

AspirinWorks® Test Kit (11-Dehydro Thromboxane B₂)

For In Vitro Diagnostic Use

INTENDED USE

The AspirinWorks® Test Kit is an enzyme-linked immunoassay (ELISA) to determine levels of 11-Dehydro Thromboxane B₂ (11dhTxB₂) in human urine, which aids in the detection of aspirin effect post ingestion.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE ASSAY

Activated and aggregated platelets play a key role in the pathogenesis of cardiovascular disease. Activated platelets produce Thromboxane A₂ (TxA₂), a potent vasoconstrictor and inducer of platelet aggregation.¹⁻² TxA₂ is generated by Thromboxane synthase from molecules derived from arachidonic acid by cyclooxygenase-1 (COX-1).^{1,3} TxA₂ has a short half-life in plasma and is rapidly hydrolyzed to Thromboxane B₂ (TxB₂). TxB₂, in turn, is metabolized to 11-Dehydro Thromboxane B₂ (11dhTxB₂), 11-Dehydro 2,3 dinor Thromboxane B₂ (11dh2,3DTxB₂, a truncated form of 11dhTxB₂), and a number of other minor TxB₂ metabolites which are excreted by the kidney.⁴⁻⁷ Thus, 11dhTxB₂ is a stable metabolite of TxA₂ and an indicator of platelet activity.

An important part of antiplatelet therapy in cardiovascular disease is aspirin (acetylsalicylic acid), which has been known for many years to have antiplatelet activity.⁸ Aspirin functions by acetylating and irreversibly inhibiting COX-1, thus inhibiting the production of TxA₂ and its metabolites.⁹⁻¹¹ Low dose aspirin blocks more than 95% of platelet COX-1 activity¹²⁻¹³ and reduces cardiovascular events by as much as 25% in patients with arterial vascular disease.¹⁴ However, aspirin response varies among individuals. It has been estimated that 10-20% of aspirin users have recurrent thrombotic events.¹² This phenomenon has been referred to as aspirin resistance¹⁵⁻¹⁶ and 5-57% of aspirin users may demonstrate a poor response to typical doses, depending on the measuring technique used and the population analyzed.¹⁷⁻²¹

There are a number of blood-based methods that determine an individual's response to daily aspirin therapy by measuring *ex vivo* platelet activation.^{15,22} These methods, however, are influenced by factors unrelated to aspirin's specific effect on the cyclooxygenase pathway including von Willebrand factor (vWF), Factor VIII, and hematocrit levels, as well as other variables involved in venipuncture. Alternatively, the measurement of stable metabolites of TxA₂, such as urinary 11dhTxB₂, is a means of quantitating TxA₂ production *in vivo* and thus a direct way to analyze aspirin's effect post ingestion.^{7,23-25} The AspirinWorks® test may determine if the aspirin dosage ingested by an individual is inhibiting platelet cyclooxygenase activity through the measurement of 11dhTxB₂.

PRINCIPLE OF THE TEST

The AspirinWorks® Test Kit measures urinary 11dhTxB₂ and is performed as a competitive ELISA. Diluted samples (Reference Solution, controls, and patient urine), purified 11dhTxB₂ conjugated to alkaline phosphatase (AP), and purified mouse monoclonal antibody directed to 11dhTxB₂ are combined and incubated in microwells coated with a polyclonal anti-mouse antibody. Incubation allows the endogenous 11dhTxB₂ present in the samples to compete with the purified AP-conjugated 11dhTxB₂ for binding to the mouse monoclonal anti-11dhTxB₂ antibody. The monoclonal antibody then binds to the polyclonal anti-mouse antibody coated on the microtiter plate. The complex formed on the plate is composed of monoclonal antibody and endogenous or AP-conjugated 11dhTxB₂. After the removal of unbound complexes by washing, the bound AP-11dhTxB₂ conjugate is assayed by the addition of para-nitrophenylphosphate (pNPP) chromogenic substrate. Color develops in the wells at an intensity inversely proportional to the sample urine concentration of 11dhTxB₂, and is read at 405nm. Results (pg/mL) are calculated against a reference curve prepared from the Reference Solution provided in the kit.

Final Results are reported as pg 11dhTxB₂ per mg creatinine to normalize results for urine concentration.

REAGENTS

Store at 2–8°C. Do Not Freeze.

Each AspirinWorks® Test Kit contains the following reagents
(volumes may vary depending on kit size and configuration):

- 12 x 8 stabilized antibody (goat) coated microwells, with frame.
- 60 mL Sample Diluent* (green capped bottle).

- 1.75 mL 5000 pg/mL Reference Solution* (11dhTxB₂ in buffer), for preparation of the reference curve; refer to vial label for lot specific correction factor.
- 1 vial lyophilized Level 1 Control (human urine) to be reconstituted to 0.5 mL with purified water; see vial label for expected range.
- 1 vial lyophilized Level 2 Control (human urine) to be reconstituted to 0.5 mL with purified water; see vial label for expected range.
- 1 vial lyophilized Level 3 Control (human urine) to be reconstituted to 0.5 mL with purified water; see vial label for expected range.
- 10 mL AP-Tracer Solution, red solution (purified 11dhTxB₂ conjugated to alkaline-phosphatase).
- 10 mL Antibody Solution (murine), blue solution (purified anti-11dhTxB₂ antibody).
- 23 mL One-Component pNPP Substrate (para-nitrophenylphosphate, stabilized); ready to use.
- 15 mL Stopping Solution (0.1 M EDTA); ready to use (red cap).
- 2 x 50 mL Wash Concentrate TBS/Tween 20 (20X).
- 2 adhesive plate sealers.

* **CAUTION: Contains sodium azide**

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For In Vitro Diagnostic Use

1. Human source material used to prepare the controls included in this kit should be handled as potentially infectious material. Use universal precautions when handling.
2. Do not pipette by mouth.
3. Do not smoke, eat, or drink in areas where specimens or kit reagents are handled.
4. Wear disposable gloves while handling kit reagents and wash hands thoroughly afterwards.
5. pNPP substrate can cause irritation to the eyes. Absorption through the skin is possible. Use gloves when handling substrate and wash thoroughly after handling.
6. Certain components of this product contain sodium azide as a preservative (Sample Diluent and Reference Solution). Sodium azide has been reported to form lead and copper azides when left in contact with these metals. These metal azides are explosive. Any solutions containing azide must be thoroughly flushed with copious amounts of water to prevent the build-up of explosive metal azides in the plumbing system.
7. Certain components are labeled with the following:
Irritating to eyes (R 36). Irritating to skin (R 38). Avoid contact with skin (S 24). Avoid contact with eyes (S 25). In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice (S 26). Wear suitable protective clothing (S 36). If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label (S 46).

Irritant  Biological Risk .

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Human urine is the recommended sample matrix. Samples should be collected and tested within four hours. If not tested immediately, samples should be stored at 2-8°C. If samples are to be stored for more than 24 hours, they should be frozen at ≤ -20°C. Fresh or thawed samples should be centrifuged at 1000xg for 15 minutes prior to running test. Each sample must be tested for both creatinine and 11dhTxB₂ for accurate results.

INSTRUCTIONS FOR USE

Materials Provided:

AspirinWorks® Test Kit; see "Reagents" for a complete listing.

Materials Required but not Provided:

- Reagent grade water to prepare TBS/Tween 20 wash solution and lyophilized components
- Graduated cylinders
- Precision pipettors capable of delivering between 50 µL and 1000 µL, with appropriate tips
- Miscellaneous glassware appropriate for small volume handling
- Flask or bottle, 1 liter
- Wash bottles, preferably with the tip partially cut back to provide a wide stream, or an automated or semi-automated washing system

- Disposable gloves
- Plate reading spectrophotometer capable of reading absorbance between 405 and 420 nm
- Multichannel pipettors capable of delivering to 8 wells simultaneously
- Rotary shaker capable of 300 - 600 rpm (Speeds of 300-600 rpm are acceptable, however 600 rpm is recommended)

Procedural Notes

1. Obtain urinary creatinine values for each patient sample.
2. Bring urine samples and kit reagents to room temperature (18–26°C) and mix well before using; avoid foaming. Return all unused reagents to refrigerated storage as soon as possible. Remaining controls may be dispensed into single-use aliquots and frozen at -20°C or below for subsequent use.
3. Frozen samples should be thawed and centrifuged at 1000xg before testing.
4. All dilutions of the Reference Solution, Controls, and patient samples must be made just prior to use in the assay.
5. The plate reader should be programmed to air blank.
6. Good washing technique is critical for optimal performance of the assay. Adequate washing is best accomplished by directing a forceful stream of wash solution from a plastic squeeze bottle with a wide tip into the bottom of the microwells. An automated microtiter plate washing system can also be used.
IMPORTANT: Failure to adequately remove residual TBS/Tween 20 can cause inconsistent color development of the Substrate Solution.
7. Use a multichannel pipettor capable of delivering to 8 wells simultaneously when possible. This speeds the process and provides more uniform incubation and reaction times for all wells.
8. Add reagents carefully to the side of the microwells to avoid well-to-well pipet tip contamination, or change tips with each row of reagent addition.
9. Carefully controlled timing of all steps is critical. All Reference Solution dilutions, Controls, and samples must be added as quickly and consistently as possible.
10. For all incubations, the start of the incubation period begins with the completion of reagent or sample addition.
11. Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence with the samples, controls, and Reference Solution dilutions added first, followed by the tracer. The monoclonal antibody must be added last.
12. Incubation temperatures other than normal room temperature (18–26°C) may contribute to inaccurate results.
13. Avoid contamination of reagents when opening and removing aliquots from the primary vials.
14. Do not use kit components beyond expiration date.
15. Do not mix kit components from different kit lot numbers.

Reagent Preparation

Wash Solution (TBS/Tween 20): Measure 50 mL of Wash Concentrate (20X TBS/Tween 20) and dilute to 1 liter with reagent grade water. Store unused TBS/Tween 20 solution in the refrigerator at 2–8°C . Discard if the solution shows signs of microbial contamination.

Urine controls: Reconstitute urine controls (Levels 1, 2, and 3) with 0.5 mL reagent grade water. Swirl gently and allow 10 minutes for reconstitution. Unused portions may be dispensed into single-use aliquots and frozen at ≤ -20°C for up to one year.

