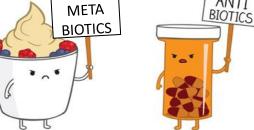
и у детей, и у взрослых необходимо ограничить длительность курсов АБтерапии.

Под контролем объективного теста на РСТ можно раньше отменить антибиотики, сократить число дней антибиотикотерапии, тем самым снизить риск нарушения микробиоты и роста антибиотикорезистентности бактерий.



PE3ЮME / (или «Quo vadis»?)

- ✓ Использовать современные возможности для быстрой диагностики (ПЦР, биомаркеры)
- ✓ Много не значит хорошо! Рациональный подход
- ✓ к антимикробной терапии



√«Микробиота-сохраняющая» терапия

Благодарю за внимание!





Лаборатория метаболизма при критических состояниях

Научный центр психического здоровья

ФГБУН институт биологии гена Российской академии наук

«Национальный медико-хирургический Центр имени Н.И. Пирогова»

Кномикс

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

echernevskaya@fnkcrr.ru