

**Spectral Diagnostics Incorporated**  
**Набор для оценки активности эндотоксина**  
**Endotoxin Activity Assay (EAA™)**

Для диагностики **in vitro**

Для измерения активности эндотоксина в образцах цельной крови человека

Каталожные номера: EAA20-1, EAQC-5

**Применение:** Анализ Активности Эндотоксина (EAA™) является быстрым анализом цельной крови, который использует определенные моноклональные антитела, чтобы измерить активность эндотоксина в пробах цельной крови с EDTA. При использовании в соединении с микробными культурами и другими диагностическими тестами (ультразвук, бронхоскопия или компьютерная томография) анализ проводится :

- для исключения наличия грамтрицательных бактериальных инфекций
- в сочетании с другими клиническими данными, такими как клинические симптомы и другие лабораторные и/или рентгенографические результаты анализов, может помочь в оценке степени риска прогрессии тяжелого сепсиса у пациентов в первые сутки в отделении интенсивной терапии.

**Описание:** Эндотоксин или липополисахарид А (ЛПС) является облигатным компонентом наружной клеточной мембраны грамтрицательных бактерий и первичным продуктом грамтрицательных бактерий, ответственным за развитие септического шока. Высокий уровень эндотоксина в крови вызывает изменения в экспрессии более 300 генов, активированных макрофагов, нейтрофилов, эндотелиальных клеток, вызывает каскад (активацию) коагуляции – в совокупности приводящие к сепсису и шоку.

Этот анализ использует биологическую реакцию нейтрофилов в крови пациента на иммунологический комплекс эндотоксина и экзогенных антител как меру активности эндотоксина у пациента, в реакции участвует ЛПС грамтрицательных бактерий и не возникает перекрестных реакций с элементами клеточной оболочки грамположительных бактерий и других микроорганизмов.

Анализ проводится в комплексе:

- с обычными микробиологическими культурами и другими соответствующими диагностическими тестами, такими как УЗИ, рентген грудной клетки, бронхоскопия или компьютерная томография, чтобы облегчить "исключение" грамтрицательной инфекции, оперативно предоставляя дополнительную диагностическую информацию.
- со всеми доступными клиническими и лабораторными результатами исследований, включая оценку врача, чтобы определить риск развития тяжелого сепсиса.

Анализ Активности Эндотоксина (ЕАА™) является быстрым анализом, который измеряет активность эндотоксина в крови. Анализ основан на реакции эндотоксина с определенным антиэндотоксическим антителом. Белки комплемента опсонизируют комплекс антител эндотоксина. Опсонифицированные иммунные комплексы наполняют нейтрофилы в крови чтобы увеличить респираторный взрыв в ответ на зимозан. Респираторный взрыв нейтрофилов продуцирует оксиданты, которые вступают в реакцию с люминолом и в результате реакции возникает хемилюминисценция. В дальнейшем хемилюминисценция может быть зарегистрирована счетчиком фотонов люминометра. Пробы крови собираются в пробирки с антикоагулянтом этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА). Люминисценция измеряется и регистрируется хемилюминометром.

Измерение базальной активности (пробирка 1) в отсутствие специфического антиэндотоксичного антитела определяет неспецифический оксидативный всплеск нейтрофилов больного. Дополнительное контрольное измерение, включая специфические антиэндотоксичные антитела и избыток экзогенного эндотоксина (пробирка 3) определяет максимальный оксидативный всплеск нейтрофилов больного. Аналитическое измерение (пробирка 2) включает специфические антитела для определения фонового уровня активности эндотоксина. Уровень ЕАА™ рассчитывается нормализацией хемилюминисценции в испытательной пробе (пробирка 2) относительно максимальной хемилюминисценции (пробирка 3) с коррекцией обоих результатов по базальной активности хемилюминисценции (пробирка 1).

Пробы крови собираются в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА.

**Подготовка и проведение анализа:** для проведения анализа требуются образцы крови с антикоагулянтом ЭДТА. Указания NCCLS должны соблюдаться при сборе, транспортировке и обработке проб крови. Образцы крови должны собираться в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА венопункцией или через постоянный катетер. Если проба крови забирается через постоянную артериальную или венозную канюлю или катетер, пожалуйста, пролейте линии согласно удобной Вам политики перед сбором в соответствующую пробирку. Пробы крови перед анализом могут храниться в течение 180 минут при комнатной температуре (18-25°C). Проба перед проведением анализа должна быть тщательно перемешана в течение 20-30 секунд аккуратными вращательными движениями. Необходимо как минимум 2,5 мл цельной крови для проведения анализа крови пациента (1,0 мл крови пациента) и QC анализа (1,0 мл), которые могут быть получены из независимых проб.

Поставляемые материалы:

Каталожный номер	ЕАА™ Набор (Tray)*	ЕАА™ Тест контроля качества (QC Test)*	ЕАА™ Бутылочка с реагентами Reagent Bottle**	Инструкция по использованию
ЕАА20-1	4	1	2	Да
ЕААQC-5	0	5	1	Да

\* ЕАА™ Набор и Контроль качества (QC) находятся в поставляемом фольгированном пакете. Описание содержания каждого из тестов смотрите далее. \*\* Описание содержания каждой из бутылочек смотрите далее.

