

## Методы определения бактериального эндотоксина в медицине критических состояний (обзор)

М. Н. Копицына<sup>1</sup>, А. С. Морозов<sup>1</sup>, И. В. Бессонов<sup>1</sup>, В. М. Писарев<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> АО Перспективные медицинские технологии,  
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1/75Г

<sup>2</sup> НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского ФНКЦ реаниматологии и реабилитологии,  
Россия, 107031, г. Москва, ул. Петровка, д. 25, стр. 2

<sup>3</sup> Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора,  
Россия, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 4

## Methods for Detection of Bacterial Endotoxin in Critical Care Medicine

Maria N. Kopitsyna<sup>1</sup>, Alexey S. Morozov<sup>1</sup>, Ivan V. Bessonov<sup>1</sup>, Vladimir M. Pisarev<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Joint-Stock Company Perspektivnye meditsinskie tekhnologii,  
1/75G Leninskiye gory, Moscow 119234, Russia

<sup>2</sup> V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology,  
Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitation,  
25 Petrovka Str., Build. 2, Moscow 107031, Russia

<sup>3</sup> Central Research Institute of Epidemiology, Rospotrebnadzor,  
<sup>4</sup> Novogireevskaya Str., Moscow 111123, Russia

В обзоре рассмотрены методы определения бактериальных эндотоксинов в водных растворах и биологических жидкостях. Основное внимание уделено определению содержания эндотоксинов как клинически значимых биомаркеров сепсиса, вызванного грамотрицательными бактериями. Обсуждены достоинства и недостатки каждого метода и приведены сравнительные характеристики используемых в настоящее время в клинической практике тест-систем.

*Ключевые слова:* бактериальный эндотоксин; липополисахарид; грамотрицательные бактерии; сепсис; ЛАЛ-тест; анализ активности эндотоксина; метод активированных частиц

Dedicated to reviewing the methods for detecting bacterial endotoxin in aqueous solutions and biological fluids, this review is focused on determining the content of endotoxin as a clinically relevant biomarker of sepsis caused by Gram-negative bacteria. The advantages and disadvantages of each method are described, and the characteristics of test systems currently used in clinical practice are listed and compared.

*Keywords:* Bacterial endotoxin; lipopolysaccharide; Gram-negative bacteria; sepsis; LAL-test, endotoxin activity assay, method of activated particles

DOI:10.15360/1813-9779-2017-5-109-120

### Список сокращений

БЭ — бактериальный эндотоксин  
ЛПС — липополисахарид  
ЛАЛ-тест — Limulus Amebocyte Lysate тест  
ЕАА — анализ активности эндотоксина (Endotoxin Activity Assay)  
МАЧ — метод активированных частиц  
ЕЭ — единицы эндотоксина

### List of abbreviations

BE — bacterial endotoxin  
LPS — lipopolysaccharide  
LAL-test — Limulus Amebocyte Lysate test  
EAA — Endotoxin Activity Assay  
MAP — method of activated particles  
EU — endotoxin unit

### Introduction

The term «bacterial endotoxin» (BE) was introduced for the first time in the 19th century to describe the components of Gram-negative bacteria responsible for the emergence of the pathophysiological re-

Впервые термин бактериальный эндотоксин (БЭ) был введен еще в XIX веке для описания компонентов грамотрицательных бактерий, ответ-

### Введение

#### Адрес для корреспонденции:

Владимир Писарев  
E-mail: [vpisarev@gmail.com](mailto:vpisarev@gmail.com)

#### Correspondence to:

Vladimir Pisarev  
E-mail: [vpisarev@gmail.com](mailto:vpisarev@gmail.com)

ственных за возникновение патофизиологических реакций при грамотрицательных инфекциях. Благодаря развитию инструментальных методов анализа в середине XX века химическая структура и биологические свойства БЭ были определены более точно [1]. Присутствующий во внешней мембране всех грамотрицательных бактерий БЭ при попадании в кровеносную систему человека способен вызвать сильный воспалительный ответ, в тяжелых случаях приводящий к развитию септического шока с высокой вероятностью летального исхода. Своевременность количественного или полуколичественного определения БЭ в крови и других физиологических жидкостях организма в настоящее время относятся к ключевым факторам ранней диагностики сепсиса и условием назначения более «точного» лечения, включая персонализированное применение экстракорпоральных методов лечения сепсиса [2].

#### Структура бактериального эндотоксина.

БЭ представляет собой молекулы липополисахарида (ЛПС), экспрессированные на наружной клеточной стенке грамотрицательных бактерий. Общая химическая структура молекул ЛПС большинства бактерий сходная: они содержат полярный гетерополисахаридный (О-антиген), внутренний олигосахаридный и липидный (липид А) фрагменты [3, 4] (рис. 1).

О-антиген — наименее консервативная часть молекулы ЛПС; он представляет собой полярный гетерополисахаридный фрагмент, степень разветвленности и присутствие тех или иных моносахаридов в котором зависит от вида бактерий [5, 6]. Центральный олигосахаридный фрагмент состоит из внешней и внутренней части. Внешняя часть, также как и фрагмент О-антигена, не является консервативной и представляет собой остатки

actions in Gram-negative infections. Due to the progress in development of instrumental methods of analysis in the middle of the 20<sup>th</sup> century, the chemical structure and biological characteristics of BE have been clarified [1]. BE is expressed in the outer membrane of all Gram-negative bacteria. The BE molecules are capable to induce a potent inflammatory response after entering the human bloodstream, in severe cases leading to the development of septic shock with a high probability of a lethal outcome. A timely quantitative or semi-quantitative determination of BE in the blood and other body fluids is currently one of the key factors for early diagnosis of sepsis and a basis for prescription of a more appropriate treatment, including personalized approaches to extracorporeal treatment of sepsis [2].

**Structure of bacterial endotoxin.** BE represents lipopolysaccharide (LPS) molecules of the outer cell wall of Gram-negative bacteria. The general chemical structure of LPS molecules of most bacteria is similar: they contain polar heteropolysaccharide (O-polysaccharide chain), internal oligosaccharide, and lipid (lipid A) fragments [3, 4] (Fig. 1)

The O-polysaccharide chain is the least conservative part of the LPS molecule; it constitutes a polar heteropolysaccharide fragment, the degree of branching and presence of certain monosaccharides in which depends on the type of bacteria [5, 6]. Central oligosaccharide fragment consists of external and internal parts. The external part, as well as a fragment of the polysaccharide are not conservative and represented by residues of six-membered sugars, which numbers may vary from 8 to 12 [5].

The inner part of the oligosaccharide fragment contains heptoses and at least one residue of 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid. Lipid A is the

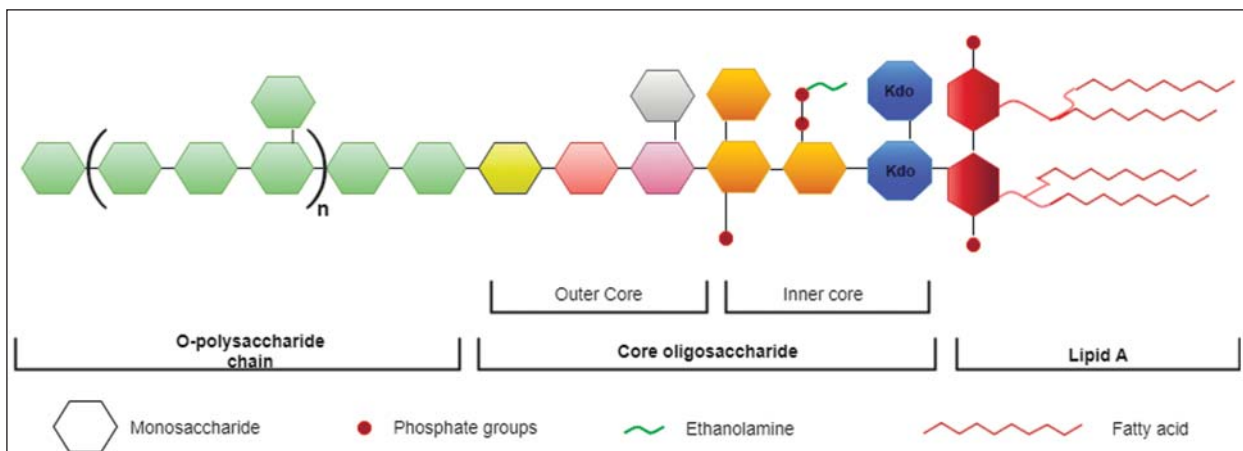


Рис. 1. Общая химическая структура ЛПС.