Assay Procedure

1. Remove any microwell strips that will not be used from the frame. Store them with the desiccant packet in the resealable bag provided.
2. Prepare the reference curve. Label six tubes #1-6. Add 500 µL AspirinWorks® 5000 pg/mL Reference Solution to tube #1. Add 250 µL Sample Diluent to tubes #2-6. Remove 250 µL from tube #1, transfer to tube #2 and mix well. Repeat this 1:2 serial dilution series through tube #6. The resulting prepared standards are 5000, 2500, 1250, 625, 312.5, and 156.25 pg/mL.
3. Prepare a 1:5 dilution of the controls and patient samples in Sample Diluent, e.g., 100 µL sample added to 400 µL Sample Diluent equals a 1:5 sample dilution.
4. Duplicate well determinations are recommended for Reference Solution, patient and control samples. Mix all sample dilutions thoroughly, and add 100 µL of the dilutions (6 Reference Solution dilutions, patient samples and controls) to the appropriate microwells.

5. A maximum binding sample (B_0) should be run (the B_0 contains antibody and tracer, but no competing analyte). Add 100 μ L Sample Diluent to duplicate wells designated for the B_0 .
6. An assay blank should also be run. Leave duplicate assay blank wells empty.
7. Add 50 μ L AP-Tracer Solution (red) to each of the 6 Reference Solution wells, patient sample wells, control wells and the B_0 wells. Leave the assay blank wells empty.
8. Add 50 μ L Antibody Solution (blue) to each of the 6 Reference Solution wells, patient sample wells, control wells, and B_0 wells. Leave the assay blank wells empty.

Microwells should contain the following reagent volumes:

<u>Reference Curve</u>	<u>AP-Tracer Solution</u>	<u>Antibody Solution</u>
100 μ L 5000 pg/mL	50 μ L	50 μ L
100 μ L 2500 pg/mL	50 μ L	50 μ L
100 μ L 1250 pg/mL	50 μ L	50 μ L
100 μ L 625 pg/mL	50 μ L	50 μ L
100 μ L 312.5 pg/mL	50 μ L	50 μ L
100 μ L 156.25 pg/mL	50 μ L	50 μ L
100 μ L Sample Diluent (B_0)	50 μ L	50 μ L
<u>Samples/Controls</u>	<u>AP-Tracer Solution</u>	<u>Antibody Solution</u>
100 μ L	50 μ L	50 μ L

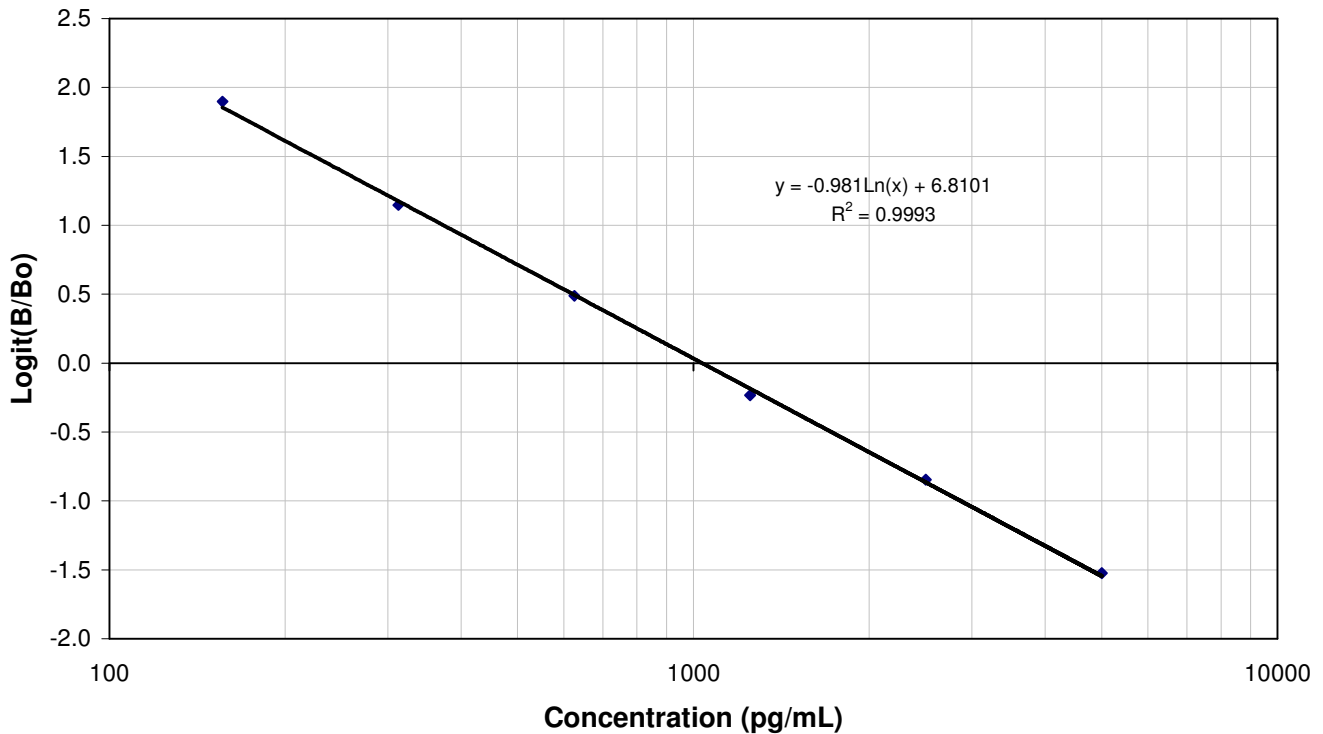
9. Cover plate with adhesive plate sealer provided and incubate 2 hours at room temperature (18-26°C) on a rotary shaker at 300-600 rpm. After the incubation is complete, grip the microplate frame firmly on the top and bottom to retain microwell modules and carefully invert the microwells to empty the sample fluid. Do not allow samples to contaminate other microwells.
10. Wash 5 times with room temperature wash solution. Each well should be completely filled with TBS/Tween 20 per wash. Invert microwells between each wash to empty fluid. Use a snapping motion of the wrist to shake the liquid from the wells. Blot on absorbent paper to remove residual wash fluid. Do not allow wells to dry out between steps.
11. Add 200 μ L pNPP Substrate to each well including B_0 and assay blank wells, cover with a fresh adhesive plate sealer, and incubate for 30 minutes at room temperature with rotary shaking. Add the substrate to the wells at a steady rate. A yellow color will develop in wells inversely proportional to the amount of 11dhTx B_2 present.
12. Add 100 μ L Stopping Solution to each well, including B_0 and assay blank wells, to stop the enzyme reaction. Be sure to add Stopping Solution to the wells in the same order and at the same rate as the Substrate was added.
13. Air blank or zero the plate reader. Read the O.D. of each well between 405 and 420 nm. The O.D. values should be measured within 1 hour after the addition of Stopping Solution.

Results

Assay results should be calculated by log-logit analysis with a “best fit” line drawn through the reference points, or by other validated curve analysis. Interpolate control and patient relative values from the reference curve, and multiply the relative values by the Correction Factor for the Reference Solution (see vial label). Normalize patient results by incorporating creatinine levels, i.e divide the 11dhTx B_2 result (in pg/mL) by the creatinine result for the patient sample (in mg/dL) and multiply by 100. The patient result may be reported as pg 11dhTx B_2 /mg creatinine. Ensure that all quality control parameters have been met (see Quality Control) before reporting test results.

An example of an 11dhTx B_2 Reference Curve is shown below. This reference curve is for the purposes of illustration only. A reference curve should be generated by the user for each assay performed.

Reference Curve (Example Only - do not use)



Results Calculations

Calculate the following for each concentration used in the reference curve and for each patient sample, based on the individual well OD:

$$P = \frac{\text{(Individual OD for that concentration - Mean OD for Blank wells)}}{\text{(Mean OD for } B_0 \text{ - Mean OD for Blank wells)}}$$

Note that for each reference level and each patient sample one expects P to be between zero and one or do not proceed with calculations. Then calculate:

$$Y = \text{Log}(P/(1-P)) \text{ for each patient sample and for each reference level}$$

$$Y = \text{average from two individual well values}$$

Plot Y versus $X = \log(x)$ for each reference level where x is the actual concentration for that reference. Points should fall very close to a straight line. One can use log base 10 throughout or alternatively log base e (natural logarithm) but one should not mix the two log systems. Perform a linear regression and keep track of the slope (a_1), intercept (a_0), and R^2 value. The latter should be greater than 0.95 to proceed.

Now you can proceed to evaluate your patient results by using the value of Y calculated for each patient, solving for X and then obtaining a value for your patient samples:

$$Y = a_1X + a_0 \quad \text{or} \quad X = (Y - a_0)/a_1$$

Patient relative value is: 10^X if you used log base 10
 $\exp(X)$ if you used the natural log

Determine the mean of duplicate X values.

X= average from two individual well values

To calculate the level of 11dhTxB₂ in pg/mL, multiply the control and patient relative values by the Correction Factor for the Reference Solution (see vial label).

Normalize patient results by incorporating creatinine levels. Divide the 11dhTxB₂ result (in pg/mL) by the creatinine result for the patient sample (in mg/dL) and multiply by 100. The patient result may be reported as pg 11dhTxB₂/mg creatinine.

Example:

- Patient relative value: 1000
- Reference Solution Correction Factor: 1.05
- Actual patient 11dhTxB₂ value: 1000 x 1.05 = 1050 pg/mL.
- Patient creatinine value = 150 mg/dL
- Final reported value: (1050 pg/mL/150 mg/dL)*100 = 700 pg 11dhTxB₂/mg creatinine
- In this example, the result of 700 pg 11dhTxB₂/mg creatinine is below the 1500 pg 11dhTxB₂/mg creatinine cutoff point, suggesting that aspirin effect is detected.