\* Каждый ЕАА™ набор содержит следующие реагенты, необходимые для проведения 5 тестов в дублях:

Содержание	Метка
10 пробирок, содержащих стабилизаторы и люминол-зимозан	Tube 1 (Пробирка 1)
10 пробирок, содержащих 1,0-2,0 мкг мышинных моноклональных антител к эндотоксину, стабилизаторы и люминол-зимозан	Tube 2 (Пробирка 2)
10 пробирок, содержащих 1,0-2,0 мкг мышинных моноклональных антител к эндотоксину, стабилизаторы и люминол-зимозан	Tube 3 (Пробирка 3)
5 пробирок, содержащих 2,3 нг эндотоксина (E coli 055:B5) со стабилизаторами	LPS MAX Tube (Пробирка Макс ЛПС)
5 пустых пробирок	Aliquot Tube (Пробирка для аликвоты)

\*Каждый ЕАА™ Контроль Качества (одиночный тест) содержит следующие реагенты:

Содержание	Метка
2 пробирки, содержащих стабилизаторы и люминол-зимозан	Tube 1 (Пробирка 1)
2 пробирки, содержащих 1,0-2,0 мкг мышинных моноклональных антител к эндотоксину, стабилизаторы и люминол-зимозан	Tube 3 (Пробирка 2)
1 пробирка, содержащих 1,0-2,0 мкг мышинных моноклональных антител к эндотоксину, стабилизаторы и люминол-зимозан	High Control Tube (Высокий контроль)
1 пробирка, содержащих 1,0-2,0 мкг мышинных моноклональных антител, стабилизаторы и люминол-зимозан	Low Control Tube (Низкий контроль)
1 пробирка, содержащих 2,3 нг эндотоксина (E coli 055:B5) со стабилизаторами	QC LPS MAX Tube (Пробирка Макс ЛПС)
1 пустая пробирка	QC Aliquot Tube (Пробирка для аликвоты)

\*\* Каждая ЕАА™ Бутылочка содержит около 70 мл ЕАА™ реагента, содержащего HBSS и гепарин в достаточном количестве для одного набора.

Хранение реагентов и их срок годности:

Не используйте ЕАА™ набор после истечения срока годности. Не смешивайте компоненты из наборов с разными номерами лотов.

ЕАА™ компоненты теста	Температура	Срок годности
ЕАА™ набор Неоткрытый	Комнатная температура (18°-25° С)	До конца срока хранения
Открытый, заклеенный	2°-8° С	30 дней Заклеить после открытия
ЕАА™ QC разовый тест	Комнатная температура (18°-25° С)	До конца срока хранения
ЕАА™ реагент Неоткрытый	2°-8° С	До конца срока хранения Не замораживать
Открытая бутылочка	2°-8° С	30 дней Заклеить после открытия Не замораживать

#### Дополнительные необходимые материалы

1. Комбинированная пипетка на объем 40 мкл и 1000 мкл, а также микропипетка на 500 мкл.
2. Стерильные наконечники для пипеток
3. Таймер
4. Пробирки для крови с ЭДТА

#### Предупреждения

Внимание: набор содержат материалы животного происхождения и инструменты должны обрабатываться как работающие с переносчиками опасных заболеваний.

1. ЕАА™ содержит в пробирках лиофилизированные шарики реагента. При определенных условиях (нарушенная упаковка, некорректное заклеивание упаковок или нарушение условий хранения) реагенты могут утрачивать функциональность при избыточной влажности.
2. Только для исследований in vitro.

3. Работайте или уничтожайте EAA<sup>™</sup> реагенты и все пробы крови после работы как при работе с потенциальными переносчиками инфекционных агентов.
4. При работе с реагентами и образцами человеческой крови придерживайтесь общих рекомендованных правил<sup>5</sup>.
5. Не пипетируйте ртом.
6. Не ешьте и не пейте вблизи мест обработки образцов.
7. В случае пролития реагентов, промойте 0,5% раствором гипохлорида.
8. При ручном пипетировании проб и контролей, используйте индивидуальные носики во избежание переноса реагентов.

Интерпретация EAA<sup>™</sup> процедуры тестирования – смотрите Приложение А инструкции по использованию.

Интерпретация EAA<sup>™</sup> процедуры контроля качества (QC) – смотрите Приложение В инструкции по использованию.

## **Интерпретация ЕАА<sup>™</sup> результатов тестирования**

### А) Определение Грам Негативной Инфекции

ЕАА<sup>™</sup> это Анализ Активности с установленной числовой границей равной 0,4 для определения грамм-негативной инфекции. Результаты ниже 0,4 (0,00 – 0,39) отвечают абсенсу грамм-негативной инфекции при интенсивной терапии пациентов с подозрением на инфекцию.

Также как и для всех видов диагностических тестов, каждая лаборатория должна устанавливать свои нормы для более корректной интерпретации специфических групп, отражения конкретной практики и критериев определения грамм-негативной реакции в лечебном учреждении.

### Б) Оценка риска тяжелого сепсиса

Результаты больше, чем 0,4 говорят о наличии эндотоксинов в крови. Рост уровня циркулирующего в крови эндотоксина могут вызывать различные факторы. Включая инвазивную грамм-негативную инфекцию и попадание эндотоксина из полости кишечника. Эндотоксин основной продукт грамм-негативных бактерий, вызывающий септический шок.

