Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение

высшего образования

«Красноярский государственный медицинский университет

имени профессора В.Ф. Войно - Ясенецкого»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

Фармацевтический колледж

**КУРСОВАЯ РАБОТА**

Тема: Значение и методы определения пресепсина в крови.

по специальности 31.02.03 Лабораторная диагностика

ПМ 03. Проведение лабораторных биохимических исследований

МДК 03.01 Теория и практика лабораторных биохимических исследований

Выполнил: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Курочка Е.В.

 подпись, дата

Руководитель: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Кузовникова И.А.

 подпись, дата

Работа оценена: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

 (оценка, подпись преподавателя)

 Красноярск, 2018

Оглавление

[**Введение** 3](#_Toc528096290)

[**Глава 1. Общая характеристика пресепсина.** 4](#_Toc528096291)

[1.1 Строение пресепсина 4](#_Toc528096292)

[1.2 Функции 4](#_Toc528096293)

[**Глава 2. Клинико-диагностическое значение пресепсина.** 5](#_Toc528096294)

[2.1 Отклонение пресепсина. 5](#_Toc528096295)

[2.2 Клинические проявления. 7](#_Toc528096296)

[**Глава 3. Методы исследования пресепсина.** 8](#_Toc528096297)

[3.1 Преаналитический этап. 8](#_Toc528096298)

[3.2. Метод определения 10](#_Toc528096299)

[**Заключение** 13](#_Toc528096300)

# **Введение**

**Пресепсин (ПСП)** - это циркулирующий белок, концентрация которого в крови быстро возрастает при развитии системных инфекций, сепсиса, тяжелого сепсиса и септического шока. Научный обзор, посвященный пресепсину (ПСП) — новому и весьма перспективному маркеру сепсиса. Рассматриваются патофизиологический механизм образования пресепсина при активации макрофагов и при фагоцитозе и связь уровней ПСП с тяжестью сепсиса.

Актуальность проблемы сепсиса, несмотря на достижения современной медицины в борьбе с госпитальными инфекциями, остаётся одной из наиболее сложных клинических проблем. Основными причинами повышенного внимания к данной проблеме является: высокая частота возникновения сепсиса, высокая летальность и значительный экономический эффект, причиняемый этим заболеванием.

Согласно данным, полученным в результате европейских эпидемиологических исследований (SOAP, EPIC-II), инфекцию на момент поступления в ОРИТ имели 37,4 и 51% больных соответственно. В России количество больных, находящихся в ОРИТ с инфекцией различной локализации, составляет 34,1%. Летальность при сепсисе остаётся очень высокой, достигая более чем 30% случаев при тяжёлом сепсисе и более 50% при септическом шоке.

 **Цель:** изучение общей характеристики пресепсина и методы его исследования.

**Задачи:**

1) изучить общую характеристику и отклонения пресепсина

2) изучить методы определения пресепсина

Объект исследования: плазма крови

Предмет исследования: изменения показателей крови при сепсисе

Место реализации: Фармацевтический колледж

Срок выполнения работы:

# **Глава 1. Общая характеристика пресепсина.**

## ***Строение пресепсина***

Пресепсин (ПСП) - это циркулирующий белок, концентрация которого в крови быстро возрастает при развитии системных инфекций, сепсиса, тяжелого сепсиса и септического шока.

Специальные эксперименты показали, что воспаление, индуцированное у кроликов с помощью препаратов ЛПС, не содержащих бактерий, не сопровождалось повышением уровня ПСП в крови, а сепсис, вызванный перевязкой и пункцией слепой кишки (cecal ligation and puncture – CLP) и инфицированием жизнеспособными бактериями, вызывал существенный рост концентрации ПСП. Это привело к пониманию того, что для образования ПСП лейкоцитами одного лишь действия эндотоксина недостаточно, необходима активация фагоцитоза. Дальнейшие исследования показали, что факторы, стимулирующие фагоцитоз, активируют и образование ПСП, а ингибирующие факторы, напротив, подавляют его образование. Таким образом – ПСП – это гуморальный фактор, специфичный для фагоцитоза.

Результаты модельных опытов на животных позволяют полагать, что в образовании ПСП большую роль играют лизосомальные протеазы. Под действием провоспалительных агентов), образование пресепсина в гранулоцитах кролика не индуцировалось, но ускорялось при прибавлении жизнеспособных клеток Escherichia coli. Это еще подтверждает, что укороченный пресепсин образуется в ходе фагоцитоза. Действительно, ингибиторы фагоцитоза (цитохалазин D и вортоманин) угнетали образование ПСП, а протеаза (катепсин D) способствовала образованию ПСП из CD14 in vitro. Полагают, что «механизм индукции ПСП зависит от фагоцитоза, и катепсин D является одним из ферментов, фрагментирующим пресепсин. Такой механизм – очевидное указание на
путь образования укороченного пресепсина у септических пациентов».