Interpretation of Results

The sample result is based on the level of 11-Dehydro Thromboxane B₂ measured in the urine sample, normalized by the concentration of urine creatinine in the same sample, and reported in pg/mg quantities. Interpretation of results is based on the following assigned cutoffs:

Interpretation of Results:

> 1500 pg/mg Normalized Levels of 11-Dehydro Thromboxane B₂ indicate a lack of aspirin effect

≤ 1500 pg/mg Normalized Levels of 11-Dehydro Thromboxane B₂ indicate an aspirin effect

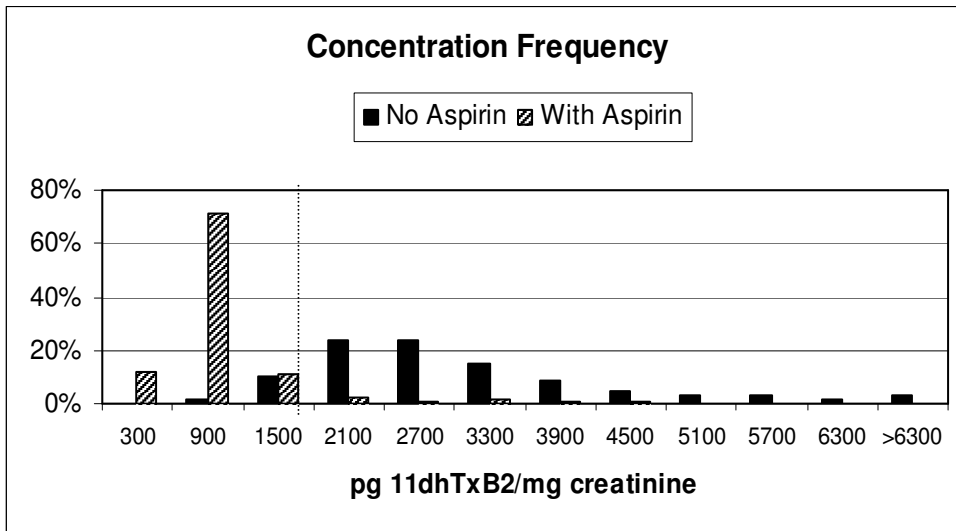
QUALITY CONTROL

1. The mean O.D. of the B₀ (maximum binding) wells should be ≥ 0.600. Readings less than 0.600 may indicate possible reagent contamination or inadequate plate washing.
2. The mean O.D. of the assay blank (zero point) should be ≤ 0.300. Readings greater than 0.300 may indicate possible reagent contamination or inadequate plate washing.
3. The 11dhTxB₂ values obtained for the controls should be within the ranges indicated on the container labels.
4. Each laboratory should periodically determine their own normal range for the appropriate population of patients.
5. Samples with values outside 300 – 4000 pg/mL are outside the linear range of the reference curve and may be retested at an appropriate dilution. If a sample value is below 300 pg/mL, the sample may be retested using a fresh aliquot at a 1:2 dilution in Sample Diluent (250 µL sample + 250 µL Sample Diluent). If a sample value is above 4000 pg/mL, the sample may be retested using a fresh aliquot at a 1:10 dilution (50 µL sample + 450 µL Sample Diluent) or a 1:20 dilution (25 µL sample + 475 µL Sample Diluent).
6. O.D.s for the duplicates of the controls or patient samples should be within 20% of the mean O.D. value for samples within the 300 – 4000 pg/mL range.
7. R² values for the Reference curve should be ≥ 0.95.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Expected Values:

Performance characteristics of the AspirinWorks® Test Kit were evaluated in a study involving 166 apparently healthy adults before and/or after receiving controlled doses of aspirin (201 samples from individuals on aspirin and 204 samples from individuals not on aspirin). 11-Dehydro Thromboxane B₂ concentrations were measured and normalized by dividing by the concentration of creatinine. A frequency distribution graph of the 405 samples is shown below. Based on these frequencies, a cutoff was established at 1500 pg 11dhTxB₂ per mg urinary creatinine.



Clinical Performance:

The clinical performance of the Corgenix AspirinWorks® test was also evaluated in these individuals. AspirinWorks® results are presented as positive or negative, based on a cutoff of 1500 pg 11-Dehydro Thromboxane B₂ per mg urinary creatinine. A table is presented for both 81 mg and 325 mg aspirin doses.

		Aspirin Ingestion	
		Present	Absent
AspirinWorks® Result 81 mg	Positive (≤1500 pg/mg creatinine)	156	20
	Negative (>1500 pg/mg creatinine)	7	146
	Total	163	166

Overall Percent Agreement = 91.8%
 Positive Percent Agreement = 95.7%
 Negative Percent Agreement = 88.0%

		Aspirin Ingestion	
		Present	Absent
AspirinWorks® Result 325 mg	Positive (≤1500 pg/mg creatinine)	34	4
	Negative (>1500 pg/mg creatinine)	4	34
	Total	38	38

Overall Percent Agreement = 89.5%
 Positive Percent Agreement = 89.5%
 Negative Percent Agreement = 89.5%

Predicate Device Comparison

The AspirinWorks® Test Kit was compared with the Accumetrics® VerifyNow™ Aspirin Assay using 173 urine samples from apparently healthy adults. The data is presented in the table below.

		VerifyNow™ Result	
		Positive (<550 ARU)	Negative (≥550 ARU)
AspirinWorks® Result	Positive (≤1500 pg/mg creatinine)	77	11
	Negative (>1500 pg/mg creatinine)	7	78
Total		84	89

Overall Percent Agreement = 89.6%
Positive Percent Agreement = 91.7%
Negative Percent Agreement = 87.6%

Analytical Performance:

Detection Range:

The detection range for 11-Dehydro Thromboxane B₂ in the AspirinWorks® Test Kit is 300 – 4000 pg/mL urine. For greatest accuracy, samples that generate values greater than 4000 pg/mL should be retested at an appropriate dilution. The analyte concentration reported should be normalized by dividing the measured 11dhTxB₂ by the concentration of creatinine as measured by a separate assay.

Precision:

Three urine samples were run on 24 wells/plate over three plates/lot, repeated on three lots for a total of 216 measurements per urine sample. A test outcome is defined as the average of two measurements, so the study design results in 108 test measurements (12 per plate over three plates/lot run on three lots of plates) on which to base the precision calculations shown in the table below.

Urine #	Mean 11-DehydroThromboxane B₂ Concentration	Repeatability as %CV	Within-Laboratory Precision as %CV
1	424 pg/mL	8%	14%
2	1399 pg/mL	5%	7%
3	3380 pg/mL	5%	10%

Interference:

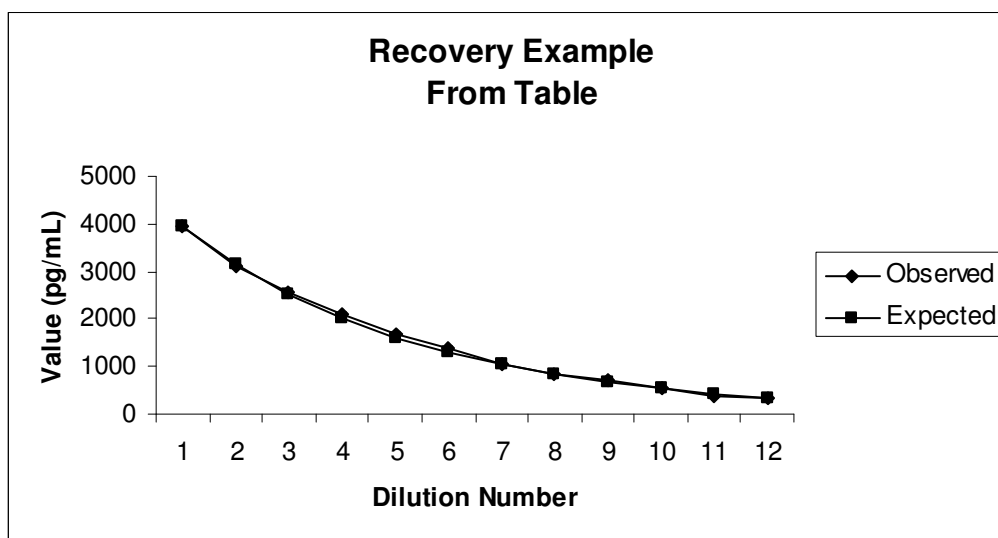
Samples were tested for potential interference. The following materials had no significant effect on the measured concentration of 11-Dehydro Thromboxane B₂:

Compound	Concentration
Acetaminophen	200 mg/dL
Acetylsalicylic Acid	200 mg/dL
Ascorbic Acid	200 mg/dL
Caffeine	200 mg/dL
Gentisic Acid	200 mg/dL
Glucose	2000 mg/dL
Hemoglobin	1000 mg/dL
Protein	2000 mg/dL
Salicylic Acid	200 mg/dL

Recovery:

Different samples containing a high value of 11dhTxB₂ were diluted into the range of the assay. The samples were then serially diluted 1:1.25 in sample diluent for a final panel of 11 - 12 serial dilutions spanning the range of the assay and run on AspirinWorks[®] Test Kit. The expected concentrations of each dilution were calculated based on the value obtained for the top dilution of each sample. Observed values were compared to expected values, and a ratio of observed/expected values was calculated as percentage. The table and graph below depict the results of one such urine tested. Other urine specimens tested showed similar results.

Dilution #	Observed (pg/mL)	Expected (pg/mL)	Obs/Exp (%)
1	3939	3939	100%
2	3095	3151	98%
3	2573	2521	102%
4	2082	2017	103%
5	1683	1613	104%
6	1391	1291	108%
7	1068	1033	103%
8	835	826	101%
9	694	661	105%
10	538	529	102%
11	399	423	94%
12	342	338	101%



Limit of Detection:

Based on 216 determinations using CSLI Document EP17-A (72 blank determinations and 144 positive determinations), the limit of detection for 11dhTxB₂ is 222 pg/mL, with a 95% probability of obtaining a positive response at this level and a 95% probability of obtaining a negative response on blank samples. A limit of blank of 151 pg/mL was used.

LIMITATIONS OF THE TEST

11-Dehydro Thromboxane B₂ levels obtained with this assay may be used to assess the presence of an aspirin effect in individuals. Each physician must interpret these results with regard to patient history, lifestyle, and other risk factors. It is necessary to take into account an individual's medications and nutritional and/or dietary supplements when determining if the patient is demonstrating an aspirin effect as certain agents such as alcohol, green tea extract, chocolate, omega-3 fatty acids, ibuprofen, and COX-2 inhibitors may elicit an aspirin-like effect and reduce the amount of thromboxane production in certain individuals.