Точная диагностика первичных и вторичных причин эндотоксемии требует дальнейших клинических и диагностических методов для подтверждения причин и выбора методов лечения.

ЕАА<sup>™</sup> предназначено для помощи в оценке риска развития у пациента тяжелого сепсиса в течение первых критических часов после направления в палату интенсивной терапии и результаты теста наиболее полезны при анализе совместно с другими факторами риска сепсиса. ЕАА<sup>™</sup> не предназначен для уникальной диагностики текущего состояния сепсиса. В мульти-центровом проспективном клиническом исследовании (Клиническую эффективность смотрите далее), был изучен риск развития тяжелого сепсиса среди пациентов интенсивной терапии и на основании результатов исследования были основаны критерии риска развития сепсиса:

У пациентов, обследованных на первый день назначения интенсивной терапии со значением ЕАА<sup>™</sup> больше 0,6, в три раза чаще развивается тяжелый сепсис в течение следующих 24 часов, чем у пациентов со значением меньше 0,4.

Значение результата анализа ЕАА<sup>™</sup> меньше 0,4 говорит о низком уровне эндотоксина. Результаты в этом диапазоне значений говорят о низком риске развития тяжелого сепсиса. Тяжелый сепсис – синдром с более чем одной причиной. Низкий уровень эндотоксина не гарантирует невозможность развития тяжелого сепсиса от несвязанных с эндотоксином механизмах запуска сепсиса. В свете этих причин, врачам следует обратить внимание на

не связанные с эндотоксином причины сепсиса. ЕАА<sup>TM</sup> следует использовать совместно с другой клинической информацией.

Результаты анализа в диапазоне от 0,40 до 0,59 говорят о промежуточном уровне активности эндотоксина и увеличенном риске развития тяжелого сепсиса.

У пациентов с повышенным значением, вероятность развития тяжелого сепсиса в два раза выше, чем у пациентов с низким значением ЕАА<sup>TM</sup>.

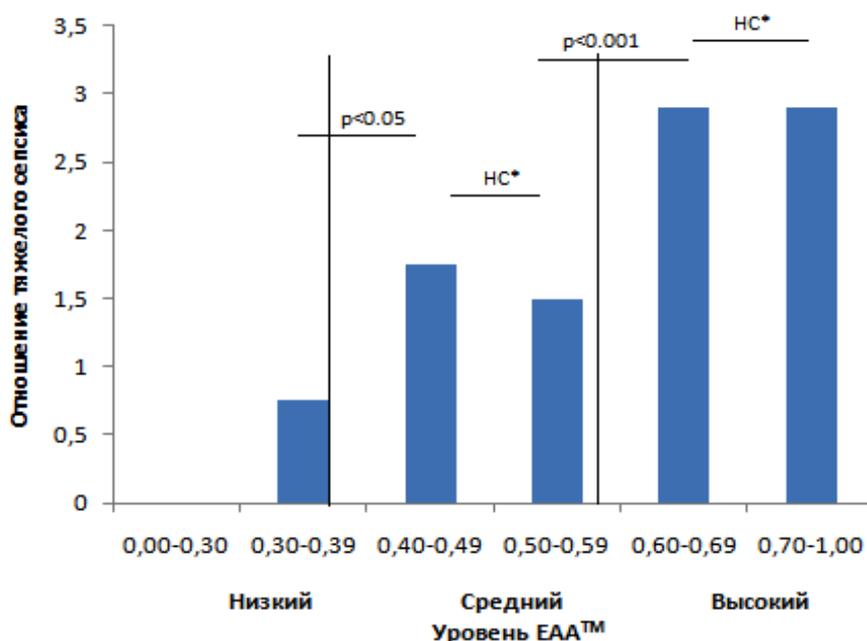
Значение ЕАА<sup>TM</sup> 0,6 и выше говорят о высоком уровне активности эндотоксина.

У пациентов с высоким значением, вероятность развития тяжелого сепсиса в три раза выше, чем у пациентов с низким значением ЕАА<sup>TM</sup>.

Повышенный уровень эндотоксина может быть связан с иными условиями заболевания пациента, например шок (9) и гипоксемия (10). Эндотоксемия может быть связана с патогенезом у пациентов с заболеваниями печени (11, 12), у пациентов после операции (13, 14, 15) и у пациентов перенесших процедуру искусственного кровообращения(16).

Несмотря на то, что повышенный уровень эндотоксина не является единственным критерием риска развития тяжелого сепсиса, его соответствие уровням ЕАА<sup>TM</sup> (низкий: 0,00-0,39; повышенный: 0,40-0,59; высокий: от 0,6 и выше) сильно взаимосвязано с наличием заболевания. На рис.1 представлены выбранные уровни результатов ЕАА<sup>TM</sup> и статистические расчеты отношений случаев развития тяжелого сепсиса между тремя диапазонами. Также отметим четкий тренд через все три диапазона уровня эндотоксина с высоким коэффициентом статистической значимости ( $p=0,0001$ ).

Рисунок 1. Отношение разногласий для тяжелого сепсиса и уровня эндотоксемии



НС – Статистически незначимая разница между отношением децилей уровней ЕАА™ в диапазоне повышенных и высоких значений. Тем не менее, различия между низкими и повышенными, а также повышенными и высокими уровнями значений ЕАА™ статистически значимы.