     Как уже говорилось, индукция ПКТ следует за пиковым уровнем провоспалительных цитокинов. Как оказалось (рис. 2), после перевязки и пункции слепой кишки у кроликов уровень ПСП начинает повышаться через 1,5 ч, а синтез цитокина ИЛ-6 – через 3 ч. Уровень ПСП достигал максимума через 3 ч, а уровень ИЛ-6 — через 7 ч (33). Таким образом, уровни ПСП резко возрастают еще до повышения концентрации ИЛ-6, а уровни ПКТ — после пика ИЛ-6, то есть концентрация ПСП характеризует фагоцитоз, а концентрация ИЛ-6 – воспаление. Поскольку ПСП – это гуморальный белок, выделяющийся при фагоцитозе, определение его уровня может применяться и для научных исследований, направленных, в частности, на выявление:

Дальнейшие международные исследования, в том числе и многоцентровые, показали, что:

1) механизм повышения уровней пресепсина принципиально отличен от механизма повышения таких провоспалительных маркеров, как ФНО-альфа, ИЛ-6, ИЛ-10, прокальцитонин, С-реактивный белок;

2) при индукции системных воспалений повышение пресепсина происходит:

а) до повышения указанных маркеров

б) быстрее, чем повышение других маркеров сепсиса.

Уровни ПСП четко отражают тяжесть сепсиса и соответствуют показателям степени тяжести критических пациентов, определяемым согласно шкалам APACHE II, SOFA, MEDS; при мониторинге терапии сепсиса ПСП быстро (в течение часов) снижается или повышается и, в отличие от других маркеров:

а) отражает реальную динамику сепсиса;

б) прогнозирует исходы

в) даже при снижении тяжести клинических симптомов сепсиса (ремиссии), тем не менее, в отличие от других маркеров, прогнозирует его рецидивы.

## ***1.2 Функции***

Функции белков крови:

1. Создают онкотическое давление. Оно необходимо для удержания воды в кровяном русле.
2. Участвуют в свертывнии крови.
3. Образуют буферную систему (белковый буфер)
4. Транспортируют в крови плохорастворимые в воде вешества (липиды, металлы 2 и более валентности)
5. Учавствуют в иммунных процессах
6. Образуют резерв аминокислот, который используется, например, при белковом голодании
7. Катализируют некоторые реакции (белки-ферменты)
8. Определяют вязкость крови, влияют на гемодинамику
9. Участвуют в реакциях восполения.

# **Глава 2. Клинико-диагностическое значение пресепсина.**

## ***2.1 Отклонение пресепсина.***

Научный обзор, посвященный пресепсину (ПСП) — новому и весьма перспективному маркеру сепсиса. Рассматриваются патофизиологический механизм образования пресепсина при активации макрофагов и при фагоцитозе и связь уровней ПСП с тяжестью сепсиса. Основная цепь событий, ведущих к синтезу ПСП, такова;

а) мембранный рецептор моноцитов / макрофагов mCD14 после связывания с эндотоксинами активирует провоспалительный ответ и затем,

б) отщепляется от макрофагов и в растворимой форме (как sCD14) выходит в циркуляцию,

в) после активации фагоцитоза лизосомальные протеиназы расщепляют sCD14 с образованием фрагмента sCD14-ST, который получил название пресепсин.

  Гемокультуру часто считают «золотым стандартом» в диагностике сепсиса. Однако ее результат поступает, как правило, через 3 — 7 дней. Более того, из-за применения антибиотиков, предшествовавшего взятию крови, гемокультура часто дает ложноотрицательный результат.

Пресепсин (ПСП) новый маркер, концентрация которого быстро возрастает при развитии сепсиса. ПСП – это белок (молекулярная масса 13 КДа), который является N-концевым фрагментом рецептора макрофагов CD14. CD14 – это белок, существующий в двух формах:

1.  связанный с мембраной (mCD14) и присутствующей на поверхности макрофагов, моноцитов и гранулоцитов;

2.  растворимый (sCD14), циркулирующей в кровотоке.