Samples with excessive sediment, blood, or other insoluble material have not been evaluated and should be avoided for this assay.

Samples from individuals on oral anticoagulants, glycoprotein IIb/IIIa inhibitors, clopidogrel or heparin have not been studied with the AspirinWorks® Test Kit.

It is not recommended to test individuals suffering from urinary tract infections, severe liver disease or end stage renal disease.

Warranty

This product is warranted to perform as described in this package insert. Corgenix, Inc. disclaims any implied warranty of merchantability or fitness for a particular use, and in no event shall Corgenix, Inc. be liable for consequential damage.

For Technical or Customer Service in the United States, phone 1-800-729-5661. Outside the United States, phone (303) 457-4345, fax (303) 457-4519, or contact a Corgenix authorized distributor.

AspirinWorks® is a registered trademark of Creative Clinical Concepts, Inc.

Some or all of the subject matter contained in the AspirinWorks® Package Insert is covered by a pending patent application.

AspirinWorks® Testkit (11-Dehydro Thromboxan B₂)

In-Vitro-Diagnostikum

VERWENDUNGSZWECK

Der Testkit AspirinWorks® ist eine auf Enzymen basierender Immunanalyse (ELISA), um die Stufen der 11-Dehydro Thromboxan B₂ (11dhTxB₂) im menschlichen Urin zu bestimmen, der bei dem Nachweis der Aspirin-Wirkung nach Nahrungsaufnahme hilfreich ist.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNGEN ZUR UNTERSUCHUNG

Aktiviert und aggregierte Thrombozyten spielen eine Hauptrolle bei der Pathogenese von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Aktiviert Thrombozyten produzieren Thromboxan A₂ (TxA₂), einen potenten Vasokonstriktor und ein Vorlaufad einer Thrombozyten-Aggregation.¹⁻² TxA₂ wird durch eine Thromboxan-Synthese aus Molekülen erzeugt, die aus einer arachidonischen Säure durch eine Zyklooxygenase-1 (COX-1) entstanden sind.^{1,3} TxA₂ hat eine kurze Halbwertszeit im Plasma und ist rasch zu Thromboxan B₂ (TxB₂) hydrolysiert. TxB₂ ist umgekehrt zu 11-Dehydro Thromboxan B₂ (11dhTxB₂) und 11-Dehydro 2,3 dinor Thromboxan B₂ abgebaut (11dh2,3DTxB₂ eine verkleinerte Form von 11dhTxB₂), sowie einer Anzahl von anderen kleineren Metaboliten, die von den Nieren ausgeschieden werden.⁴⁻⁷ Deshalb ist 11dhTxB₂ ein stabiler Metabolit von TxA₂ und ein Indikator einer Thrombozyten-Aktivität.

Ein wichtiger Bestandteil der Thrombozyten-Therapie bei den Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist Aspirin (Azetat-Salicyl Säure), über das man seit Jahren weiß, dass Anti-Thrombozyten Aktivität besitzt.⁸ Aspirin funktioniert, indem es COX-1 acetyliert und irreversibel hemmt, dadurch die Produktion von TxA₂ und seinen Metaboliten hemmt.⁹⁻¹¹ Niedrige Dosen von Aspirin blockieren mehr als 95% einer Thrombozyten- COX-1 Aktivität¹²⁻¹³ und reduzieren Herz-Kreislauf-Zwischenfälle bis zu 25% bei allen Patienten, die an Gefäßerkrankungen leiden.¹⁴ Jedoch fallen Aspirinreaktionen bei den Betroffenen unterschiedlich aus. Schätzungsweise 10-20% aller Aspirin-Konsumenten haben rezidive thrombotische Vorfälle.¹² Dieses Phänomen wird als Aspirin-Resistenz beschrieben⁵⁻¹⁶ und 5-57% aller Aspirin-Konsumenten demonstrieren kaum Reaktion bei der Verabreichung der typischen Dosierungen. Dies kommt auf die verwendete Dosierungsmethode an und die jeweilige analysierte Bevölkerung.¹⁷⁻²¹

Es gibt eine Reihe von Blut-Basis Methoden, die die Reaktion auf eine tägliche Aspirin-Therapie bei der Einzelperson zeigen, indem eine *ex vivo* Thrombozyten-Aktivierung gemessen wird.^{15,22} Diese Methoden jedoch werden von Faktoren beeinflusst, die mit dem spezifischen Aspirin-Effekt auf dem Zyklooxygenaseweg nicht in Verbindung stehen; sie schließen den Willebrand-Faktor (vWF), den Faktor VIII und hämatokritische Stufen mit ein und ebenso andere Variablen, die die Venenpunktion beinhalten. Alternativ, die Dosierung von stabilen Metaboliten von TxA₂, wie z.B. der Urin-11dhTxB₂, ist eine Methode die TxA₂ Produktion *in vivo* in Mengen zu fassen und dadurch ein direkter Weg, um den Aspirin-Effekt nach Nahrungsaufnahme zu analysieren.^{7,23-25} Die AspirinWorks® Analyse ist zur Bestimmung ob die Aspirin-Dosierung, die von einer Einzelperson aufgenommen wurde, die Thrombozyten-Zyklooxygenase Aktivität durch das Maß an 11dhTxB₂ hemmt.

DER GRUNDSATZ DER ANALYSE

Der AspirinWorks® Testkit misst den Urin-11dhTxB₂ und wird als reaktionsfähige ELISA durchgeführt. Gestreckte Proben (Referenz-Lösung, Kontrollen und Patienten-Urin), gereinigtes 11dhTxB₂ konjugiert mit alkalischer Phosphatase (AP) und gereinigte Maus-monoklonale Antikörper zum 11dhTxB₂ hingeleitet, werden verbunden und im Mikrovertiefungsverfahren ausgebrütet, belegt mit polyklonalen Anti-Maus Antikörpern. Durch die Inkubation kann das endogene 11dhTxB₂ in Proben präsentiert werden, und zusammen mit dem gereinigten AP-konjugiertem 11dhTxB₂ dazu tendieren, sich mit den Maus-monoklonalen Anti-11dhTxB₂-Antikörpern zu verbinden. Die monoklonalen Antikörper verbinden sich dann zu den polyklonalen Anti-Mause Antikörpern auf der Mikrotiter-Platte verbinden. Der Komplex, der sich auf der Platte gebildet hat, setzt sich aus monoklonalen Antikörpern und endogen oder AP-konjugiertem 11dhTxB₂ zusammen. Nach der Entfernung der ungebundenen Komplexverbindungen durch Waschen, das gebundene AP-11dhTxB₂ Konjugierte wird durch die Zugabe des para-Nitrophenylphosphats (pNPP) chromogenischen Substrates untersucht. Die Farbe entwickelt sich auf den Platten zu einer Intensität umgekehrt proportional zu der Probeurinkonzentration von 11dhTxB₂ und wird mit 405nm abgelesen. Die Ergebnisse (pg/mL) werden aus einer Eichkurve abgelesen, die mit Hilfe des Standards in dem mitgelieferten Kit erstellt werden.

Endgültige Ergebnisse werden mit pg 11dhTxB₂ per mg Kreatinin angegeben, um die Ergebnisse für die Urinkonzentration zu normalisieren.

REAGENZIEN

Die Aufbewahrung erfolgt bei 2–8 °C. Nicht kühl stellen.

Jeder AspirinWorks® Testkit enthält die folgenden Reagenzien:

(Die Volumen können variieren, abhängig von der Kitgröße und –konfiguration.)

- Mit 12 x 8 stabilisierten Antikörpern (der Ziege entnommen) beschichtete Mikroplatten, mit Halterung.
- 60 mL Probeverdünnungsmittel* (grüner Flaschenverschluss).
- 1,75 mL 5000 pg/mL Standard* (11dhTxB₂ gepuffert), für die Erstellung der Eichkurve; bezugnehmend auf das Fläschchenetikett für den spezifischen Korrekturfaktor des jeweiligen Anteils.
- 1 Fläschchen, lyophilisiert, Kontrollstufe 1 (humaner Urin) auf eine Flüssigkeitsmenge von 0,5 mL mit gereinigtem Wasser wiederhergestellt; siehe Fläschchenetikett zum Ablesen der voraussichtlichen Werte.
- 1 Fläschchen, lyophilisiert, Kontrollstufe 2 (humaner Urin) auf eine Flüssigkeitsmenge von 0,5 mL mit gereinigtem Wasser wiederhergestellt; siehe Fläschchenetikett zum Ablesen der voraussichtlichen Werte.
- 1 Fläschchen, lyophilisiert, Kontrollstufe 3 (humaner Urin) auf eine Flüssigkeitsmenge von 0,5 mL mit gereinigtem Wasser wiederhergestellt; siehe Fläschchenetikett zum Ablesen der voraussichtlichen Werte.
- 10 mL AP-Trace- Lösung, rote Lösung (gereinigtes 11dhTxB₂ mit alkalischer Phosphatase konjugiert).
- 10 mL Antikörper-Lösung (murin), blaue Lösung (gereinigte Anti-11dhTxB₂ Antikörper).
- 23 mL Einkomponentensubstrat pNPP (para-Nitrophenylphosphat, stabilisiert); betriebsfertig.
- 15 mL Stopplösung (0,1 M EDTA); betriebsfertig (roter Verschluss).
- 2 x 50 mL Waschkonzentrat TBS/Tween 20 (20X).
- 2 Klebe-Plattenversiegelungen.