Fig. 1. Chemical structure of LPS.

**Примечание.** O-polysaccharide chain — О-антиген; для рис. 1, 2: Core oligosaccharide — внутренний олигосахаридный фрагмент; Lipid A — липид А. Outer Core — внешняя часть; Inner core — внутренняя часть; Monosaccharide — моносахарид; Phosphate groups — фосфатные группы; Ethanolamine — этаноламин; Fatty acid — жирные кислоты.

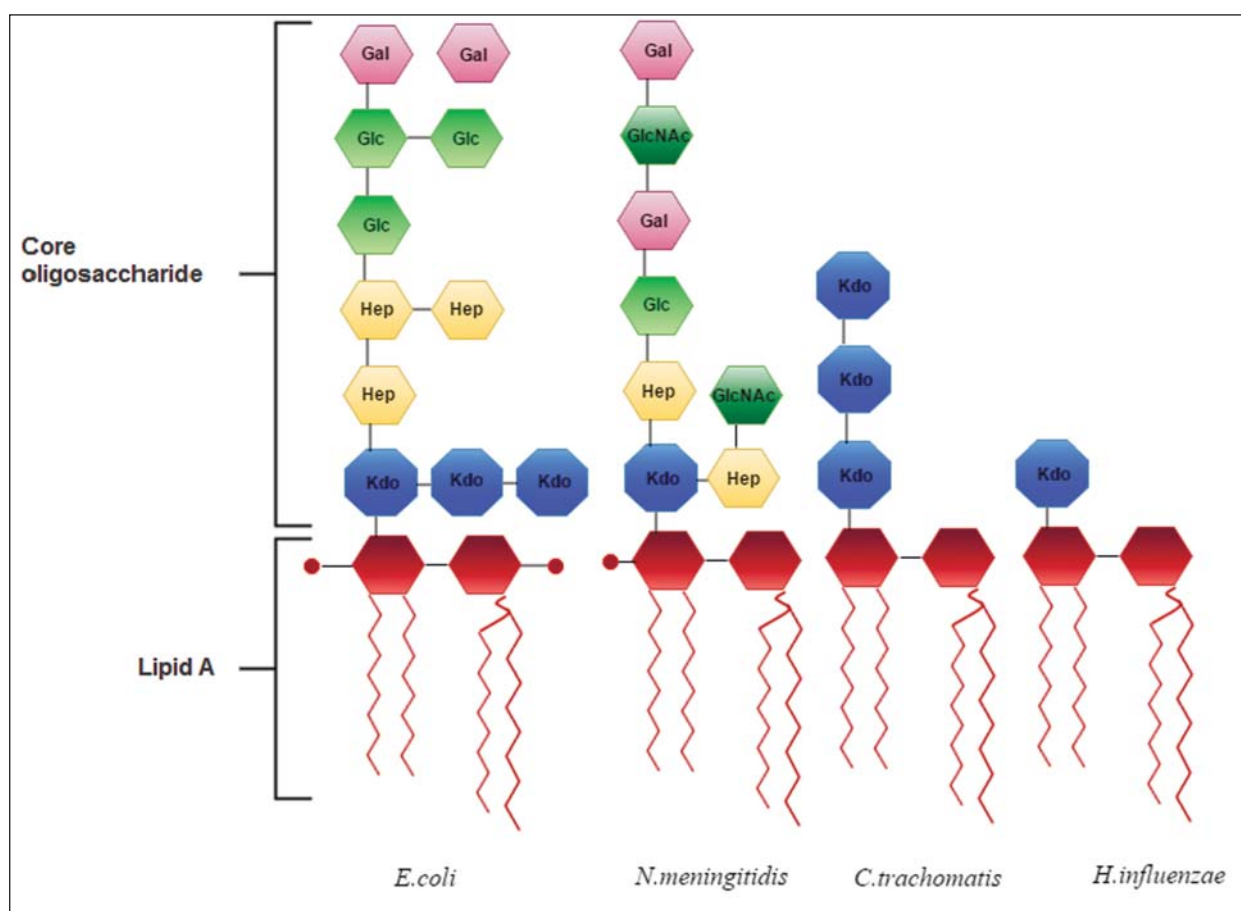


Рис. 2. Примеры строения внутреннего олигосахаридного фрагмента для различных грамотрицательных бактерий.  
Fig. 2. Core oligosaccharide structure of different gramnegative bacteria.

шестичленных сахаров, количество которых может варьировать от 8 до 12 [5].

Во внутренней части олигосахаридного фрагмента содержатся гептозы и не менее одного остатка 3-дезоксид-D-манно-окт-2-улозоновой кислоты (рис. 2). Липид А — наиболее консервативная часть молекулы ЛПС, представляющая собой уникальный фосфорилированный гликолипид [7].

**Токсичность бактериального эндотоксина.** БЭ высвобождается при разрушении стенок бактерий, после чего может проникать в различные жидкие среды организма (кровь, спинномозговую жидкость, мокроту и др.). Попадание в кровь БЭ особенно опасно, и при этом стоит отметить, что у разных видов животных чувствительность по отношению к БЭ неодинакова [8]. Циркуляция эндотоксина в крови приводит к различным патофизиологическим эффектам, ухудшающим состояние и в значительной мере определяющим тяжесть клинического состояния пациента. Считается, что в развитие тканевой гипоксии, приводящей к полиорганной недостаточности при сепсисе и септическом шоке, вносят существенный вклад молекулы ЛПС, способные нарушать эндотелий сосудов (ЭС) как непосредственно, так и

most conservative part of the LPS molecule representing the unique phosphorylated glycolipid [7].

**Toxicity of bacterial endotoxin.** BE is released on destruction of bacterial walls, and then it can penetrate into various body fluids (blood, cerebrospinal fluid, bronchial mucus, and urine). The BE penetration into the blood is significantly dangerous, and it should be noted that the sensitivity to BE varies in different animal species [8]. The circulation of endotoxin in blood leads to various pathophysiological effects, worsening the condition and largely determining the severity of patients' clinical condition. It is believed that LPS molecules capable of impairing the vascular endothelium (VE) significantly contribute, both directly and indirectly, to the development of tissue hypoxia leading to multiple organ failure in sepsis and septic shock by activating neutrophils aggregating on the VE surface. Therefore, the detection of BE in the circulation seems obligatory for personalization of treatment of life-threatening conditions in sepsis [9, 10].

**Test methods for detection of bacterial endotoxin.** There are four main ways to detect bacterial endotoxin to date:

опосредованно, активируя нейтрофилы, агрегирующие на поверхности ЭС. Поэтому определение БЭ в циркуляции необходимо для персонализации лечения жизнеугрожающих состояний при сепсисе [9, 10].

**Методы определения бактериального эндотоксина.** На данный момент существует четыре основных способа определения бактериального эндотоксина:

1) Определение пирогенности на кроликах — установление всех пирогенов, включая эндотоксины [11];

2) ЛАЛ тест (Limulus Amebocyte Lysate Test) — тест, позволяющий определять бактериальные эндотоксины (не пирогены как таковые) [12] и его различные аналоги, в частности, PyroGene™ [13], EndoLisa® и EndoZyme® [14, 15];

3) ЕАА (Endotoxin activity assay) — позволяет проводить анализ активности эндотоксина в крови пациента [16];

4) МАЧ-Endotox (метод активированных частиц) [17] — позволяет полу-количественно определять как эндотоксины отдельных видов бактерий, так и их суммарное содержание.

#### **Определение пирогенности на кроликах.**

Долгое время о наличии эндотоксинов в крови судили по пирогенности в тесте на кроликах. Пирогенность раствора определяли путем введения его в кровь животного и наблюдения за изменением температуры тела [18]. Повышение температуры выше допустимой нормы указывало на наличие во вводимом растворе, содержащем компоненты крови больного, пирогенных примесей — предположительно, БЭ. Впервые этот тест был официально рекомендован Фармакопеей США в 1942 г. Главный недостаток — невозможность количественной оценки содержания БЭ [19].

**ЛАЛ-тест.** ЛАЛ-тест или Limulus Amebocyte Lysate (LAL) — качественный и количественный метод определения уровня эндотоксина, основанный на реакции *in vitro* между БЭ и ЛАЛ-реактивом. Тест впервые предложен в 1968 г. [20]. Определение содержания БЭ с помощью ЛАЛ-теста возможно в различных жидких средах, включая кровь и плазму. Впервые этот метод был включен в Фармакопею США в 1985 г. как предназначенный для определения бактериальных эндотоксинов [21]. Следует отметить, что эндотоксины различных видов бактерий отличаются по своей активности в ЛАЛ-тесте по сравнению с определением пирогенности на кроликах [22].