### **Ограничения:**

#### Аналитические

1. Необходима точность выполнения протоколов работы со всеми иммунологическими наборами и иммунохимическими реакциями.
2. Пользователь должен быть внимателен, поскольку на результаты могут влиять как медицинские препараты, так и эндогенные вещества. Влияние веществ смотрите далее.

#### Клинические

1. Не следует использовать ЕАА™ вне установленного критического состояния, поскольку эксплуатационные характеристики набора не определены вне этого периода.
2. Не следует использовать ЕАА™ после первого дня назначения интенсивной терапии, поскольку характеристики теста не определялись после этого срока.
3. Выявление позитивных результатов активности эндотоксина при отсутствии тяжелого сепсиса отмечались ранее в опубликованных материалах.
4. Результаты ЕАА™ следует рассматривать в контексте все лабораторных исследований и полного клинического состояния пациента. В случае, если лабораторные данные не соответствуют клинической картине или истории заболевания, следует выполнить дополнительное тестирование.

### **Ожидаемые результаты:**

#### А) Определение Грамм Негативной Инфекции

ЕАА™ это Анализ Активности с установленной числовой границей равной 0,4 для определения грамм-негативной инфекции. Результаты ниже 0,4 (0,00 – 0,39) отвечают абсенсу грамм-негативной инфекции при интенсивной терапии пациентов с подозрением на инфекцию.

Совместно с отделениями интенсивной терапии 10 институтов Европы и Северной Америки было проведено мульти-центровое исследование по определению активности эндотоксина при тяжелых состояниях (MEDIC). MEDIC исследование было проведено для определения эффективности показателей ЕАА™ в сравнении определением грамм-отрицательной инфекции в культуре клеток.

Инвазивная грамм-отрицательная инфекция у обследованных пациентов определяется в культуре в 36 случаях из 465 (8%). При использовании границы определения ЕАА<sup>™</sup> меньше 0,40 были получены следующие результаты:

	Грамм-неактивная инфекция отсутствует	Грамм-негативная инфекция встречается в соответствии с критерием СЕС*	Всего
< 0.40 (0.00-0.39) ЕАА <sup>™</sup>	134	8	142
>0.40 (0.40-1.00) ЕАА <sup>™</sup>	295	28	323
Всего	429	36	465
Негативная прогностическая ценность		94.4 (88.4 – 97.8)**	
Чувствительность		77.8 (56.3 – 92.1)**	
Специфичность		31.2 (25.3 – 37.7)**	
Положительная прогностическая ценность		8.7 (5.8 – 12.3)**	

\* Комитет клинической оценки (СЕС): Для получения соответствия относительно наличия или отсутствия инфекции, все культуры были проанализированы комитетом (СЕС) на бактериальный рост в соответствии с судебным решением.

\*\* 95% доверительный интервал

Также как и для всех видов диагностических тестов, каждая лаборатория должна устанавливать свои нормы значений теста в своем лечебном учреждении для более корректной интерпретации специфических групп, отражения конкретной практики и критериев определения грамм-негативной реакции.

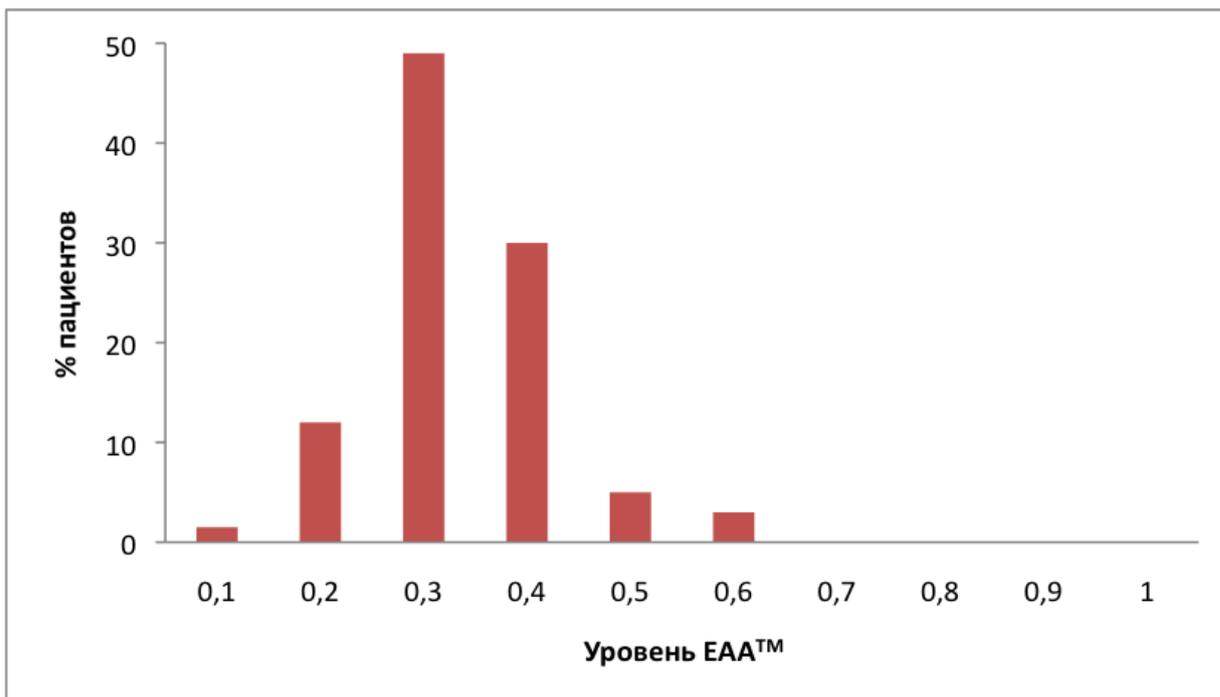
Результаты больше, чем 0,4 говорят о наличии эндотоксинов в крови. Рост уровня циркулирующего в крови эндотоксина могут вызывать различные факторы. Включая инвазивную грамм-негативную инфекцию и попадание эндотоксина из полости кишечника. Эндотоксин основной продукт грамм-негативных бактерий, вызывающий септический шок. Согласно исследованию MEDIC, у пациентов со значениями ЕАА<sup>™</sup> больше 0,6 вероятность сепсиса в 3 раза выше (Оценка Риска развития тяжелого сепсиса смотрите далее).