## ***2.2 Клинические проявления.***

Многочисленные исследования показывают, что ПСП является специфическим маркером сепсиса и быстро повышается в ответ на повышение его тяжести. При воспалительных процессах, не связанных с фагоцитозом, ПСП не повышается. Поскольку ПСП – это гуморальный фактор, выделяемый фагоцитами при фагоцитозе, его использование весьма перспективно не только для диагностики и мониторинга сепсиса, но и для научных исследований, включающих выявление факторов, стимулирующих или ингибирующих фагоцитоз при различных патологиях, а также для поиска (скрининга) препаратов, влияющих на фагоцитоз.

     *Сепсис* – инфекция (подтвержденная, например, результатами микробиологических посевов) в сочетании с ССВО. Это одна из форм инфекционных заболеваний и любой тест помогает лишь в установлении либо этиологии этой инфекции, либо в уяснении состояния различных органов и систем

     *Тяжелый сепсис* – сепсис в сочетании с множественной органной дисфункцией, гипоперфузией либо гипотензией (гипоперфузия сопровождается, но не ограничивается, лактацидозом, олигурией или нарушениями сознания).

  *Септический шок* – вызванная сепсисом гипотензия (имеющая место, несмотря на адекватное восполнение жидкости) и признаки гипоперфузии органов и тканей.

Установлено, что ПСП повышается при инфекции и специфически продуцируется при сепсисе, связанном с грамотрицательными и грамположительными бактериями, грибками. В случае вирусных инфекций ПСП не продуцируется.

Не смотря на многие годы активных исследований в поиске эффективной терапии, основным способом лечения септических осложнений по-прежнему остается поддержка систем органов, антибактериальная терапия и/или хирургическое вмешательство. Важны фактом для снижения летальности этих пациентов, является экспресс-диагностика септических осложнений.

Клинические признаки воспаления были известны много сотен лет назад от Галена и Цельса, описывающих 4 критерия:

1. Переферическая вазодилатация
2. Лихорадка
3. Боль
4. Покраснение или повышение капиллярной проницаемости.

Гораздо позднее описали синдром сесписа как клинические признаки инфекции плюс наличие гипотермии (температура тела менее 36⁰С) или гипертермии (более 38⁰С), тахикардии (более 90 ударов в минуту), учащенного дыхания (более 20 дыхательных движений в минуту) и обнаружение, по крайней мере, одного органа-мишени, демонстрирующего недостаточную префузию или дисфункцию, недостаточно выраженные или измененные церебральные функции, гипоксемию (PaO2 < 75 мм рт.ст. при комнатной температуре), повышение уровня лактата плазмы – боле 1,5-2 мг-экв/л или олигурия ( диурез <30 мл/кг массы тела/ч).

Позднее, типичные клинические признаки (лихорадка, тахикардия, тахипноэ) совместно с повышенным уровнем количества лейкоцитов стали известны как критерии синдрома системной воспалительной реакции (ССВР), которые широко использовались для диагностики сепсиса в сочетании с подтвержденной инфекцией или подозрением на нее. Однако ни один из 4 критериев не является специфичным при сепсисе и, следовательно, мало информативен для диагностики.

Согласно данным, полученным в результате европейских эпидемиологических исследований (SOAP, EPIC-II), инфекцию на момент поступления в ОРИТ имели 37,4 и 51% больных соответственно. В России количество больных, находящихся в ОРИТ с инфекцией различной локализации, составляет 34,1%. Летальность при сепсисе остаётся очень высокой, достигая более чем 30% случаев при тяжёлом сепсисе и более 50% при септическом шоке.

# **Глава 3. Методы исследования пресепсина.**

## ***3.1 Преаналитический этап.***

Преаналитический этап исследования обмена белков. Для характеристики обмена белков можно определять различные показатели (общий белок, белковые фракции, мочевину, билирубин и т.д.) в цельной крови (капиллярной и венозной), сыворотке, плазме, моче, спиномозговой жидкости. При заборе, хранении и транспортировке биологического материала нужно соблюдать ряд общих требований. Подготовка обследуемых:

• Забор крови делают утром с 8 до 10 часов утра. В экстренных случаях взятие крови осуществляется в любое время дня.

 • Кровь берут натощак, после 8-12-часового голодания.

• Воздержание от приема алкогольных напитков не менее 24 часов.

• Исключается физическое напряжение.

**Получение и хранение биологического материала**:

• Для исследований используют чистую сухую посуду без следов моющих средств.

• Желтушные, гемолизированные, хилезные сыворотка или плазма не пригодны для исследования.

• Для получения плазмы венозную кровь собирают в чистую, сухую пробирку с антикоагулянтом. Соли ЭДТА, гепарин, гепаринат лития, оксалат натрия, цитраты снижают результаты. Центрифугирование проводят в обычном режиме не позднее 5 часов от забора материала.