Существует несколько модификаций ЛАЛ-теста. Среди них гель-тромб тест, хромогенный тест (кинетический и по конечной точке), а также турбодиметрический ЛАЛ-тест (кинетический и по конечной точке).

Идея метода заключается в том, что фермент фактор С, содержащийся в лизате амебоцитов ме-

1) the pyrogenicity test in rabbits helps determine all the pyrogens, including endotoxins [11];

2) LAL test (Limulus Amebocyte Lysate Test) is a test that allows to detect bacterial endotoxins (not pyrogens, as such) [12] and its various analogues, in particular, PyroGene™ [13], EndoLisa® and EndoZyme® [14, 15];

3) EAA (Endotoxin activity assay) allows to analyze the activity of endotoxin in patient's blood [16];

4) MAP-Endotox (method of activated particles) [17] allows to carry out a semi-quantification test for both endotoxins of individual bacterial species and their total content.

**Pyrogenicity test in rabbits.** The presence of endotoxins in the blood has been assessed based on the pyrogenicity test in rabbits for a long time. The pyrogenicity of a solution was determined by injecting it into the bloodstream of an animal and monitoring the body temperature [18]. The temperature rise above the reference limits indicated the presence of pyrogenic impurities, presumably, BE in the injected solution containing components of patient's blood. For the first time, this test was officially recommended by the United States Pharmacopoeia in 1942. The principal disadvantage of the test is the inability to accurately quantify the content of BE [19].

**LAL test.** LAL-test or Limulus Amebocyte Lysate test (LAL) is a qualitative and quantitative method for the determination of endotoxin levels, based on *in vitro* reaction between BE and the LAL reagent. The test was introduced for the first time in 1968 [20]. The detection of BE using the LAL-test is possible in various body fluids including blood and plasma. For the first time, this method was included in the United States Pharmacopoeia in 1985 as a test for bacterial endotoxins [21]. It should be noted that endotoxins of different kinds of bacteria differ in their activity in the LAL-test as compared to the pyrogenicity test in rabbits [22].

There are several modifications of the LAL-test. They include the gel-clot test, the chromogenic test (kinetic and endpoint procedure), as well as turbidimetric LAL-test (kinetic and endpoint procedure).

The concept of the method is that the enzyme factor C contained in the limulus amebocyte lysate (*Limulus polyphemus*) (LAL-reagent), reacts only with BE, thus triggering a cascade of enzymatic reactions leading to activation of a coagulating enzyme, which eventually turns coagulogen into coagulin, that leads to the formation of gel (gel-clot and turbidimetric version of the method). Chromogenic modification of the method uses, instead of coagulogen, a chromogenic substrate hydrolyzed by the enzyme system activated in the presence of BE with the formation of a stained product (4-nitroaniline) [23].

The gel-clot test is a semi-quantitative LAL-test version. This method is based on the formation

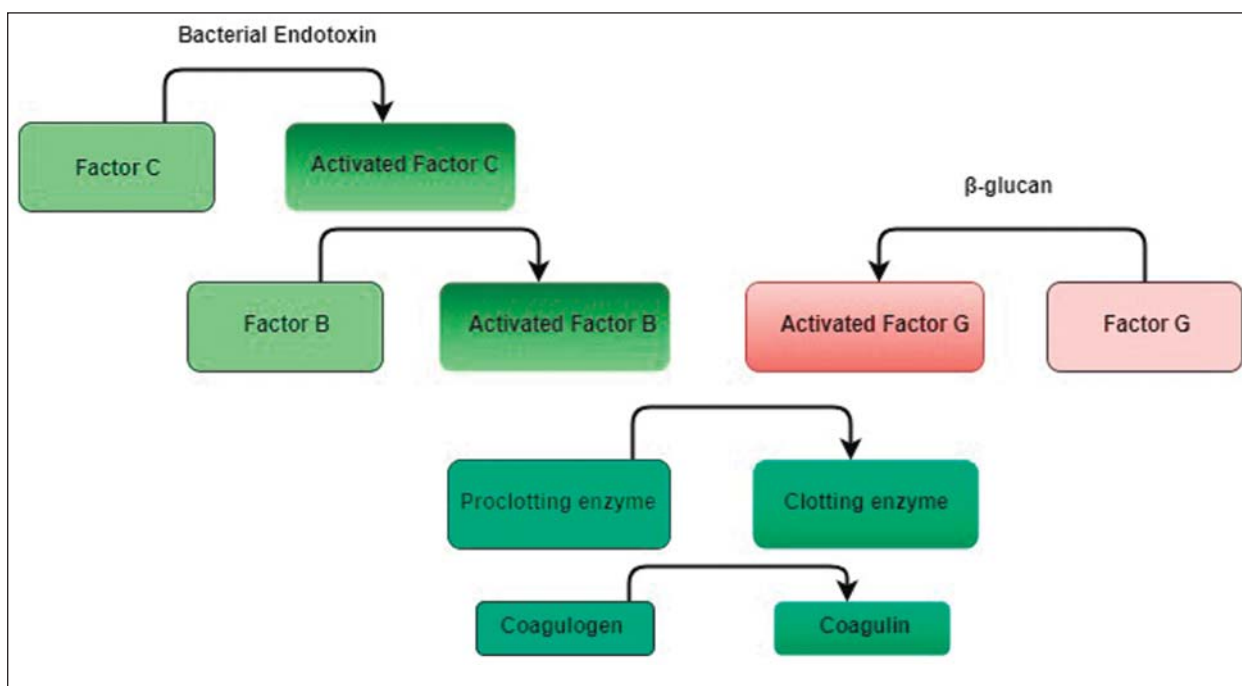


Рис. 3 Схематическое представление гель-образования в процессе ЛАЛ реакции.

Fig. 3. Schematic representation of the LAL gelation reaction.

Примечание. Bacterial Endotoxin — бактериальный эндотоксин; glucan — глюкан; Factor C (B, G) — фактор C (B, G); Activated Factor — активная форма фактора; Proclotting enzyme — профермент; Clotting enzyme — свертывающий фермент; Coagulogen — коагулоген; Coagulin — коагулин.

чехвостов *Limulus polyphemus* (ЛАЛ-реагент), реагирует практически только с БЭ, что запускает каскад ферментативных реакций, приводящий к активации свертывающего фермента, который в итоге превращает коагулоген в коагулин, что приводит к образованию геля (гель-тромб и турбодиметрический вариант метода). В случае хромогенной модификации метода вместо коагулогена используется хромогенный субстрат, который гидролизуется активированной в присутствии БЭ ферментной системой с образованием окрашенного продукта — 4-нитроанилина [23].

Гель-тромб тест — полуколичественный вариант ЛАЛ-теста. Данный метод основан на образовании твердого геля после добавления к исследуемому образцу (водному раствору или плазме крови) ЛАЛ-реактива (рис. 3). Предел обнаружения эндотоксина при таком методе составляет от 0,01 до 0,03 ЕЭ/мл (1 ЕЭ обычно соответствует 100 пг БЭ). Критерием, используемым в данном методе гелеобразования, является сохранение целостности образовавшегося в результате реакции плотного геля на дне пробирки при ее переворачивании (положительный результат). Отрицательным является результат, соответствующий отсутствию плотного геля или его мгновенному разрушению при переворачивании пробирки, что означает отсутствие бактериального эндотоксина на уровне предела чувствительности конкретного реактива. Этот метод

of solid gel after adding the LAL-reagent to the studied sample (water solution or blood plasma). The endotoxin detection limit of this method ranges from 0.01 to 0.03 EU/ml (1 EU usually corresponds to 100 pg of BE). Criterion used in this method of gelation is the preservation of the integrity of a dense gel resulting from the reaction on the bottom of the test tube when it is turned upside down (positive result). The result is considered negative, in the absence of the dense gel or its immediate destruction after turning the tube, which means that there is no bacterial endotoxin at the sensitivity limit of a specific reagent. This method is relatively inexpensive and does not require specialized equipment for its implementation. Its disadvantages include low reproducibility and low accuracy of detection of bacterial endotoxin.

The chromogenic LAL-test is based on the formation of a stained product during hydrolysis of the substrate, which only happens when the enzyme system is activated in the presence of bacterial endotoxin. In the presence of LPS, test solutions turn yellow; at that, the color intensity is proportional to the content of BE, that allows to build a calibration curve and use this method for the assay of BE. The peak sensitivity of the method is 0.005 EU/ml. To carry out the chromogenic test, equipment, allowing to determine the absorbancy of solutions is required in addition to main consumables, for example, a standard spectrophotometer or optical reader for tablets

сравнительно недорогой и не требует специального оборудования для его реализации. К недостаткам можно отнести невысокую воспроизводимость результатов и низкую точность определения бактериального эндотоксина.