Точная диагностика первичных и вторичных причин эндотоксемии требует дальнейших клинических и диагностических методов для подтверждения причин и выбора методов лечения.

Б) Оценка риска тяжелого сепсиса

У лабораторного анализа ЕАА<sup>™</sup> для оценки активности эндотоксина три диапазона эндотоксемии: низкий: 0,00-0,39; повышенный: 0,40-0,59 и высокий: больше 0,6.

Рисунок. Гистограмма значений EAA™ для здоровых доноров.



Уровень EAA™ 0,4 соответствует стандартной девиации среднего +2. В группе здоровых доноров у 93% уровень ниже этого значения. Соответственно возможно допустить, что уровень 0,4 соответствует нижней границе для большинства здоровых людей. Также уровень EAA™ 0,60 соответствует стандартной девиации среднего +4. Возможны отклонения индивидуальных границ. Выявленные редкие и незначительные повышения уровня эндотоксина были отмечены в таких амбулаторных условиях, как в течение периодонтит 7 или курение сигарет 8. Никто из доноров не имел уровня EAA™ выше 0,6. Также это соответствует значимому уровню EAA™, значение выше которого может означать наличие неблагоприятного процесса.

**Клиническая эффективность:** Совместно с 10 институтами Европы и Северной Америки с отделениями интенсивной терапии было проведено мульти-центровое исследование по определению активности эндотоксина при тяжелых состояниях (MEDIC). Наличие эндотоксемии было оценено на первый день нахождения пациентов в ОРИТ для определения риска развития тяжелого сепсиса в первые 24 часа в условиях интенсивной терапии. Целевая группа для исследования по оценке риска включала всех возможных пациентов, вовлеченных в MEDIC на первые сутки после направления в палату интенсивной терапии с поддающимися оценке значениями, N=857. Демография пациентов представлена в следующей таблице.

Демографические и основные особенности анализированных пациентов.

Характеристика	
Возраст: среднее (SD) медиана [IQR]* лет	60 ( $\pm$ 17) 62 [49,74]
Пол (% мужской)	58.9%
Раса (% не белый)	15.8%
APACHE II: среднее (SD) медиана [IQR]*	15.2 ( $\pm$ 9.5) 14 [8,21]
Дней в палате интенсивной терапии: среднее (SD) медиана [IQR]*	5.4 ( $\pm$ 10.9) 2.0 [1,5]
Дней в госпитале: среднее (SD) медиана [IQR]*	23.3 ( $\pm$ 27.0) 14.0 [7,29]
Выживаемость в палате интенсивной терапии %	13.3%
Выживаемость в госпитале	19.9%

\*IQR – Интерквартильный диапазон

Для тестирования работоспособности EAA™ лучше всего подходят люди, находящиеся в критическом состоянии. Именно на пациентах в критическом состоянии было проведено тестирование эффективности EAA™. Соотношение между уровнем эндотоксина и риском развития тяжелого сепсиса у пациентов в критическом состоянии предназначено для дополнения имеющейся клинической информации для определения риска развития тяжелого сепсиса на первый день поступления в палату интенсивной терапии.

Результаты EAA™ и риск развития тяжелого сепсиса в течение первых 24 часов в отделении интенсивной терапии.

Уровень EAA™	Развитие тяжелого сепсиса в течение первых 24 часов	Соотношение	95% CI	Chi-квадрат, значение p
Низкий < 0,40 (0,00 – 0,39)	4.9 %			
Средний 0,40 – 0,59	9.2 %	2.0	1.02 – 3.78	4.3, <0.05
Высокий $\geq$ 0,60 (0.60 – 1.00)	13.4%	3.0	1.65 – 5.41	14.2, <0.001

Среди обследованных 857 пациентов, у 214 пациентов на 1 день наблюдали высокое (> 0.60) значение уровня EAA™, однако тяжелый сепсис не развился. Соответствующие клинические условия, которые могут способствовать эндотоксемии у этих пациентов включали: шок (N=30), гипоксемия (n=27), хроническая почечная недостаточность (n=25) и послеоперационный период (n=54). У некоторых пациентов наблюдали несколько составляющих.