• Для получения сыворотки крови венозную кровь собирают в чистую, сухую пробирку. Центрифугирование проводят в обычном режиме не позднее 5 часов от забора материала.

• Для исследования мочи используют утреннюю порцию. В экстренных случаях можно исследовать любую порцию мочи. Исследование проводят не позднее, чем через 2 часа после взятия пробы.

 Условия хранения биологического материала:

 • Биологический материал хранят в хорошо закрытых контейнерах.

• Цельная кровь не пригодна для хранения, даже в присутствии консервантов.

• Плазму и сыворотку можно хранить 1 день при комнатной температуре, 7 дней при 4-8°С, от 3 до 6 месяцев при –20 °С. В закрытых сосудах белок стабилен в моче 2 дня при комнатной температуре, до 17 дней в холодильнике (4-8° С). Примечания:

• уровень общего белка может зависеть от возраста (у детей и пожилых ниже), пола (у мужчин выше), характера питания.

• Повышение белков в крови вызывают следующие факторы: длительное пребывание в вертикальном положении, стресс, прием алкоголя, некоторые лекарственные препараты (цефотаксим, фуросемид, фенобарбитал, преднизалон, прогестерон).

• Понижение уровня белков в крови вызывают: травма, курение, беременность, голодание, перерыв в приеме алкоголя, нарушение питания, ожирение, некоторые лекарственные препараты (декстран, ибупрофен, пероральные контрацептивы)

## ***3.2. Метод определения***

Иммунохемилюминисценция – количественный

ПСП быстро диагностирует:

* Локальную инфекцию,
* Сепсис,
* Сепсический шок и дифференцирует их от синдрома системного воспалительного ответа (ССВО), не связанного с инфекциями.

ПСП не повышается при:

* Воспалениях, не связанных с фагоцитозом,
* ССВО,
* Вирусной инфекции,
* Тепловом шоке и лихорадке

Референтные уровни: были определены на пробах ЭДТА-плазмы у 119 здоровых лиц в возрасте от 21 до 69 лет (59 мужчин и 60 женщин). Средний уровень составил: 160 пг/мл (95% интервал: 48-171 пг/мл); 95-ая процентиль: 320 пг/мл

Таблица 1.

|  |  |
| --- | --- |
| Диапазон измерения | 20-20000 пг-мл |
| Корреляция результатов по цельной крови и ЭДТА-плазме | у=1,04х-10,8; г=0,986; n= 104(у: цельная кровь с ЭДТА, х: ЭДТА-плазма) |
| % CV в плазме | QC-LL=4.4%, QC-L=4.0%, QC-M=3.8%, QC-H=5.0% |

 Мониторинг заболевания: Уровни пресепсина измерялись у пациентов в момент поступления в стационар и через 24-72 часа после поступления. У ациентов с благоприятным 30 дневным исходом заболевания (n=104) уровни пресепсина снижались до базовых к 72 часам. У пациентов с неблагоприятным исходом (n=36) уровни пресепсин имели тенденцию к росту.

Средние значения уровней пресепсина (погрешность 95%) у пациентов с неблагоприятными и благоприятными исходами.

Интерпретация результатов

Таблица 2.

|  |  |
| --- | --- |
| Уровни ПСП | Диагноз |
| < 200 пг/мл | Сепсис исключен. Чувствительность = 96,0% ; специфичность =81,5%, ппз=69,4%; ОПЗ=98,0% (превалентность 30%) |
| 200-299 пг/мл | Систематическая инфекция маловероятна |
| 300-499 пг/мл | Систематическая инфекция возможна |
| 500-999 пг/мл | Уменьшенный риск развития системной инфекции (тяжелого сепсиса)Повышенный риск неблагоприятного исхода |
| ≥1000 пг/мл | Высокий риск развития системной инфекции (тяжелого сепсиса/сепсического шока)Высокий риск 30-дневной смертности, сравнимый с риском по шкале APACHE≥25 |

Количественный результат за 15 минут

Определение пресепсина у 140 сепсических больных при поступлении в отделение неотложной помощи показало следующие значения:

Таблица 3.