* VORSICHT: Enthält Natriumazid

WARNUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN

In-Vitro-Diagnostikum

1. Material aus humaner Quelle, mit dem Verwendungszweck das Controlling als Teil dieses Kits vorzubereiten, sollte als potentiell infektiöses Material gehandhabt werden. Verwenden Sie universale Vorsichtsmassnahmen bei der Handhabung.
2. Nicht mit dem Mund pipettieren.
3. Nicht rauchen, essen und trinken, wo Proben oder Kit-Reagenzien verarbeitet werden.
4. Verwendung von disponiblen Handschuhen bei der Handhabung von Kit-Reagenzien und gründliches Händewaschen nach der Anwendung.
5. Das pNPP Substrat kann Reizung an den Augen verursachen. Die Absorption durch die Haut ist möglich. Bei der Handhabung mit dem Substrat Handschuhe tragen und gründliches Händewaschen nach der Anwendung.
6. Einige Komponenten dieses Produktes enthalten als Konservierungsmittel Natriumazid (Probeverdünnungsmittel und Standard). Natriumazid soll Blei- und Kupferazide bilden, sobald Kontakt mit diesen Metallen besteht. Diese Metallazide sind explosiv. Alle azidhaltige Lösungen müssen gründlich mit reichhaltigen Mengen an Wasser nachgespült werden, um den Aufbau von Metallaziden im Rohrleitungssystem zu verhindern.
7. Bestimmte Komponenten sind wie im folgenden beschriftet:
Mögliche Augenreizungen (R 36). Mögliche Hautreizungen (R 38). Vermeidung von Hautkontakt (S 24). Vermeidung von Augenkontakt (S 25). Bei Augenkontakt sofort mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen (S 26). Geeignete Schutzkleidung tragen (S 36). Beim Verschlucken sofort einen Arzt aufsuchen und die Verpackung oder das Etikett zeigen (S 46).

Reizende Wirkung  Biologisches Risiko .

PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Humaner Urin ist die bevorzugte Probematrix. Proben sollten innerhalb von vier Stunden gewonnen und analysiert werden. Werden die Proben nicht sofort analysiert, sind sie bei 2-8 °C aufzubewahren. Sollten die Proben länger als 24 Stunden aufbewahrt werden, müssen diese bei mindestens -20 °C eingefroren werden. Frische oder aufgetaute Proben sollten vor der Analyse mit einer Geschwindigkeit von 1000xg für 15 Minuten zentrifugiert werden. Jede Probe muss sowohl auf Kreatinin und 11dhTxB₂ auf genaue Messwerte analysiert werden.

GEBRAUCHSANLEITUNG

Bereitgestellte Materialien:

AspirinWorks® Testkit; eine vollständige Auflistung ist unter "Reagenzien" zu finden.

Benötigte Materialien :

- Analysenreines Wasser zur Herstellung der TBS/Tween 20-Waschlösung und lyophilisierte Komponenten
- Messzylinder
- Präzisionspipetten mit dazu passenden Pipettenspitzen zum Abpipettieren von 5 bis 1000 Mikroliter
- Diverses Glasgeschirr zur Handhabung kleiner Volumen
- Kolben oder Flasche, wobei das Fassungsvermögen 1 Liter beträgt
- Waschflaschen, vorzugsweise mit teilweise zugeschnittener Spitze, um einen breiten Strahl zu erzielen, bzw. ein automatisches oder halbautomatisches Plattenwaschsystem
- Disponible Handschuhe
- Spektrophotometer zur Auswertung von Mikrotiterplatten, mit dem die Extinktion zwischen 405 nm und 420 nm bestimmt werden kann
- Mehrkanalpipetten, mit denen 8 Vertiefungen gleichzeitig beschickt werden können
- Rotationsmaschine mit einer Geschwindigkeit von 300 - 600 rpm (Geschwindigkeiten von 300-600 rpm sind akzeptabel, jedoch sind 600 rpm empfehlenswert)

Hinweise zur Durchführung

1. Urin-Kreatininwerte für jede Patientenprobe einholen.
2. Urinproben und Kitreagenzien auf Raumtemperatur (18 - 26 °C) aufwärmen lassen. Vor Gebrauch gründlich durchmischen und Schäumen vermeiden. Alle nicht gebrauchten Reagenzien so schnell wie möglich wieder in den Kühlschrank/Kühlraum (2 - 8 °C) zurückstellen. Zukünftige Gebrauchselemente können bei Einweg-Aliquots dispensiert werden und bei mindestens -20°C für mögliche weitere Verwendung eingefroren werden.
3. Eingefrorene Proben sollten aufgetaut werden und bei 1000xg vor der Analyse zentrifugiert werden.
4. Eine jede Verdünnung der Standards, Kontrollwerte und Patientenproben dürfen für die Analysenverwendung nur kurz zuvor vorbereitet worden sein.
5. Die Ablesung von Mikrotiterplatten sollte als freier Blindversuch programmiert werden.
6. Akkurate Abwaschmethoden sind für eine optimale Durchführung des Versuchs wichtig. Angemessenes Abwaschen wird am besten erzielt, indem man einen starken Strahl der Wasserlösung aus einer Plastikflasche mit einer breiten Düse auf die Mikroplattenflächen leitet. Ein automatisches Mikrotiterplatten-Waschsystem darf alternativ verwendet werden.
Bitte beachten: Wenn restliche TBS/Tween 20 nicht ausreichend entfernt wird, kann eine richtige Farbentwicklung der Substratlösung nicht gewährleistet werden.
7. Wenn möglich, sollte eine Mehrkanalpipette benutzt werden, mit der 8 Vertiefungen gleichzeitig beschickt werden können. Dies beschleunigt das Verfahren und verhilft zu einheitlicheren Inkubations- und Reaktionszeiten für alle Platten.
8. Vorsichtiges Anhäufen von Reagenzien auf den Mikroplatten, um Platten zu Platten Pipettendüsenverunreinigung zu vermeiden. Die zweite Option wäre ein Düsenwechsel bei jeder neuen Reihe einer Reagenzienanhäufung.
9. Es ist wichtig, dass das Zeitprotokoll für alle Schritte sorgfältig eingehalten wird. Eine jede Verdünnung der Standards, Kontrollwerte und Patientenproben sollten möglichst schnell und gleichmäßig hinzugefügt werden.
10. Bitte bei Inkubationen beachten! Die Inkubationsperiode beginnt immer unmittelbar nach Zugabe der Reagenz oder der Probe.
11. Das Hinzufügen von allen Proben und Reagenzien wird an dieselben Mengengaben und dieselbe Reihenfolge von Proben, Kontrollwerten und Standardverdünnungen angepasst, die zuerst, an den Tracer anschließend, hinzugefügt worden sind. Die monoklonalen Antikörper sollten zuletzt hinzugefügt werden.
12. Wenn die Inkubationstemperatur nicht der Raumtemperatur (18 - 26 °C) entspricht, kann dies zu ungenauen Ergebnissen beitragen.
13. Immer darauf achten, dass beim Öffnen bzw. beim Entnehmen von Aliquots aus den der Primärfäschchen die Reagenzien nicht verunreinigt werden.
14. Kitkomponenten dürfen nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwendet werden.
15. Kitkomponenten von verschiedenen Kitchargen dürfen nicht miteinander kombiniert werden.

Reagenz-Vorbereitung

Waschlösung (TBS/Tween 20): Abmessen von 50 mL Waschkonzentrat (20X TBS/Tween 20) und mit analysenreinem Wasser auf ungefähr 1 Liter auffüllen. Die TBS/Tween 20 Lösung im Kühlschrank bei 2–8°C aufbewahren. Bei ersten Anzeichen einer mikrobiellen Kontamination ist die Lösung zu verwerfen.

Urin-Kontrollwerte: Konstituieren von Urinkontrollen (mit den Stufen 1, 2 und 3) mit 0.5 mL analysenreinem Wasser. Vorsichtig umrühren und 10 Minuten für die Rekonstitution erlauben. Ungebrauchte Portionen dürfen in Einweg-Aliquots dispensiert werden und bei weniger als -20°C bis zu einem Jahr eingefroren werden.

Analyseverfahren

1. Mikroplattenstreifen, die für den geplanten Test nicht aufgebraucht werden, von der Halterung abnehmen. Nach der Verpackung in einem Antikondensationsbeutel werden sie in bereitgelegten Beuteln versiegelt.
2. Die Eichkurve vorbereiten. Sechs Röhrchen mit den Nummern 1-6 etikettieren. 500 µL AspirinWorks® 5000 pg/mL Standard zum Röhrchen Nummer 1 hinzufügen. 250 µL Probeverdünner zu den Röhrchen mit den Nummern 2-6 hinzufügen. 250 µL vom Röhrchen Nummer 1 entnehmen, in das Röhrchen Nummer 2 füllen und gut miteinander vermischen. Die 1:2 serielle Verdünnungsprozedur bis zum Röhrchen Nummer 6 wiederholen. Die resultierenden angesetzten Standards lauten wie folgendermaßen: 5000, 2500, 1250, 625, 312,5 und 156,25 pg/mL.
3. Für den Test wird eine 1:5 Verdünnung aus den Kontroll- und Patientenproben bei der Probeverdünnung erstellt, z.B. eine Probe von 100 µL zu einer Probeverdünnung von 400 µL hinzufügen entspricht einer 1:5 Probeverdünnung.
4. Für die Standard-, Patienten- und Kontrollproben werden Doppelbestimmungen zu den Vertiefungen empfohlen. Alle Probeverdünnungen gründlich durchmischen und 100 µL aus den Verdünnungen (6 Standardverdünnungen, Patientenproben und Kontrollwerten) zu den entsprechenden Vertiefungen hinzufügen.
5. Eine sehr stark bindende Probe (B_0) wird durchgeführt (die B_0 enthält Antikörper und Tracer, aber keinen reaktionsfähigen Analyten). 100 µL Probeverdünnung zu den Duplikatsvertiefungen hinzufügen, die auf das B_0 Bezug nehmen.
6. Anwendung einer Leerlaufprobe. Die Vertiefungen nicht mit Duplikatsproben füllen.
7. Jeweils 50 µL AP-Tracer Lösung (rot) einer jeden der 6 Standard-, Patientenproben-, Kontroll- sowie den B_0 -Vertiefungen hinzufügen. Die leeren Vertiefungen nicht mit Proben füllen.
8. Jeweils 50 µL Antikörper-Lösung (blau) einer jeden der 6 Standard-, Patientenproben-, Kontroll- sowie den B_0 -Vertiefungen hinzufügen. Die leeren Vertiefungen nicht mit Proben füllen.