## Характеристики производительности

### Влияние веществ.

Триглицериды при уровне вплоть до 1000 мг/дл не влияют на измерения EAA<sup>TM</sup>, при их концентрации выше 1500 мг/дл было отмечено снижение значение уровня EAA<sup>TM</sup>. При измерении EAA<sup>TM</sup> не следует использовать пробы крови с высоким содержанием жира. Гемоглобин не влияет на измерения EAA<sup>TM</sup> при уровне 100 мг/дл, тогда как его уровень 500мг/дл ослабляет низкое значение уровня EAA<sup>TM</sup> менее чем на 0,03 единицы и ослабляет повышенные значения EAA<sup>TM</sup> в среднем на 15%. Не следует использовать для анализа EAA<sup>TM</sup> пробы крови с высоким содержанием гемоглобина.

Экзогенное введение пациентам не содержащего эндотоксин альбумина в количестве, повышающем уровень альбумина в плазме более чем на 10г/л относительно верхней нормы, может снижать уровень EAA<sup>TM</sup>. У проб крови пациентов с высокобелковыми аномалиями или получающими альбуминовую терапию следует проводить процедуры удаления белков, для уверенности в том, что уровень удаленного альбумина не является источником искажения значений EAA<sup>TM</sup>.

Точность: Были проанализированы пробы цельной крови, крупного рогатого скота и пробы с добавленным эндотоксином на трех приборах в восьми повторях.

Согласно процедуре NCCLS в EP5-A были посчитаны общая точность и повторяемость результатов.

Проба	N	Среднее EAA <sup>TM</sup>	В рамках измерения *		Общая точность *	
			1SD	%CV	1SD	%CV
1	24	0.11	0.015	14	0.023	22
2	24	0.20	0.030	15	0.029	14
3	24	0.30	0.043	15	0.042	14
4	24	0.50	0.059	12	0.064	13
5	24	0.52	0.036	7	0.034	6
6	24	0.59	0.050	8	0.046	8

\* CV - допустимое отклонение; SD1 - коэффициент вариации

**Чувствительность:** Для оценки чувствительности метода EAA<sup>TM</sup> была использована кровь пациента с низким уровнем EAA<sup>TM</sup>. 24 измерения EAA<sup>TM</sup> были сделаны для одного пациента с низким уровнем EAA<sup>TM</sup>, на 3 приборах по восемь измерений для каждой пробы. Среднее значение уровня EAA пациента было 0,11, стандартное отклонение составило 0,023. Таким образом чувствительность, методом 2 стандартных отклонений, оценивается в 0,046 единиц EAA<sup>TM</sup>.

**Специфичность:** Эндотоксин грамм-отрицательных бактерий, *E.coli* 055:B5, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. enterides*, *E. coli* 0127:B8, *S. marcescens* и *S. flexneri* индуцирует рост уровня ЕАА<sup>TM</sup> на 0,1...0,52 единицы, при добавлении 100 пг/мл эндотоксина к крови со средним значением ЕАА<sup>TM</sup> 0,33 единиц. Также, липополисахариды *V. cholerae* статистически значимо увеличивают значение ЕАА<sup>TM</sup>. Не отмечено влияния экстракт липотейхоевой кислоты вплоть до 2000пг/мл, полученной от штаммов грамм-положительных бактерий: *S. mutans*, *S. pyogenes*, *S. sanguis*, *S. aureus* и *B. subtilis*. Также не отмечена реакционная способность на маннаны дрожжей вплоть до 2000пг/мл и экстракты клеточной стенки *C. Albicans* и *A. Fumagatis*.

**Линейность результатов:** Реактив был оптимизирован для высокой чувствительности при низком уровне эндотоксина и устойчивости вызываемому при высоком уровне эндотоксина эффекту захвата. Поэтому зависимость нелинейной формы. Когда пробы пациентов содержат низкий уровень эндотоксина, его незначительное увеличение соответствует значительному росту ЕАА<sup>TM</sup> уровня. Для проб с высоким уровнем ЕАА<sup>TM</sup> не требуется разведение.

Дополнительная литература:

1. Van Deventer SJH, et al. Endotoxemia: an early predictor of septicemia in febrile patients. *The Lancet* (March 19) 1988; 605-609.
2. Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, et al. Septic shock in humans: advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Int Med* 1990; 113: 227-242.
3. Zhao B, Bowden RAS, Stavchansky SA, et al. Human endothelial cell response to gram-negative lipopolysaccharide assessed with cDNA microarrays. *Am J Cell Physiol* 2001; 281: C1587-C1595.
4. Romaschin AD, et al. A rapid assay of endotoxin in whole blood using autologous neutrophil dependent chemiluminescence. *J. of Immunology. Methods* 1998; 212: 169-185.
5. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 711 East Lancaster Avenue, Villanova, PA 19085) Document # M29-A Protection of Laboratory Worker from Instrument Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissues; Approved Guideline, 1997.
6. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 711 East Lancaster Avenue, Villanova, PA 19085) Document # H3-#a Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture – Third Edition; Approved Standard, 1991.
7. Geerts SO, Nys M, De MP, et al. Systemic release of endotoxins induced by gentle mastication: association with periodontitis severity. *J Periodontal* 2002; 73(1): 73-78.
8. Hasday JD, Bascom R, Costa JJ, et al. Bacterial endotoxin is an active component of cigarette smoke. *Chest* 1999; 115(3): 829-835.
9. Van Langevelde, P, Joop, K, van Loon, et al. Endotoxin, cytokines, and procalcitonin in febrile patients admitted to the hospital: identification of subjects at high risk of mortality. *CID* 2000; 31(December): 1343-1348.
10. Murphy DB, Cregg N, Tremblay L, et al. Adverse ventilatory strategy causes pulmonary-to-systemic translocation of endotoxin. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; Jul 162(1): 27-33.
11. Bion JF, Badger I, Crosby HA, et al. Selective decontamination of the digestive tract reduces Gram-negative pulmonary colonization but not systemic endotoxemia in patients undergoing elective liver transplantation. *Crit Care Med* 1994; 22: 40-49.
12. Gaeta GB, Perna P, Adinolfi LE et al. Endotoxemia in a series of 104 patients with chronic liver diseases: prevalence and significance. *Digestion* 1982; 23: 239-244.
13. Soong CV, Blair PHB, Halliday ML et al. Endotoxemia, the generation of the cytokines and their relationship to intramucosal acidosis of the sigmoid colon in elective abdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Surg* 1993; 7: 534-539.
14. Roumen RMH, Frieling JTM, van Tits HWHJ et al. Endotoxemia after major vascular operations. *J Vasc Surg* 1993; 18:853-857.
15. Schlag G, Redl H, Dinges HP, Davies J. Sources of endotoxin in the posttraumatic setting. *Bacterial Endotoxins: Cytokine Mediators and New Therapies for Sepsis*: 121-134.
16. Jansen PGM, Te Velthuis H, Oudemans-Van Straaten HM, et al: Perfusion-related factors of endotoxin release during cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardio-thorac Surg* 1994; 8:125-129.

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE ONLY

Manufactured by:

Spectral Diagnostics Inc.

135 The West Mall

Toronto, ON Canada

M9C 1C2

(416)-626-3233

FAX: (416)-626-7383

[www.spectraldx.com](http://www.spectraldx.com)

## Приложение А

### ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ АНАЛИЗА АКТИВНОСТИ ЭНДОТОКСИНА (ЕАА™)

Для выполнения ЕАА™ требуется следующее лабораторное оборудование:

- Хемилюминометр, такой как Berthold Smartline TL
- Инкубационная камера (37°C) с мешалкой (с режимом 100 об/мин)
- Комбинированная пипетка с возможностью отбора объема 40 и 1000 мкл
- Пипетка с возможностью отбора объема 500 мкл
- Таймер
- Вихревая мешалка (вортекс)

Система ЕАА™ поставляется в виде набора. В каждом наборе для анализа активности эндотоксина содержится 20 ЕАА™ тестов, упакованных в 4 лотка, вложенных в пакет из фольги, два флакона с реагентами для анализа активности эндотоксина.

В каждом наборе ЕАА™ содержится индивидуально упакованный тест контроля качества.

Весь набор ЕАА™ следует хранить при температуре 2-8°C. В качестве альтернативы, если место для хранения в холодильнике вашего учреждения ограничено, можно хранить в нем только два флакона с реагентами ЕАА™, поскольку невскрытые пакеты из фольги можно хранить при комнатной температуре.

#### Порядок выполнения анализа

Анализ активности эндотоксина выполняется с дублированием – в каждом лотке ЕАА™ содержится 5 пар тестов.

Каждый ЕАА™ тест состоит из пробирки 1 (контроль), пробирки 2 (образец) и пробирки 3 (максимум) – по два экземпляра каждой пробирки, плюс одна аликвотная пробирка для хранения крови и 1 пробирка LPS Max, содержащая экзогенный эндотоксин.

Образцы крови пациентов должны собираться в стерильные пробирки для сбора крови, содержащие антикоагулянт ЭДТА, и перед использованием должны храниться при комнатной температуре.

Перед началом анализа активности эндотоксина проверьте срок годности продукта и убедитесь, что хемилюминометр Berthold SmartLine включен, а инкубатор с мешалкой прогрет до 37°C.

1. Установите пробирки ЕАА™ для каждого образца пациента в штатив для пробирок и снимите крышки.
2. При помощи комбинированной пипетки внесите 1 мл реагента ЕАА™ в пробирки 1, 2 и 3, и в их дубликаты.
3. Осторожно перемешайте образец крови пациента, плавно покачивая пробирку, внесите 0,5-мл аликвоты непосредственно в аликвотную пробирку и в пробирку LPS MAX. Перемешайте содержимое пробирки LPS MAX на вихревой мешалке.