Хромогенный ЛАЛ-тест основан на образовании окрашенного продукта при гидролизе субстрата, который происходит лишь при активации ферментной системы в присутствии бактериального эндотоксина. При наличии ЛПС исследуемые растворы окрашиваются в желтый цвет, причем интенсивность цвета пропорциональна содержанию БЭ, что позволяет построить градуировочную кривую и использовать данный метод для количественного анализа содержания БЭ. Максимальная чувствительность метода составляет 0,005 ЕЭ/мл. Для выполнения хромогенного теста помимо основных расходных материалов необходимо оборудование, позволяющее определять оптическую плотность растворов, например, можно использовать стандартный спектрофотометр или оптический ридер для планшетов. Неоспоримым достоинством хромогенного ЛАЛ-теста является возможность точного определения, содержания БЭ и значительно более высокая воспроизводимость метода.

Турбодиметрический ЛАЛ-тест основан на том, что при взаимодействии реактива с БЭ происходит помутнение раствора, т.е. изменяется его оптическая плотность, причем скорость изменения данного параметра напрямую зависит от количественного содержания БЭ. Как правило, критерием оценки является достижение заранее определенного порогового значения оптической плотности. Среди всех вариаций ЛАЛ-теста данный метод является наиболее чувствительным (максимальная чувствительность 0,001 ЕЭ/мл). Выполнение анализа требует наличия термостатирующего инкубатора с фотометром, позволяющего проводить непрерывное измерение оптической плотности реакционной смеси при инкубации в условиях заданной температуры.

При анализе биологических жидкостей методом ЛАЛ-теста важно понимать, что в них могут содержаться компоненты, мешающие проведению реакции с субстратом. Так, циркулирующий белок LBP, мембрано-ассоциирующиеся молекулы гранулоцитов и моноцитов (CD11/CD18, CD14 и др.), а также поверхностные структуры тромбоцитов обладают способностью связывать и нейтрализовать ЛПС [24, 25], что снижает точность определения количества БЭ в жидких образцах. Кроме того, в крови содержатся сериновые протеазы, гидролизующие пептидные связи ферментов, участвующих в каскаде реакций; большое содержание протеаз в биообразцах (например, в результате выхода протеаз из разрушенных клеток при травмах, других критических состояниях) делает определение ЛПС

may be used. The undeniable advantage of the chromogenic LAL-test is the ability to determine the content of BE accurately and a significantly higher reproducibility of the method.

The turbidimetric LAL-test is based on the fact that turbidity of the solution occurs during interaction of the reagent with BE, i.e. its absorbancy changes; at that, the rate of this change depends on the quantity of BE. As a rule, achievement of a predetermined threshold of the absorbancy is the assessment criterion. Among all variations of the LAL-test, this method is the most sensitive one (the peak sensitivity is 0.001 EU/ml). The analysis requires a thermostatic incubator with a photometer, allowing to perform continuous measurements of the absorbance of the reaction mixture during incubation at a given temperature.

When analyzing biological fluids by means of the LAL-test it is important to understand that they might contain components preventing a reaction with the substrate. For instance, circulating LBP protein, membrane-associated molecules of granulocytes and monocytes (CD11/CD18, CD14, etc.), as well as superficial structures of platelets have the ability to bind and neutralize LPS [24, 25] thus decreasing the accuracy of the BE counting in liquid samples. In addition, the blood contains serine proteases hydrolyzing peptide bonds of enzymes involved in the cascade of reactions; a greater content of proteases in biosamples (for example, as a result of release of proteases from destroyed cells after traumas and other critical conditions) makes the LPS detection difficult [26]. On the other hand, proteases can activate enzymes contained in the Limulus coagulation system which is similar to that of mammals, resulting in false positive test results [27]. In addition to the proteins, (1,3)- $\beta$ -D-glucans, the components of fungal cell walls, are present; like LPS, they can activate the enzyme cascade. In order to reduce the probability of false results in blood and serum tests, a specially designed Glucashield™ buffer compatible with the reagent for the LAL-test should be used. While using it, enzymes, producing the LAL-reaction cascade are insensitive to (1,3)- $\beta$ -D-glucans that allows a more precise measurement of endotoxin in the sample. In general, pretreatment is required to abrogate a negative impact of various blood proteins that prevent the reliable and reproducible results of the LAL-test when testing for bacterial endotoxins [28].

Therefore, the advantages of the LAL-test include a sufficiently high sensitivity, simplicity and relatively short testing time. The method is characterized by a relatively low cost, reproducibility, and simplicity. Disadvantages of the method includes: (a) lacking the specificity in the analysis of the content of BE in multicomponent solutions such as blood and plasma, and (b) requirement of special equip-

проблематичным [26]. С другой стороны, протеазы могут активировать ферменты, составляющие систему свертывания крови мечехвостов, сходную с таковой у млекопитающих, что приводит к получению ложноположительных результатов анализа [27]. В дополнение к белкам, в крови в небольших количествах содержатся (1,3)- $\beta$ -D-глюканы, компоненты стенок грибковых клеток, которые, также как и ЛПС, могут активировать ферментный каскад. Для того, чтобы снизить вероятность получения ложных результатов при исследовании крови и сыворотки, необходимо применять специально разработанный для этого буфер Glucashield™, совместимый с реагентом для ЛАЛ-теста. При его использовании ферменты, продуцирующие каскад ЛАЛ-реакции, оказываются нечувствительны к (1,3)- $\beta$ -D-глюканам, что позволяет произвести более точное измерение эндотоксина в образце. В общем и целом, необходима предварительная обработка, дезактивирующая негативное воздействие различных белков крови, мешающих получению достоверных и воспроизводимых результатов анализа бактериальных эндотоксинов методом ЛАЛ-теста [28].

Таким образом, к преимуществам ЛАЛ-теста относятся достаточно высокая чувствительность, простота и относительно небольшое время проведения анализа. Метод характеризуется сравнительно невысокой стоимостью, воспроизводимостью, удобством применения. Недостатками метода являются: (а) недостаточная специфичность при анализе содержания БЭ в таких многокомпонентных растворах, как кровь и плазма, и (б) необходимость наличия специального оборудования, что затрудняет его использование в качестве экспресс-метода в условиях стационара. В целом, метод более всего подходит для определения БЭ в водных растворах; его применение с целью диагностики грамотрицательного сепсиса является недостаточно специфичным.

**PyroGene™.** Другой метод анализа бактериального эндотоксина в водных средах основан на использовании набора PyroGene™, разработанного компанией Lonza [29]. Суть метода в том, что вместо нативной формы фактора С гемостаза мечехвостов используют рекомбинантные молекулы фактора С (rFC), активирующиеся при связывании с БЭ, что приводит к эмиссии флуоресцентного сигнала. Метод является аналогом популярного ЛАЛ-теста, однако более специфичным в отношении выявления именно БЭ. Использование именно rFC позволяет исключить ложноположительные результаты, периодически возникающие в ЛАЛ-тесте в связи с наличием в биологических жидкостях перекрестно-реагирующих в тесте  $\beta$ -глюканов. Чувствительность метода PyroGene составляет 0,005 ЕЭ/мл. К недостаткам можно отнести более высокую стоимость,

which makes it difficult to use the test in an express hospital setting. In general, the method is the most appropriate one for determining BE in aqueous solutions; its use for diagnosis of Gram-negative sepsis is not sufficiently specific.

**PyroGene™.** Another method of analysis of bacterial endotoxin in aqueous media is based on the PyroGene™ kit manufactured by Lonza [29]. The essence of the method is that recombinant molecules of factor C (rFC) activated at binding to BE are used instead of the native form of factor C of *Limulus* hemostasis, thus leading to the emission of a fluorescent signal. This method is analogous to the popular LAL-test, but it is more specific in identifying BE. The use of rFC permits to exclude false positive results recurring in the LAL-test due to  $\beta$ -glucans in biological fluids cross-reacting in the test. The sensitivity of the PyroGene method is 0.005 EU/ml. Disadvantages include a higher cost, and the only one manufacturer and supplier licensed in Russian Federation.

**EndoZyme® and EndoLisa®.** The EndoZyme® method is used for the in vitro assay of BE in biological, pharmaceutical and other samples; it is also based on the interaction of BE with rFC [15], resulting in a fluorescent signal which is detected instrumentally. The peak sensitivity of the method is 0.005 EU/ml.