Die Mikrovertiefungen sollten Reagenzvolumen wie im folgenden dargestellt, aufweisen:

<u>Eichkurve</u>	<u>AP-Tracerlösung</u>	<u>Antikörperlösung</u>
100 µL 5000 pg/mL	50 µL	50 µL
100 µL 2500 pg/mL	50 µL	50 µL
100 µL 1250 pg/mL	50 µL	50 µL
100 µL 625 pg/mL	50 µL	50 µL
100 µL 312,5 pg/mL	50 µL	50 µL
100 µL 156,25 pg/mL	50 µL	50 µL
100 µL Probeverdünner (B_0)	50 µL	50 µL
<u>Proben-/Kontrollwerte</u>	<u>AP- Tracerlösung</u>	<u>Antikörperlösung</u>
100 µL	50 µL	50 µL

9. Die Platte mit der vorgesehenen klebenden Plattenversiegelung abdecken und eine 2-stündige Inkubation mittels eines rotierenden Mixers (300-600 rpm) bei einer Raumtemperatur zwischen 18-26°C vornehmen. Nach einer vollständigen Inkubation die Mikroplattenhalterung von oben und unten jeweils festhalten, um Mikrovertiefungsmodule zurückzuhalten und vorsichtig die Mikrovertiefungen umdrehen, um die Probenflüssigkeit auszuschütten. Die Proben sollten Vertiefungen nicht verunreinigen.
10. Fünfmal mit einer Waschlösung, die Raumtemperatur hat, waschen. Jede Vertiefung sollte vollständig mit TBS/Tween 20 pro Ausspülung behandelt werden. Die Vertiefungen zwischen jedem Auswaschvorgang ausschwenken, um sie vollständig zu entleeren. Mit einer schwenkenden Bewegung aus dem Handgelenk die Flüssigkeit aus den Vertiefungen herausschütteln. Restliche Waschflüssigkeit wird durch hartes Absetzen auf saugfähigem Papier entfernt. Die Vertiefungen zwischen den einzelnen Schritten nicht austrocknen lassen.
11. Mit einer Mengenangabe von 200 µL pNPP Substrat jede Mikrovertiefung, einschließlich B_0 und Probenleerwerte füllen, mit einer frischen Klebe-Plattenversiegelung abdecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren unter Verwendung eines Rotationsmixers. Die Substratlösung muss den

Vertiefungen mit gleichmäßigen Tempo zugesetzt werden. Verkehrt proportional zu der vorhandenen 11dhTxB₂ Menge entwickelt sich eine gelbe Verfärbung in den Vertiefungen.

12. Mit einer Mengenangabe von 100 µL Stopplösung jeden Leerwert, einschließlich B₀ und Probenleerwerte füllen, um eine Enzym-Reaktion zu beenden. Dabei ist darauf zu achten, dass die Stopplösung in derselben Reihenfolge und mit demselben Tempo die Vertiefungen füllt wie die Substratlösung.
13. Den Nullpunkt des Mikrotiterplattenlesegeräts einstellen. Die optische Dichte der in den einzelnen Vertiefungen enthaltenen Flüssigkeit zwischen 405 und 420 nm ablesen. Die Werte der optischen Dichte in den Vertiefungen innerhalb von 1 Stunde nach Zugabe der Stopplösung messen.

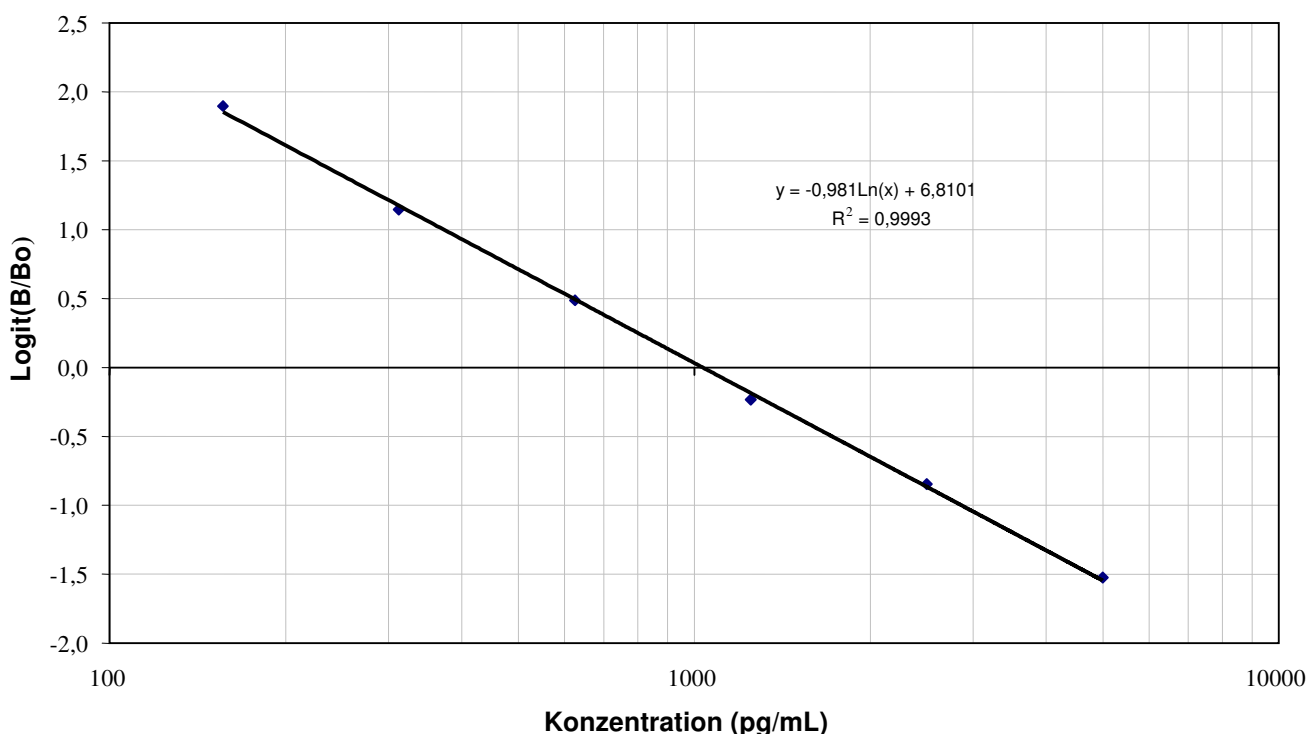
Ergebnisse

Alle Messwtergebnisse aus den Proben werden anhand einer log-logit Analyse berechnet, die eine Ausgleichsgerade darstellt, die auf Bezugspunkte gezeichnet wird. Ebenso kann eine alternative abgesicherte Kurvenanalyse eingesetzt werden. Kontroll- und relative Patientwerte werden mit Hilfe der Eichkurve interpoliert und die relativen Werte werden für die Eichlösung (siehe Fläschchenetikett) anhand der Korrekturfaktors vervielfacht. Die Messwtergebnisse von Patienten werden normalisiert indem man die einzelnen Kreatinin-Stufen berücksichtigt, z.B. man teilt das Messwtergebnis aus 11dhTxB₂ (in pg/mL) durch das Kreatininmesswtergebnis aus der Probe des Patienten (in mg/dL) und multipliziert es mit 100. Das Messwtergebnis des Patienten wird als pg 11dhTxB₂/mg Kreatininmesswert angezeigt. Dabei ist darauf zu achten, dass allen Qualitätskontrollparametern entsprochen wird (see Qualitätskontrolle), bevor man Testergebnisse anzeigt.

Eine beispielhafte Eichkurve aus 11dhTxB₂ ist unten dargestellt. Diese Eichkurve hat ausschließlich Illustrationsverwendungszweck. Eine Eichkurve sollte jeder, der eine Untersuchung leitet, erstellen.

Eichkurve

**DIES IST NUR EIN BEISPIEL. –
NICHT FÜR TATSÄCHLICH
DURCHFÜHRTE
TESTS VERWENDEN!**



Berechnungen aus den Ergebnisswerten

Die folgende Berechnung für die jeweilige Konzentration durchführen, die in der Eichkurve und die jeweilige Patientenprobe demonstriert worden ist, wobei man den individuellen Leerwert der optischen Dichte oder auch OD genannt, zugrunde legt:

$$P = \frac{\text{(Individuelle OD für die Konzentration - durchschnittliche OD für Leerwerte)}}{\text{(durchschnittliche OD für } B_0 \text{ - durchschnittliche OD für Leerwerte)}}$$

Bitte dabei berücksichtigen, das für jede Eichstufe und jede Patienten-Untersuchung der Wert P zwischen dem Nullwert und dem Wert 1 sein sollte. Falls dies so nicht gegeben ist, sollte man mit der Berechnung nicht fortfahren. Die richtige Berechnung ist im folgenden aufgeführt::

$$Y = \text{Log}(P/(1-P)) \text{ für jede Patientenprobe und jede Eichstufe}$$

$$Y = \text{Durchschnitt aus zwei individuellen Vertiefungsleerwerten}$$

Die graphische Darstellung Y in Abhängigkeit von $X = \log(x)$ für die jeweilige Eichstufe, wobei x die eigentliche Spurarbeit für die Abbildung darstellt. Die Bezugspunkte sollten sehr stark mit einer vorhandenen Geraden identisch sein. Man kann durchgehend die log-Bezugsgröße 10 verwenden oder als alternative Option die log-Bezugsgröße e (normaler Logarithmus) verwenden; jedoch sollte man beide Logarithmen nicht zusammen einsetzen. Führen Sie eine lineare Regression aus und verfolgen Sie die Steigung (a_1), den Achsenabschnitt (a_0) und den R^2 Wert. Für eine kontinuierliche Fortsetzung der Berechnung sollte die letztere Wertbestimmung die Größe 0,95 übersteigen.

Jetzt wird mit der Evaluierung der Messwtergebnisse des Patienten fortgesetzt, indem man den Y-Wert verwendet, der für jeden Patienten berechnet worden ist, um die Lösung für X zu bekommen, um zuletzt den Messwert aus der Untersuchung ihres Patienten zu erzielen:

$$Y = a_1 X + a_0 \quad \text{or} \quad X = (Y - a_0) / a_1$$

Relativwert des Patienten: 10^X unter der Verwendung der log-Bezugsgröße 10
 $\exp(X)$ unter Verwendung des normalen log

Bestimmung des Mittelwertes aus den Duplikat X Wertbestimmungen.