|  |  |
| --- | --- |
| Тяжесть сепсиса | Уровни ПСП (пг/мл) |
| <200 | <300 | <500 | <1000 | ≥1000 |
| Количество случаев (процент от общего числа) |
| Сепсис  | 3 (3,5%) | 12 (14,1%) | 30 (35,3%) | 59 (42,1%) | 26 (30,6%) |
| Тяжелый сепсис | 0 | 0 | 5 (12,5%) | 16 (40,0%) | 24 (60,0%) |
| Сепсический шок | 0 | 0 | 0 | 4 (26,7%) | 11 (73,3%) |
| Все пациенты | 3 (2,1%) | 12 (8,6%) | 35 (25,0%) | 79 (56,4%) | 61 (43,6%) |
| Смертность  | 0 | 0 | 0 | 5 (21,7%) | 18 (78,3) |

# **Тест-система для определения пресепсина «PARTHFAST Presepsin»**

Характеристики теста:

* Диапазон измерения 20-20000 пг/мл
* Аналитическая чувствительность: < 20 пг/мл
* Точность измерений (КВ):

- Внутритестовая (контроль очень низкого уровня- 4,4%, низкого уровня – 2,9%; среднего уровня – 3,2%; высокого уровня – 3,9%).

- Межтестовая (контроль очень низкого уровня- 4,4%, низкого уровня – 3,0%; среднего уровня – 3,8%; высокого уровня – 5,0%).



***Необходимые материалы и оборудование***

Анализатор PATHFASTTM и расходные материалы

Пресепсин Контроль PATHFAST

***Принцип анализа***

Процедура проведения анализа основана на методе хемилюминесцентного иммуноферментного анализа с использованием технологии MAGTRATION®. В этой процедуре поликлональные антитела к пресепсину, связанные со щелочной фосфатазой, и моноклональные антитела к пресепсину на магнитных частицах смешиваются с образцом. Пресепсин образца связывается с антителами к нему, образуя иммунокомплекс с меченым ферментом антителами и антителами на магнитных частицах. После удаления несвязавшегося материала к иммунному комплексу добавляется хемилюминесцентный субстрат. После короткой инкубации под воздействием ферментной реакции в смеси начинается люминесценция, интенсивность которой зависит от концентрации пресепсина в образце. Расчет результата проводится по стандартной калибровочной кривой.

\*MAGTRATION® - технология разделения B/F (связанного/свободного материала) с промывкой магнитных частиц в наконечниках. Технология является зарегистрированной торговой маркой Precision System Science.

***Меры предосторожности***

Картриджи с реагентами:

1. Не использовать реагенты по окончании срока хранения.
2. Не использовать картриджи повторно, это одноразовые расходные материалы.
3. Не снимать алюминиевую фольгу с картриджа.
4. Держать картридж только за край и не касаться пальцами алюминиевого покрытия и черной счетной лунки.
5. Не пользоваться поврежденными картриджами.
6. Не использовать реагенты, хранившиеся при комнатной температуре.
7. Избегать попадания слюны в черную счетную лунку.
8. Избегать загрязнения реагентов и их экспозиции на прямом солнечном свету.
9. При некоторых условиях хранения и транспортировки может наблюдаться слипание алюминиевого покрытия картриджей. Если такое наблюдается, аккуратно разделите картриджи на столе.
10. Азид натрия, содержащийся в реагентах, может вступать в реакцию с медью и свинцом в водопроводных системах с образованием взрывоопасных солей. Содержание этого вещества в реагентах крайне мало, но, тем не менее, при утилизации азид-содержащих материалов, они должны смываться большим количеством воды.
11. Утилизировать отходы в соответствии с национальными правилами утилизации биологических отходов. Соблюдать общие меры предосторожности и обращаться со всеми компонентами как с потенциально инфекционными агентами.

# **Заключение**

Пресепсин - это гуморальный белок, выделяемый в циркуляцию фагоцитами при фагоцитозе. Он может служить новым высокоспецифичным и высокочувствительным маркером сепсиса, поскольку раньше и быстрее, чем другие известные маркеры, отражает его динамику. Определение уровня ПСП весьма эффективно для ранней диагностики сепсиса, его мониторинга и прогнозирования неблагоприятных исходов. Использование пресепсина перспективно и для научных исследований, направленных на выяснение факторов, влияющих на фагоцитоз и на поиск соответствующих препаратов.

**Перечень используемых ресурсов.**

1. <http://www.labtechperm.ru/spex/medical-articles/presepsin-novyy-vysokoeffektivnyy-marker-sepsisa/>
2. <https://docplayer.ru/37799991-Laboratornaya-tochnost-ekspress-analizov.html>
3. Тест-система для определения Пресепсина PATHFAST.
4. <http://www.presepsintest.ru/upload/iblock/e7c/e7c6516b7ec0cba30fcc2a5a6679ccbf.pdf>