The EndoLisa® method is a variation of the EndoZyme® method; the main difference is in preliminary accumulation of BE using recombinant protein of a bacteriophage fixed to a polymer substrate. Detection is carried out using the enzyme system that contains rFC.

Both methods allow to avoid false-positive results due to reactions with  $\beta$ -glucans in the LAL test, and also allow to work with concentrated salt solutions. It is important to note that the EndoLisa® method shows a good correlation with other methods (LAL-test) in determining BE; in July, 2016, the European Pharmacopoeia allowed to use it in clinical practice for the quantitative analysis of bacterial endotoxin [31].

**Endotoxin Activity Assay – EAA.** In 1998, the first method for assessment of the endotoxin activity (Endotoxin Activity Assay, EAA) directly in whole blood was developed for diagnosing Gram-negative infections [32]. It has become the first and currently the only quantitative assay of BE in the blood approved by the United States Food and Drug Administration (FDA) [33, 34]. The EAA test is based on the fact that the blood endotoxin binds to anti-endotoxin antibodies (monoclonal murine IgM), then the resulting complex of the antigen (LPS) and antibodies (contains a fragment affine to complement components) interacts with the complement factor, and the entire complex is captured by receptors of the complement expressed on the surface of neutrophils in a whole blood sample. In the presence of Zymosan A (a glucan causing a pronounced reaction of innate

а также проблему приобретения на территории РФ в связи с наличием единственного производителя и поставщика.

**EndoZyme® и EndoLisa®.** Метод EndoZyme® используется для количественного определения БЭ *in vitro* в биологических, фармацевтических и других образцах, он также основывается на взаимодействии БЭ с rFC [15], что приводит к возникновению флуоресцентного сигнала, который детектируется инструментально. Максимальная чувствительность метода составляет 0,005 ЕЭ/мл.

Метод EndoLisa® является вариацией метода EndoZyme®, основное различие заключается в предварительном концентрировании БЭ при помощи рекомбинантного белка бактериофага, закрепленного на полимерной подложке. Детектирование осуществляется при помощи ферментной системы, содержащей rFC.

Оба этих метода позволяют избежать ложноположительных результатов, которые бывают из-за реакций с  $\beta$ -глюканами в ЛАЛ-тесте, а также позволяют работать с концентрированными солевыми растворами. Важно отметить, что метод EndoLisa® показывает хорошую корреляцию с другими методами (ЛАЛ-тест) при определении БЭ и с июля 2016 года разрешен Европейской фармакопеей к использованию для анализа содержания бактериальных эндотоксинов в клинической практике [31].

**Endotoxin Activity Assay – EAA.** В 1998 году с целью диагностики грамотрицательной бактериальной инфекции был разработан метод определения активности эндотоксина (Endotoxin Activity Assay, EAA) непосредственно в цельной крови [32]. Он является первым и на данный момент единственным количественным анализом БЭ в крови, утвержденным в США Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) [33, 34]. EAA тест основан на том, что находящийся в крови эндотоксин связывается с антиэндотоксиновыми антителами (моноклональный IgM мыши), после чего образовавшийся комплекс антигена (ЛПС) и антитела (содержит фрагмент, афинный к компонентам комплемента) взаимодействует с фактором комплемента, и весь комплекс захватывается рецепторами комплемента, экспрессирующимися на поверхности нейтрофилов в образце цельной крови. В присутствии зимозана А (глюкан, вызывающий выраженную реакцию клеток врожденного иммунитета) происходит «респираторный взрыв» нейтрофилов, и выделяется большое количество высокорекреогенных молекул-окислителей, которые детектируются методом люминол-зависимой хемилюминесценции. Количественное определение содержания БЭ основано на том, что интенсивность люминесценции пропорциональна количеству эндотоксина, присутствующего в

immunity cells) a «respiratory burst» of neutrophils occurs, and a large amount of highly reactive oxidant molecules is released, which are detected by the luminol-dependent chemiluminescence. The BE assay is based on the fact that the intensity of luminescence is proportional to the amount of endotoxin present in the blood sample. The EBA method helps identify pathogens based on the presence of their product (BE) directly in the blood without time-consuming sample preparation. Only 10  $\mu$ l of blood is required for the analysis; the test takes only 30 minutes [33].

The applicability of the method is limited to whole blood, because it requires the presence of neutrophils. In addition, specialized expensive equipment is required allowing to carry out necessary processing of the blood, as well as devices for reading the chemiluminescence signal. The fact that the analysis should be performed directly in a specified clinic may be an important limitation of the method, because only a quick test after blood sampling gives informative, adequate information. Another significant problem of practical application of the test in clinic is an ambiguous relationship between the LPS content and the EAA test result. A number of works present data on the inconsistency of results obtained by the «classic» way for endotoxin detection: the LAL-test and the EAA [35–37]. The researchers note that the level of the endotoxin activity measured by the EAA method may be elevated not only due to Gram-negative sepsis, but also Gram-positive, which is also confirmed by the lack of a direct relationship between the presence of endotoxin and the EAA result [36–38]. At that, introduction of interleukin-8 into the bloodstream leads to increased activity of endotoxin determined by the EAA [35]. The molecular concept of the method itself does not exactly correspond to the definition of BE, as indicated by the authors of the work [39]. Therefore, EAA results are currently used rather as a biomarker of sepsis than as a method of direct detection of BE in patient's blood [38, 40, 41].

**Method of activated particles (MAP) Endotox.** The method of activated particles was developed for the detection of BE in blood to diagnose Gram-negative bacterial infections; at that, this kit identifies BEs of from different bacteria, which allows to determine the causative type of bacteria. The analysis is carried out by adding the preliminary prepared biological liquid to polystyrene microspheres with surface-immobilized monoclonal antibodies IqG<sub>3</sub> and IqG<sub>2a</sub> [42]. In the presence of BE, the antigen-antibody complex is formed, and the result of the reaction is monitored visually by the degree of particle activation, i.e. by the presence of large flakes and grains, as well as the turbidity of the solution. The sensitivity of the method is 0.04 EU/ml for LPS of *E. coli* and *S. typhi*.



### Сравнение методов определения ЛПС. LPS detection methods.

Method	Sensitivity, EU/ml	LPS detection in aqueous solutions	LPS detection in blood	Quantitive LPS detection
Pyrogen Test on Rabbits	—	++	—	—
<b>LAL-test</b>				
gel-clot LAL-test	0,03	+++	+	+
chromogenic LAL-test	0,005	+++	++	+++
turbodimetric LAL-test	0,001	+++	++	+++
<b>Endo-tests</b>				
EndoLisa®	0,05	+++	—	+++
EndoZyme®	0,005	+++	—	+++
<b>Other tests</b>				
PyroGene™	0,005	+++	—	+++
EAA test	0,2	—	+++ <sup>1</sup>	+++
MAP test	0,04	no data	+++	++

**Note.** <sup>1</sup> — Determination of LPS content by this method is debatable.

**Примечание.** Method — метод; sensitivity — чувствительность; EU/ml — ЕЭ/мл; LPS detection in aqueous solutions — определение ЛПС в водных растворах; LPS detection in blood — определение ЛПС в крови; quantitive LPS detection — количественное определение ЛПС. Pyrogen test on — rabbits- пирогенность (на кроликах); LAL-test — ЛАЛ-тест; gel-clot -гель-тромб тест; chromogenic LAL-test — хромогенный ЛАЛ-тест; turbodimetric LAL-test — турбодиметрический ЛАЛ-тест; Endo-tests — Endo-тесты; EAA test — ЕАА тест; MAP test — МАЧ тест; Other tests — другие тесты; no data — нет данных. <sup>1</sup> — является дискуссионной возможностью определения содержания ЛПС данным методом.

образце крови. ЕАА метод позволяет определять патогенны по наличию их продукта — БЭ непосредственно в крови без трудоемкой пробоподготовки. Для проведения анализа достаточно 10 мл крови, тест занимает всего 30 минут [33].