X= Durchschnitt aus zwei individuellen Vertiefungsleerwerten

Der Schwellwert aus 11dhTx B_2 in pg/mL wird erzielt, indem die Kontroll- und Relativwerte des Patienten mit dem Korrekturfaktor der Eichlösung (siehe Fläschchenetikett) multipliziert werden.

Patientenergebnisse werden normalisiert, indem man Kreatininwerte berücksichtigt. Das Ergebnis aus 11dhTx B_2 (in pg/mL) wird durch dem Kreatininergebnismesswert aus der Patienten-Untersuchung (in mg/dL) geteilt und mit der Größe 100 multipliziert. Der Ergebnismesswert des Patienten wird als Kreatinin pg 11dhTx B_2 /mg angezeigt.

Beispiel:

- Relativwert des Patienten: 1000
- Korrektur-Faktor für die Eichlösung: 1,05
- Istwert des Patienten 11dhTx B_2 : $1000 \times 1,05 = 1050$ pg/mL.
- Kreatinin-Wert des Patienten = 150 mg/dL
- Angezeigter Endwert: $(1050 \text{ pg/mL} / 150 \text{ mg/dL}) \times 100 = 700$ pg 11dhTx B_2 /mg Kreatinin
- In diesem Beispiel der erstellte Kreatininwert 700 pg 11dhTx B_2 /mg liegt unter dem Kreatinin-Grenzwertpunkt von 1500 pg 11dhTx B_2 /mg, wodurch angedeutet wird, dass eine Aspirinwirkung entdeckt worden ist.

Auswertung der Ergebnissbefunde

Der Probebefund basiert auf den Schwellwert aus 11-Dehydro Thromboxan B_2 , der aus einer Urinprobe gewonnen worden ist und in pg/mg Mengen angezeigt wird. Die Auswertung der Ergebnisbefunde basiert auf folgenden erstellten Grenzwertpunkten:

Auswertung der Ergebnisbefunde:

- > 1500 pg/mg Normalisierte Werte aus 11-Dehydro Thromboxan B_2 zeigen einen Mangel an Aspirinwirkung an
- ≤ 1500 pg/mg Normalisierte Werte aus 11-Dehydro Thromboxan B_2 zeigen Aspirinwirkung an

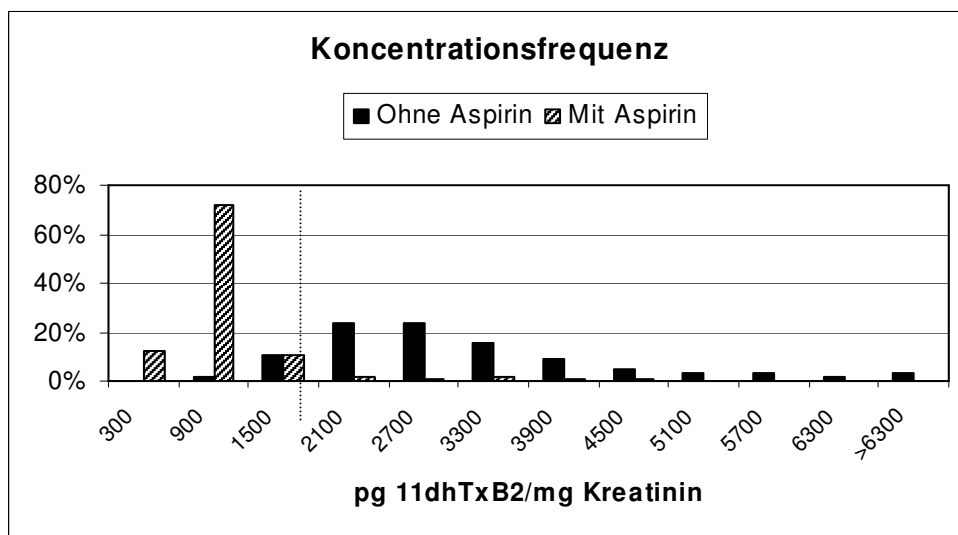
QUALITÄTSKONTROLLE

1. Die durchschnittliche optische Dichte der B_0 Leerwerte (maximale Bindung) sollte mindestens 0,600 sein. Anzeigewerte, die geringer als 0,600 sind, weisen möglicherweise auf Reagenzverunreinigung hin oder unzureichende Reinigung der Platte.
2. Die durchschnittliche optische Dichte des Blindversuchs (Nullpunkt) sollte geringer als 0,300 sein. Anzeigewerte, die mindestens 0,300 sind, weisen möglicherweise auf Reagenzverunreinigung hin oder unzureichende Reinigung der Platte.
3. Die 11dhTx B_2 Werte, die aus Kontrollgründen erzielt werden, sollten innerhalb des Bereichs liegen, der auf den Behältnisetiketten angezeigt ist.
4. Jedes Labor sollte in regelmäßigen Abständen die spezifische normale Bereichsskala für die entsprechende Patientenpopulation bestimmen.
5. Proben, die Werte aufweisen, die außerhalb des Bereiches 300 – 4000 pg/mL liegen, sind außerhalb des linearen Bereichs der Eichkurve und können wiederholt an einer Lösung getestet werden. Ist ein Probewert geringer als 300 pg/mL, kann die Probe zum wiederholten Male getestet werden, wobei man ein frisches Aliquot als eine 1:2 Lösung in der Form einer Probeverdünnung (250 μ L Probe + 250 μ L Probeverdünnung) einsetzt. Ist ein Probewert mindestens 4000 pg/mL, kann die Probe zum wiederholten Male getestet werden, wobei man ein frisches Aliquot als eine 1:10 Lösung (50 μ L Probe + 450 μ L Probeverdünnung) oder eine 1:20 Lösung (25 μ L Probe + 475 μ L Probeverdünnung) einsetzt.
6. Bei Doppelbestimmungen sollten für Kontrollen oder Proben mit einer optischen Dichte in dem Bereich zwischen 300 – 4000 pg/mL, die Messwerte nicht mehr als 20% von dem Mittelwert der optischen Dichte abweichen.
7. Die R^2 Werte für die Eichkurve sollten mindestens bei $\geq 0,95$ liegen.

TESTCHARAKTERISTIKA

Voraussichtliche Werte:

Die funktionellen Charakteristika des AspirinWorks® Testkits sind in einer Studie evaluiert worden, die 166 scheinbar gesunde Erwachsene zum Inhalt hatte, die vor bzw. nach dem Erhalt von überwachten Aspirindosierungen untersucht worden sind (201 Probeentnahmen von Personen mit Aspiringaben und 204 Probeentnahmen von Personen ohne Aspiringaben). 11-Dehydro Thromboxan B_2 Konzentrationen werden erfasst und normalisiert, indem durch die Kreatininkonzentration geteilt wird. Ein Distributionsgraph, der die Frequenzrelation der 405 Untersuchungen zeigt, ist unten dargestellt. Auf der Grundlage dieser Frequenzen hat man einen Grenzwert in der Höhe von 1500 pg 11dhTx B_2 pro mg Urinkreatinin angenommen.



Klinische Durchführung:

Die klinische Durchführung des Corgenix AspirinWorks® Testes ist auch anhand dieser Personen evaluiert worden. Die AspirinWorks® Resultate werden als positiv oder negativ aufgeführt, die auf eine Grenzwertausrichtung von 1500 pg 11-Dehydro Thromboxan B₂ pro mg Urinarkreatinin beruhen. Es gibt jeweils eine Tabelle sowohl für 81 mg als auch für 325 mg-Aspirindosierungen.

		Aspirin-Einnahme	
		Anwesend	Abwesend
AspirinWorks® Resultate 81 mg	Positiver Wert (≤1500 pg/mg Kreatinin)	156	20
	Negativer Wert (>1500 pg/mg Kreatinin)	7	146
Gesamtsumme		163	166

Prozentuale Wertfestlegungen im Pauschalbereich = 91,8%

Prozentuale Wertfestlegungen im Positivbereich = 95,7%

Prozentuale Wertfestlegungen im Negativbereich = 88,0%

		Aspirin-Einnahme	
		Anwesend	Abwesend
AspirinWorks® Resultate 325 mg	Positiver Wert (≤1500 pg/mg Kreatinin)	34	4
	Negativer Wert (>1500 pg/mg Kreatinin)	4	34
Gesamtsumme		38	38

Prozentuale Wertfestlegungen im Pauschalbereich = 89,5%

Prozentuale Wertfestlegungen im Positivbereich = 89,5%

Prozentuale Wertfestlegungen im Negativbereich = 89,5%

Der Vergleich zwischen Prädikatsvorrichtungen

Der AspirinWorks® Testkit ist mit der Accumetrics® VerifyNow™ Aspirin Untersuchung verglichen worden, wobei 173 Urinproben von scheinbar gesunden Erwachsenen verwendet worden sind. Die Angaben zu den Messwerten werden in der Tabelle unten dargestellt.

		VerifyNow™ Resultate	
		Positiver Wertbereich (<550 ARU)	Negativer Wertbereich (≥550 ARU)
AspirinWorks® Resultate	Positiver Wert (≤1500 pg/mg Kreatinin)	77	11
	Negativer Wert (>1500 pg/mg Kreatinin)	7	78
Gesamtsumme		84	89

Prozentuale Wertfestlegungen im Pauschalbereich = 89,6%

Prozentuale Wertfestlegungen im Positivbereich = 91,7%

Prozentuale Wertfestlegungen im Negativbereich = 87,6%

Analytische Durchführung:

Erkennungsbereich:

Der Erkennungsbereich für 11-Dehydro Thromboxane B₂ im AspirinWorks® Testkit liegt zwischen 300 – 4000 pg/mL Urin. Aus Genauigkeitsgründen sollten Proben mit Messwerten von mindestens 4000 pg/mL zum wiederholten Male in einer geeigneten Lösung getestet werden. Die ausgewiesene Analytenkonzentration sollte normalisiert werden, indem die erfassten 11dhTxB₂ durch die Kreatininkonzentration geteilt werden, wobei man die Ermittlungswerte einer gesonderten Untersuchung verwendet.