4. Поместите штатив в инкубационную камеру 37°C с мешалкой, закройте крышку и инкубируйте в течение 10 минут.
5. После 10-минутной инкубации извлеките штатив, перемешайте содержимое аликвотной пробирки на вихревой мешалке и, используя стерильный наконечник комбинированной пипетки, внесите 40 мкл крови в пробирки 1 и 2, и в их дубликаты.
6. Перемешайте содержимое пробирки LPS MAX на вихревой мешалке, затем, используя тот же наконечник комбинированной пипетки, внесите 40 мкл крови в пробирку 3 и в ее дубликат.
7. Перемешайте на вихревой мешалке пробирки 1, 2 и 3, и поместите их обратно в штатив, затем поставьте штатив в инкубационную камеру 37°C с мешалкой, закройте крышку, запустите мешалку (100 об/мин) и таймер (14 минут).
8. Вставьте маркированную чип-карту ЕАА™ в хемолюминометр и нажмите Пуск.
9. После 14-минутной инкубации выполните инструкции, отображаемые на экране хемолюминометра для того, чтобы получить данные для пробирок ЕАА™ в надлежащем порядке.
10. Осторожно перемешайте на вихревой мешалке каждую пробирку, откройте отсек для образца и поместите пробирку 1 в держатель для образца, закройте отсек для образца, подождите до считывания показаний в единицах RLU. Повторите действия для пробирки 2, затем для пробирки 3.
11. Повторите этот процесс для дублирующего анализа.
12. После считывания показаний со всех пробирок результаты ЕАА™ рассчитываются и распечатываются автоматически.

Для выполнения оставшихся анализов поместите лоток обратно в пакет из фольги, закройте его и храните при температуре 2-8°C до 30 суток.

### **Интерпретация результатов (см. Инструкцию по применению):**

0.0 – 0.39 Единиц ЕАА™ – низкий уровень активности эндотоксина означает а) признак отсутствия грам-негативной инфекции и б) низкий риск развития тяжелого сепсиса.

0.40 – 0.59 Единиц ЕАА™ – средний уровень активности эндотоксина означает повышенный риск развития тяжелого сепсиса.

≥ 0.60 Единиц ЕАА™ – высокий уровень активности эндотоксина означает высокий риск развития тяжелого сепсиса.

## Приложение Б

### ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА (QC) АНАЛИЗА АКТИВНОСТИ ЭНДОТОКСИНА (ЕАА™)

Рекомендуется проводить контроль качества (QC) Анализа Активности Эндотоксина (ЕАА™) минимум один раз за время применения одной упаковки ЕАА™.

Регулярность и время проведения QC могут соответствовать местным стандартам.

Для выполнения ЕАА™ требуется следующее лабораторное оборудование:

- Хемилюминометр, такой как Berthold Smartline TL
- Инкубационная камера (37°C) с мешалкой (с режимом 100 об/мин)
- Комбинированная пипетка с возможностью отбора объема 40 и 1000 мкл
- Пипетка с возможностью отбора объема 500 мкл
- Таймер
- Вихревая мешалка (вортекс)

#### Порядок выполнения анализа

Перед началом анализа активности эндотоксина проверьте срок годности продукта и убедитесь, что хемоллюминометр Berthold SmartLine включен, а инкубатор с мешалкой прогрет до 37°C.

1. Установите пробирки QC в штатив для пробирок и снимите крышки.
2. При помощи комбинированной пипетки внесите 1 мл реагента ЕАА™ в каждую пробирку.
3. Внесите 0,5-мл аликвоты крови непосредственно в аликвотную пробирку QC и в пробирку QC LPS MAX. Перемешайте содержимое пробирки LPS MAX на вихревой мешалке.
4. Поместите штатив в инкубационную камеру 37°C с мешалкой, закройте крышку и инкубируйте в течение 10 минут.
5. После 10-минутной инкубации извлеките штатив, перемешайте содержимое аликвотной пробирки QC на вихревой мешалке и, используя стерильный наконечник комбинированной пипетки, внесите 40 мкл крови в обе пробирки 1 и пробирку Low Control.
6. Перемешайте содержимое пробирки QC LPS MAX на вихревой мешалке, затем, используя тот же наконечник комбинированной пипетки, внесите 40 мкл крови в пробирку High Control (вначале!) и обе пробирки 3.
7. Перемешайте на вихревой мешалке все пробирки и поместите их обратно в штатив, затем поставьте штатив в инкубационную камеру 37°C с мешалкой, закройте крышку, запустите мешалку (100 об/мин) и таймер (14 минут).
8. Вставьте маркированную чип-карту ЕАА™ QC в хемоллюминометр и нажмите Пуск.

9. После 14-минутной инкубации выполните инструкции, отображаемые на экране хемолуцинометра для того, чтобы получить данные для пробирок EAA™ QC в надлежащем порядке.

10. Осторожно перемешайте на вихревой мешалке каждую пробирку, откройте отсек для образца и поместите пробирку в держатель для образца, закройте отсек для образца, подождите до считывания показаний в единицах RLU. Повторите действия для всех пробирок.

11. После считывания показаний со всех пробирок результаты EAA™ QC рассчитываются и распечатываются автоматически.

Для выполнения оставшихся анализов поместите лоток обратно в пакет из фольги, закройте его и храните при температуре 2-8°C до 30 суток.

### **Интерпретация результатов и рекомендуемые действия:**

Тест EAA™ QC считается пройденным успешно, если:

$$EAA^{\text{TM}} \text{ Low QC} \leq 0.20$$

$$EAA^{\text{TM}} \text{ High QC} \geq 0.80$$

Если результаты QC теста для Low и High контролей не соответствуют ожидаемым результатам, то тест необходимо повторить.

Если повторный QC тест также даст результаты за пределами ожидаемых величин, то данные анализа EAA™ должны быть подвергнуты сомнению.

Пожалуйста, немедленно сообщите об этом производителю или его представителю.