Применимость метода ограничивается цельной кровью, так как необходимо наличие нейтрофилов. Кроме того, для его выполнения необходимо специализированное дорогостоящее оборудование, позволяющее проводить необходимую обработку крови, а также приборы для считывания хемилюминесцентного сигнала. Существенным ограничением метода может являться и необходимость проведения анализа непосредственно в данной клинике, поскольку только быстрое определение после взятия образцов крови у пациента дает информативные, адекватные сведения. Другой значимой проблемой практического применения теста в клинике является неоднозначная связь между содержанием ЛПС и результатом ЕАА теста. В ряде работ приводятся данные о несоответствии результатов, полученных «классическим» способом детектирования эндотоксинов — ЛАЛ-тестом и ЕАА [35–37]. Исследователи отмечают, что уровень активность эндотоксина, измеренный методом ЕАА, может быть повышен не только при грамотрицательном сепсисе, но и при грамположительном, что дополнительно подтверждает отсутствие прямой связи между наличием эндотоксина и результатом ЕАА [36–38]. При этом введение в кровь интерлейкина-8 приводит к увеличению активности эндотоксина, определяемой по методу ЕАА [35]. Сама молекулярная концепция метода не вполне соответствует определению БЭ, на что указывают авторы работы [39]. Поэтому результаты ЕАА в настоящее время

**Comparison of the methods.** The main advantages and disadvantages of the methods for BE detection in different media are presented in Table 1. Chromogenic and turbodimetric LAL-test (and its analogues) are the most useful tests for BE determination in aqueous solutions which allow to carry the analysis quickly enough with appropriate quality without time-consuming sample preparation; they also demonstrate a better sensitivity. The LAL-test may be also used to determine the BE in the blood and other biological fluids, but there are problems with sample preparation and reproducibility due to glucans and other molecules impeding the detection whose blood levels vary considerably. EAA and MAP-Endotox are optimal to meet the challenges of clinical diagnosis. Although the EAA remains a promising candidate biomarker indicating the presence of a bacterial infection including sepsis, it cannot directly determine the concentration of LPS of Gram-negative bacteria. MAP-Endotox is a semi-quantitative method with advantages of simplicity and quickness in detecting the BE. Therefore, there is currently no universal test eligible to meet the challenges of detecting BE. The BE detection in the blood as a diagnostic criterion of septic complications of critical states is still ambiguous.

**This work was financially supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Grant agreement No. 14.577.21.0165 as of 28.10.2015 within the framework of the Federal Target Program «Research and Development in the Fields of High Priority in Development of the Scientific-Technological Complex of Russia in 2014–2020»).**

используют скорее в качестве биомаркера сепсиса, чем как метод прямого определения БЭ в крови пациентов [38, 40, 41].

**Метод активированных частиц (МАЧ) Endotox.** Метод активируемых частиц был разработан для определения содержания БЭ в крови для диагностики грамотрицательных бактериальных инфекций; при этом в набор входят диагностикумы для определения БЭ разных бактерий, что позволяет выявить возбудителя. Анализ проводят путем прибавления предварительно подготовленной биологической жидкости к микросферам полистирола, на поверхности которых иммобилизованы моноклональные антитела IqG<sub>3</sub> и IqG<sub>2a</sub> [42]. При наличии БЭ образуется комплекс «антитело-антиген», и результат реакции контролируется визуально по степени активирования частиц, т.е. по наличию крупных хлопьев и зерен, а также по помутнению раствора. Чувствительность метода составляет 0,04 ЕЭ/мл для ЛПС *E.coli* и *S.typhi*.

**Сравнение методов.** Основные достоинства и недостатки методов определения БЭ в разных средах представлены в таблице. Для определения БЭ в водных растворах наиболее удобен хромогенный и турбодиметрический ЛАЛ-тест, а также, его аналоги, которые позволяют проводить анализ достаточно быстро, количественно и без трудоемкой пробоподготовки, а также, обладают луч-

шей чувствительностью. Для определения БЭ в крови и других биологических жидкостях также можно применять ЛАЛ-тест, однако возникают трудности с пробоподготовкой и воспроизводимостью результатов из-за мешающих определению глюканов и других молекул, содержание которых в крови пациентов значительно варьирует. Для решения задач клинической диагностики оптимальными являются тесты ЕАА и МАЧ-Endotox. Первый из них, хотя и является перспективным биомаркером наличия бактериальной инфекции, включая сепсис, не позволяет напрямую определять содержание ЛПС грамотрицательных бактерий. МАЧ-Endotox является полуквантитетным методом, но он имеет свои преимущества ввиду простоты и скорости определения БЭ. Таким образом, на данный момент нет универсального теста, пригодного для решения задач детектирования БЭ. Особенно неоднозначно пока определение содержания БЭ в крови как диагностического критерия септических осложнений критических состояний.

**Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (Соглашение о предоставлении субсидии № 14.577.21.0165 от 28.10.2015 г. в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 гг.»).**

#### Литература

1. Vaara M., Nikaido H. Outer membrane organization. In: Rietschel E.T. (ed.). Handbook of endotoxin. Amsterdam: Elsevier; 1984: 1–45.
2. Bone R.C. Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* 1993; 6 (1): 57–68. DOI: 10.1128/cmr.6.1.57. PMID: 8457980
3. Raetz C.R.H. Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 1990; 59: 129–170. DOI: 10.1146/annurev.bi.59.070190.001021. PMID: 1695830
4. Wilkinson S.G. Bacterial lipopolysaccharides—themes and variations. *Prog. Lipid. Res.* 1996; 35 (3): 283–343. DOI: 10.1016/S0163-7827(96)00004-5. PMID: 9082453
5. Magalhães P.O., Lopes A.M., Mazzola P.G., Rangel-Yagui C., Penna T.C., Pessoa A.Jr. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2007; 10 (3): 388–404. PMID: 17727802
6. Caroff M., Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr. Res.* 2003; 338 (23): 2431–2447. DOI: 10.1016/j.carres.2003.07.010. PMID: 14670707
7. Raetz C.R.H. Escherichia coli and Salmonella. In: Niedhardt F.C., Curtiss I.I.R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B.Jr., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaechter M., Umberger H.E. (eds.). Cellular and molecular biology. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1996: 1035–1063.
8. Копицына М.Н., Морозов А.С., Бессонов И.В., Писарев В.М., Лобакова Е.С., Бухарин О.В. Лиганды для селективного удаления бактериальных эндотоксинов грамотрицательных бактерий. *Журн. микробиол.* 2017; 3: 115–126.
9. Морозов А.С., Бессонов И.В., Нухдина А.В., Писарев В.М. Сорбенты для экстракорпорального удаления токсических веществ и молекул с нежелательной биологической активностью (обзор). *Общая реаниматология.* 2016; 12 (6): 82–107. DOI: 10.15360/1813-9779-2016-6-82-107
10. Anisimova N.Yu. Immunological pathogenesis of sepsis and use of hemosorption for treatment of cancer patients with sepsis. N.Y.: Nova Science Publishers Inc.; 2014: 57–114.
11. Williams K.L. (ed.). Endotoxins: pyrogens, LAL testing, and depyrogenation. 2nd ed. N.Y.: Marcel Dekker Inc.; 2001.

#### References

1. Vaara M., Nikaido H. Outer membrane organization. In: Rietschel E.T. (ed.). Handbook of endotoxin. Amsterdam: Elsevier; 1984: 1–45.
2. Bone R.C. Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* 1993; 6 (1): 57–68. DOI: 10.1128/cmr.6.1.57. PMID: 8457980
3. Raetz C.R.H. Biochemistry of endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 1990; 59: 129–170. DOI: 10.1146/annurev.bi.59.070190.001021. PMID: 1695830
4. Wilkinson S.G. Bacterial lipopolysaccharides—themes and variations. *Prog. Lipid. Res.* 1996; 35 (3): 283–343. DOI: 10.1016/S0163-7827(96)00004-5. PMID: 9082453
5. Magalhães P.O., Lopes A.M., Mazzola P.G., Rangel-Yagui C., Penna T.C., Pessoa A.Jr. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2007; 10 (3): 388–404. PMID: 17727802
6. Caroff M., Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr. Res.* 2003; 338 (23): 2431–2447. DOI: 10.1016/j.carres.2003.07.010. PMID: 14670707
7. Raetz C.R.H. Escherichia coli and Salmonella. In: Niedhardt F.C., Curtiss I.I.R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B.Jr., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaechter M., Umberger H.E. (eds.). Cellular and molecular biology. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1996: 1035–1063.
8. Kopytsyna M.N., Morozov A.S., Bessonov I.V., Pisarev V.M., Lobakova E.S., Bukharin O.V. Ligands for selective removal of bacterial endotoxins from gram-negative bacteria. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii.* 2017; 3: 115–126. [In Russ.]
9. Morozov A.S., Bessonov I.V., Nuzhdina A.V., Pisarev V.M. Sorbents for extracorporeal removal of toxic substances and molecules with adverse biological activity (review). *Obshchaya Reanimatologiya = General Reanimatology.* 2016; 12 (6): 82–107. DOI: 10.15360/1813-9779-2016-6-82-107. [In Russ., In Engl.]
10. Anisimova N.Yu. Immunological pathogenesis of sepsis and use of hemosorption for treatment of cancer patients with sepsis. N.Y.: Nova Science Publishers Inc.; 2014: 57–114.
11. Williams K.L. (ed.). Endotoxins: pyrogens, LAL testing, and depyrogenation. 2nd ed. N.Y.: Marcel Dekker Inc.; 2001.

12. Cooper J.F., Levin J., Wagner H.N.J. Quantitative comparison of *in-vitro* and *in-vivo* methods for the detection of endotoxin. *J. Lab. Clin. Med.* 1971; 78 (1): 138–148. PMID: 4936365
13. [http://bio.lonza.com/uploads/tx\\_mwaxmarketingmaterial/Lonza\\_ManualsProductInstructions\\_PyroGene\\_Product\\_Insert\\_0005.pdf](http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_ManualsProductInstructions_PyroGene_Product_Insert_0005.pdf)
14. Grallert H., Leopoldeder S., Schuett M., Kurze P., Buchberger B. EndoLISA®: a novel and reliable method for endotoxin detection. *Nature methods. Application notes.* 2011; 3-5.
15. <http://www.hyglos.de/en/products-services/products/endotoxin-detection.html> <http://www.hyglos.de/en/products-services/products/endotoxin-detection.html>
16. Foster D.M., Derzko A.N., Keffer J.H. Can sepsis be better defined? Contribution of a novel assay for endotoxin. *Clin. Microbiol. Newslet.* 2004; 26 (3): 17-21. DOI: 10.1016/S0196-4399(04)90010-4
17. Ниязатов А.А., Григорянц Р.Г., Самсонова Н.Н., Климович Л.Г., Фокина Н.С., Осипов К.К. Выявление эндотоксина грамотрицательных бактерий с помощью диагностических наборов «МАЧ-endotox spp.» в компонентах донорской крови и его сравнение с уровнем интерлейкинов. *Бюл. НИ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. Сердечно-сосудистые заболевания.* 2011; 12 (6): 79-83.
18. Mashkovsky M.D., Babayan E.A., Oboimakova A.N., Bulaev V.M., Severtsev V.A., Lyubimov B.I., Sokolov S.D., Tentsova A.I. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. Вып. 2. М.: Медицина; 1990: 387.
19. Park C.Y., Jung S.H., Bak J.P., Lee S.S., Rhee D.K. Comparison of the rabbit pyrogen test and Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay for endotoxin in hepatitis B vaccines and the effect of aluminum hydroxide. *Biologicals.* 2005; 33 (3): 145-151. DOI: 10.1016/j.biologicals.2005.04.002. PMID: 16055344
20. Levin J., Bang F.B. Clottable protein in Limulus, its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb Diath. Haemorrh.* 1968; 19 (1): 186-197. PMID: 5690028
21. Piervincenzi R.T. USP XXIV. United States Pharmacopeia Convention. Rockville MD: United States Pharmacopeia; 2000: 157.
22. Hurley J.C. Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8 (2): 268–292. PMID: 7621402
23. Ситников А.Г. ЛАЛ–тест. Современные подходы к определению пирогенности. М.: Москва; 1997: 96.
24. Guideline on validation of the Limulus Amebocyte Lysate test as an End-Product Endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices. Rockville MD: US Food and Drug Administration; 1987: 54.
25. Interim guidance for human, veterinary drug products, and biologicals: kinetic lal techniques. Rockville MD: US Food and Drug Administration; 1991: 10.
26. Warren H.S., Novitsky T.J., Ketchum P.A., Roslansky P.F., Kania S., Siber G.R. Neutralization of bacterial lipopolysaccharides by human plasma. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 22 (4): 590-595. PMID: 3908471
27. Ketchum P.A., Novitsky T.J. Assay of endotoxin by Limulus Amebocyte Lysate. Septic shock methods and protocols. Methods in molecular medicine. Vol. 36. NY: Humana Press; 2000: 3-12.
28. Fields M. Testing blood samples for endotoxin. *LAL Update.* 2006; 23 (2): 1-3.
29. <http://www.lonza.com/products-services/pharma-biotech/endotoxin-detection/endotoxin-detection-assays/recombinant-factor-c-assay/pyrogene-overview.aspx>
30. <http://www.hyglos.de/en/products-services/products/endotoxin-detection/endozymer.htm>
31. <http://www.hyglos.de/en/products-services/products/endotoxin-detection/endolisar.html>
32. Marshall J.C., Walker P.M., Foster D.M., Harris D.M., Ribeiro M., Paice J., Romaschin A.D., Derzko A.N. Measurement of endotoxin activity in critically ill patients using whole blood neutrophil dependent chemiluminescence. *Crit. Care.* 2002; 6 (4): 342-348. DOI: 10.1186/cc1522. PMID: 12225611
33. Romaschin A.D., Harris D.M., Ribeiro M., Paice J., Foster D.M., Walker P.M., Marshall J.C. A rapid assay of endotoxin in whole blood using autologous neutrophil dependent chemiluminescence. *J. Immunol. Methods.* 1998; 212 (2): 169-185. DOI: 10.1016/S0022-1759(98)00003-9. PMID: 9672205
34. Romaschin A.D., Klein D.J., Marshall J.C. Bench-to-bedside review: clinical experience with the endotoxin activity assay. *Crit. Care.* 2012; 16 (6): 248-257. DOI: 10.1186/cc11495. PMID: 23206992
35. Matsumoto N., Takahashi G., Kojika M., Suzuki Ya., Inoue Yo., Inada K., Endo Sh. Interleukin-8 induces an elevation in the endotoxin activity assay (EAA) level: does the EAA truly measure the endotoxin level? *J. Infect. Chemother.* 2013; 19 (5): 825–832. DOI: 10.1007/s10156-013-0567-z. PMID: 23460381
36. Ishihata K., Kakihana Ya., Yasuda T., Imabayashi T., Nakamura N. Newly developed endotoxin measurement method (the Endotoxin Ac-
12. Cooper J.F., Levin J., Wagner H.N.J. Quantitative comparison of *in-vitro* and *in-vivo* methods for the detection of endotoxin. *J. Lab. Clin. Med.* 1971; 78 (1): 138–148. PMID: 4936365
13. [http://bio.lonza.com/uploads/tx\\_mwaxmarketingmaterial/Lonza\\_ManualsProductInstructions\\_PyroGene\\_Product\\_Insert\\_0005.pdf](http://bio.lonza.com/uploads/tx_mwaxmarketingmaterial/Lonza_ManualsProductInstructions_PyroGene_Product_Insert_0005.pdf)
14. Grallert H., Leopoldeder S., Schuett M., Kurze P., Buchberger B. EndoLISA®: a novel and reliable method for endotoxin detection. *Nature methods. Application notes.* 2011; 3-5.
15. <http://www.hyglos.de/en/products-services/products/endotoxin-detection.html> <http://www.hyglos.de/en/products-services/products/endotoxin-detection.html>
16. Foster D.M., Derzko A.N., Keffer J.H. Can sepsis be better defined? Contribution of a novel assay for endotoxin. *Clin. Microbiol. Newslet.* 2004; 26 (3): 17-21. DOI: 10.1016/S0196-4399(04)90010-4
17. Niyazmatov A.A., Grigoryants R.G., Samsonova N.N., Klimovich L.G., Fokina N.S., Osilov K.K. Detection of endotoxin of Gram-negative bacteria using diagnostic kits «MACH-endotox spp.» in components of the donor blood and its comparison with the level of interleukins. *Byulleten NTs SSKh Imeni A.N.Bakuleva RAMN. Serdechno-Sosudistye Zabolevaniya.* 2011; 12 (6): 79-83. [In Russ.]
18. Mashkovsky M.D., Babayan E.A., Oboimakova A.N., Bulaev V.M., Severtsev V.A., Lyubimov B.I., Sokolov S.D., Tentsova A.I. General methods of analysis. Medicinal plant raw materials. Issue 2. Moscow: Meditsina Publishers; 1990: 387. [In Russ.]
19. Park C.Y., Jung S.H., Bak J.P., Lee S.S., Rhee D.K. Comparison of the rabbit pyrogen test and Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay for endotoxin in hepatitis B vaccines and the effect of aluminum hydroxide. *Biologicals.* 2005; 33 (3): 145-151. DOI: 10.1016/j.biologicals.2005.04.002. PMID: 16055344
20. Levin J., Bang F.B. Clottable protein in Limulus, its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb Diath. Haemorrh.* 1968; 19 (1): 186-197. PMID: 5690028
21. Piervincenzi R.T. USP XXIV. United States Pharmacopeia Convention. Rockville MD: United States Pharmacopeia; 2000: 157.
22. Hurley J.C. Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8 (2): 268–292. PMID: 7621402
23. Sitnikov A.G. LAL-test. Modern approaches to pyrogenicity detection. Moscow: Moscow Publishers; 1997: 96. [In Russ.]
24. Guideline on validation of the Limulus Amebocyte Lysate test as an End-Product Endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices. Rockville MD: US Food and Drug Administration; 1987: 54.
25. Interim guidance for human, veterinary drug products, and biologicals: kinetic lal techniques. Rockville MD: US Food and Drug Administration; 1991: 10.
26. Warren H.S., Novitsky T.J., Ketchum P.A., Roslansky P.F., Kania S., Siber G.R. Neutralization of bacterial lipopolysaccharides by human plasma. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 22 (4): 590-595. PMID: 3908471
27. Ketchum P.A., Novitsky T.J. Assay of endotoxin by Limulus Amebocyte Lysate. Septic shock methods and protocols. Methods in molecular medicine. Vol. 36. NY: Humana Press; 2000: 3-12.
28. Fields M. Testing blood samples for endotoxin. *LAL Update.* 2006; 23 (2): 1-3.
29. <http://www.lonza.com/products-services/pharma-biotech/endotoxin-detection/endotoxin-detection-assays/recombinant-factor-c-assay/pyrogene-overview.aspx>
30. <http://www.hyglos.de/en/products-services/products/endotoxin-detection/endozymer.htm>
31. <http://www.hyglos.de/en/products-services/products/endotoxin-detection/endolisar.html>
32. Marshall J.C., Walker P.M., Foster D.M., Harris D.M., Ribeiro M., Paice J., Romaschin A.D., Derzko A.N. Measurement of endotoxin activity in critically ill patients using whole blood neutrophil dependent chemiluminescence. *Crit. Care.* 2002; 6 (4): 342-348. DOI: 10.1186/cc1522. PMID: 12225611
33. Romaschin A.D., Harris D.M., Ribeiro M., Paice J., Foster D.M., Walker P.M., Marshall J.C. A rapid assay of endotoxin in whole blood using autologous neutrophil dependent chemiluminescence. *J. Immunol. Methods.* 1998; 212 (2): 169-185. DOI: 10.1016/S0022-1759(98)00003-9. PMID: 9672205
34. Romaschin A.D., Klein D.J., Marshall J.C. Bench-to-bedside review: clinical experience with the endotoxin activity assay. *Crit. Care.* 2012; 16 (6): 248-257. DOI: 10.1186/cc11495. PMID: 23206992
35. Matsumoto N., Takahashi G., Kojika M., Suzuki Ya., Inoue Yo., Inada K., Endo Sh. Interleukin-8 induces an elevation in the endotoxin activity assay (EAA) level: does the EAA truly measure the endotoxin level? *J. Infect. Chemother.* 2013; 19 (5): 825–832. DOI: 10.1007/s10156-013-0567-z. PMID: 23460381
36. Ishihata K., Kakihana Ya., Yasuda T., Imabayashi T., Nakamura N. Newly developed endotoxin measurement method (the Endotoxin Ac-

- tivity Assay) may reflect the severity of sepsis. *Open J. Pathol.* 2013; 3: 1-6. DOI: 10.4236/ojpathology.2013.31001
37. Sato M., Matsuyama R., Kadokura T., Mori R., Kumamoto T., Nojiri K., Taniguchi K., Takeda K., Kubota K., Tanaka K., Endo I. Severity and prognostic assessment of the endotoxin activity assay in biliary tract infection. *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.* 2014; 21 (2): 120–127. DOI: 10.1002/jhbp.10. PMID: 23798326
38. Yaguchi A., Yuzawa J., Klein D.J., Takeda M., Harada T. Combining intermediate levels of the Endotoxin Activity Assay (EAA) with other biomarkers in the assessment of patients with sepsis: results of an observational study. *Crit. Care.* 2012; 16 (3): R88. DOI: 10.1186/cc11350. PMID: 22607642
39. Cross A. Endotoxin: back to the future. *Crit. Care Med.* 2016; 44 (2): 450-451. DOI: 10.1097/CCM.0000000000001440. PMID: 26771793
40. Jaramillo-Bustamante J.C., Marín-Agudelo A., Fernández-Laverde M., Bareño-Silva J. Epidemiology of sepsis in pediatrics: first Colombian multicenter pilot survey. *Crit. Care.* 2010; 14 (Suppl 2): P1. DOI: 10.1186/cc9104
41. Yaroustovskiy M., Plyushch M., Popov D., Samsonova N., Abramyan M., Popok Z., Krotenko N. Prognostic value of endotoxin activity assay in patients with severe sepsis after cardiac surgery. *J. Inflamm.* 2013; 10 (1): 8. DOI: 10.1186/1476-9255-10-8. PMID: 23510603
42. Ярустовский М.Б., Самсонова Н.Н., Рогольская Е.А., Климович Л.Г., Плющ М.Г., Абрамян М.В., Кротенко Н.П., Ниязатов А.А. Экспресс-диагностика уровня эндотоксемии в послеоперационном периоде у кардиохирургических больных. *Анестезиология и реаниматология.* 2013; 3: 25-29. PMID: 24340992
- tivity Assay) may reflect the severity of sepsis. *Open J. Pathol.* 2013; 3: 1-6. DOI: 10.4236/ojpathology.2013.31001
37. Sato M., Matsuyama R., Kadokura T., Mori R., Kumamoto T., Nojiri K., Taniguchi K., Takeda K., Kubota K., Tanaka K., Endo I. Severity and prognostic assessment of the endotoxin activity assay in biliary tract infection. *J. Hepatobiliary Pancreat. Sci.* 2014; 21 (2): 120–127. DOI: 10.1002/jhbp.10. PMID: 23798326
38. Yaguchi A., Yuzawa J., Klein D.J., Takeda M., Harada T. Combining intermediate levels of the Endotoxin Activity Assay (EAA) with other biomarkers in the assessment of patients with sepsis: results of an observational study. *Crit. Care.* 2012; 16 (3): R88. DOI: 10.1186/cc11350. PMID: 22607642
39. Cross A. Endotoxin: back to the future. *Crit. Care Med.* 2016; 44 (2): 450-451. DOI: 10.1097/CCM.0000000000001440. PMID: 26771793
40. Jaramillo-Bustamante J.C., Marín-Agudelo A., Fernández-Laverde M., Bareño-Silva J. Epidemiology of sepsis in pediatrics: first Colombian multicenter pilot survey. *Crit. Care.* 2010; 14 (Suppl 2): P1. DOI: 10.1186/cc9104
41. Yaroustovskiy M., Plyushch M., Popov D., Samsonova N., Abramyan M., Popok Z., Krotenko N. Prognostic value of endotoxin activity assay in patients with severe sepsis after cardiac surgery. *J. Inflamm.* 2013; 10 (1): 8. DOI: 10.1186/1476-9255-10-8. PMID: 23510603
42. Ярустовский М.Б., Самсонова Н.Н., Рогольская Е.А., Климович Л.Г., Плющ М.Г., Абрамян М.В., Кротенко Н.П., Ниязатов А.А. Экспресс-диагностика уровня эндотоксемии в послеоперационном периоде у кардиохирургических больных. *Анестезиология и реаниматология.* 2013; 3: 25-29. PMID: 24340992

Поступила 19.06.17

Received 19.06.17

## ОБЩАЯ РЕАНИМАТОЛОГИЯ

Научно-практический журнал «Общая реаниматология»,  
входящий в перечень ВАК РФ, в Scopus и другие базы данных,  
предназначен для врачей анестезиологов-реаниматологов и научных сотрудников.

**Тематика журнала:** патогенез, клиника, диагностика, лечение, профилактика и патологическая анатомия критических, терминальных и постреанимационных состояний; оказание догоспитальной помощи при критических состояниях; обучение населения и медицинского персонала приемам оказания неотложной помощи при критических состояниях; оптимизация работы ОРИТ; юридические и этические вопросы в области анестезиологии-реаниматологии.

**Аудитория:** лечебные учреждения; высшие учебные заведения медицинского профиля; медицинские учреждения последипломного образования, Федеральные и региональные органы управления здравоохранением, медицинские научно-исследовательские институты; медицинские библиотеки.

## ПОДПИСКА

В любом почтовом отделении связи по каталогу «Книга-Сервис»

• индекс 46338 — для индивидуальных подписчиков