Präzision:

Drei Urinproben lässt man auf 24 Vertiefungen/Platten bei mehr als drei Platten/Charge auflaufen, wobei Wiederholungen bei drei Chargen für eine Gesamtsumme von 216 Abmessungen pro Urinprobe eingeplant sind. Da das Testergebnis als Mittelwert zweier Messabfolgen beschrieben wird, ergeben sich aus dem Versuchsplan der Studie 108 Kontrollabmessungen (12 pro Platte, auf drei Platten/Charge verteilt, Ablauf erfolgt bei drei Plattenchargen), auf die die präzisen Kalkulationen, die in der Tabelle unten gezeigt werden, begründet werden.

Urinr.	Mittelwert der 11-DehydroThromboxan B₂-Konzentration	Wiederholbarkeit als %CV	Labor-Präzisionswert als %CV
1	424 pg/mL	8%	14%
2	1399 pg/mL	5%	7%
3	3380 pg/mL	5%	10%

Beeinträchtigung:

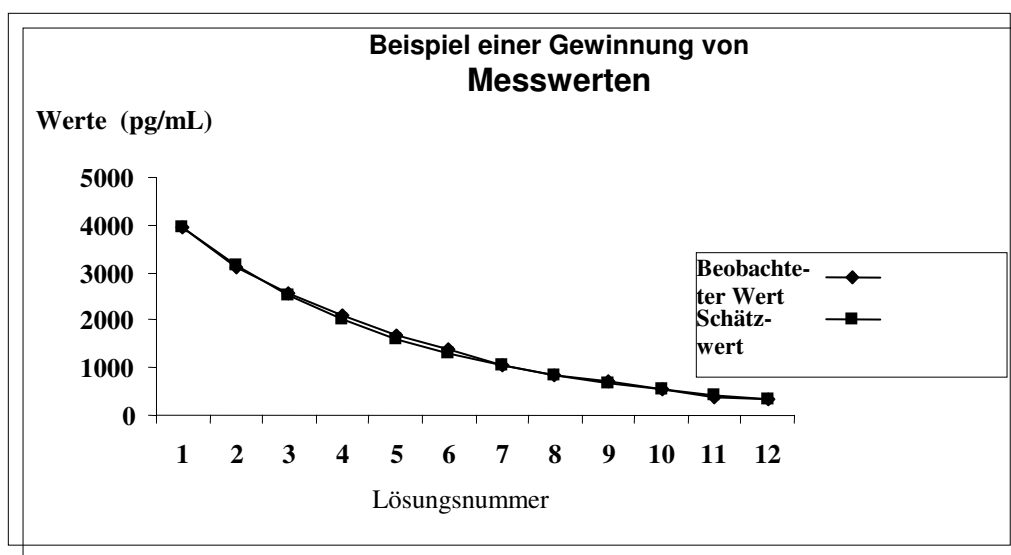
Es gab Kontrolluntersuchungen der Proben auf mögliche Beeinträchtigungen. Im nachfolgenden sehen Sie eine tabellarische Auflistung von Substanzen, die keine bedeutende Wirkung auf die abgemessene Konzentration aus 11-Dehydro Thromboxan B₂ zeigten:

Verbindung	Konzentration
Acetaminophen	200 mg/dL
Acetylsalicylsäure	200 mg/dL
Ascorbinsäure	200 mg/dL
Koffein	200 mg/dL
Gentisinsäure	200 mg/dL
Glukose	2000 mg/dL
Hämoglobin	1000 mg/dL
Protein	2000 mg/dL
Salicylsäure	200 mg/dL

Gewinnungsmethoden:

Verschiedene Proben, die einen hohen Wert an 11dhTxB₂ enthalten, werden innerhalb des Schwankungsbereichs der Untersuchung verdünnt. Die Proben werden dementsprechend seriell in der Relation 1:1,25 mittels des Probeverdünnungsmittels verdünnt, so dass ein abschließendes Panel von 11 - 12 seriellen Verdünnungen durchgeführt werden kann, die den Schwankungsbereich der Untersuchung umfassen und aufgrund von AspirinWorks® Testkit eingesetzt werden. Die geschätzten Konzentrationen jeder Lösung werden, unter Einbezug der erzielten Werte aus der ersten Lösung der eingesetzten Proben, berechnet. Die beobachteten Werte werden mit den Schätzwerten verglichen und das jeweilige Verhältnis zwischen den beobachteten und geschätzten Werten wird prozentual bestimmt. Die Tabelle und der Graph unten veranschaulichen die Ergebnisswerte einer Urinprobe, die auf diese Weise untersucht worden ist. Weitere untersuchte Urineinzelproben zeigten ähnliche Resultate auf.

Lösung Nr.	Beobachteter	Voraussichtlicher	Beobachteter und
	Wert (pg/mL)	Wert (pg/mL)	voraussichtlicher Wert (%)
1	3939	3939	100%
2	3095	3151	98%
3	2573	2521	102%
4	2082	2017	103%
5	1683	1613	104%
6	1391	1291	108%
7	1068	1033	103%
8	835	826	101%
9	694	661	105%
10	538	529	102%
11	399	423	94%
12	342	338	101%



Abgrenzung der Bestimmungsgrößen:

Aufgrund von 216 Bestimmungen unter Verwendung des CSLI Dokumentes EP17-A (72 Blindbestimmungen und 144 positive Bestimmungen), ist die Obergrenze des Bestimmungswertes aus 11dhTx_{B2} die Summe von 222 pg/mL, wobei eine Wahrscheinlichkeit von 95% zu Tage tritt, bei der eine Resonanz auf dieser Stufe erhalten wird und eine Wahrscheinlichkeit von 95%, bei der eine negative Resonanz auf Blindproben erzielt wird. Eine Obergrenze des Leerwertes von 151 pg/mL wird verwendet.

EINSCHRÄNKUNGEN BEI DEN KONTROLLUNTERSUCHUNGEN

Die 11-Dehydro Thromboxan B₂ Stufen, die durch diese Untersuchung erhalten werden, werden verwendet, um den Anschlag des Aspirineffektes bei Patienten einzuschätzen. Jeder Arzt wird dazu angeleitet, diese Ergebniswerte im Hinblick auf die Krankengeschichte, den jeweiligen persönlichen Lebensstil, sowie sonstige Risikofaktoren zu interpretieren. Ferner sollten die Medikamentenverabreichungen des Patienten miteingeschlossen werden, sowie seine Ernährungsgewohnheiten bzw. diätische Supplemente, um entscheiden zu können, ob der Patient bestimmte Aspirinwirkungen zeigt, so wie es durch bestimmte Wirkstoffen vorkommen kann, zu denen unter anderem der Alkohol, grüne Tee Extrakte, Schokolade, Omega-3-Fettsäuren, Ibuprofen und COX-2 Inhibitoren gehören, die eindeutig ähnliche Effekte wie das Aspirin hervorrufen können und den Betrag an der Thromboxan-Produktion bei bestimmten Personen reduzieren helfen.

Proben mit exzessiven Ausfällungen, Blut oder sonstiger unlöslicher Materie sind nicht evaluiert worden und sollten bei der Untersuchung keine Verwendung finden.

Proben von Personen, die Antikoagulansen, Glykoprotein IIb/IIIa Inhibitoren, Klopidothrombin oder Heparin oral einnehmen, haben bei dem AspirinWorks® Testkit keine Beachtung gefunden.

Personen, die an Harnwegsinfektionen, schwerem Leberleiden oder einer Nierenkrankheit im Endstadium leiden, sollten keiner Untersuchung unterzogen werden.

Garantieleistung

Dieses Produkt hat die Garantie die Funktionen, wie sie in der Verpackungsbeilage beschrieben sind, auszuführen. Corgenix, Inc. lehnt jegliche auferlegte Haftungsansprüche für Mängelgewährleistung oder Tauglichkeit für den spezifischen Gebrauch ab und Corgenix, Inc. wird unter keinen Umständen für Folgeschäden haftbar gemacht werden können.

Unseren technischen und allgemeinen Kundendienst erreichen Sie in den USA unter 1-800-729-5661 bzw. außerhalb der USA unter (303) 457-4345 oder per Fax unter (303) 457-4519, Sie können sich auch mit einem autorisierten Corgenix-Händler in Verbindung setzen.

AspirinWorks® ist eine registrierte Handelsmarke von Creative Clinical Concepts, Inc.

Teile oder der gesamte Inhalt, der in der AspirinWorks® Packungsbeilage aufgeführt ist, ist durch eine noch ausstehende Patentanmeldung abgedeckt.

Kit de test AspirinWorks® (11-Dehydro Thromboxane B₂)

Pour un diagnostic in vitro

APPLICATION

Le kit de test AspirinWorks® est une analyse immuno enzymique (ELISA) visant à déterminer les niveaux de 11-Dehydro Thromboxane B₂ (11dhTxB₂) dans l'urine humaine, qui aide à détecter les effets de l'aspirine après ingestion.

RESUME ET EXPLICATION DE L'ANALYSE

Les plaquettes activées et en amas jouent un rôle clé dans la pathogenèse des maladies cardiovasculaires. Les plaquettes activées produisent de la Thromboxane A₂ (TxA₂), un vasoconstricteur puissant et un inducteur de l'agrégation de plaquettes.¹⁻² La TxA₂ est générée par la synthèse de la Thromboxane par les molécules dérivées de l'acide arachidonique par cyclooxygénase-1 (COX-1).^{1,3} La TxA₂ a une demi-vie courte dans le plasma et devient rapidement hydrolysée en Thromboxane B₂ (TxB₂). TxB₂, est à son tour métabolisé en 11-Dehydro Thromboxane B₂ (11dhTxB₂), 11-Dehydro 2,3 dinor Thromboxane B₂ (11dh2,3DTxB₂, une forme tronquée de 11dhTxB₂), et un certain nombre d'autres métabolites TxB₂ mineurs sécrétés par les reins.⁴⁻⁷ Donc, le 11dhTxB₂ est un métabolite stable de TxA₂ et un indicateur de l'activité des plaquettes.

Une part importante de la thérapie antiplaquettaire dans une maladie cardiovasculaire est jouée par l'aspirine (acide acétylsalicylique), dont l'activité antiplaquettaire est connue depuis plusieurs années.⁸ L'aspirine fonctionne en acétylant et en inhibant irréversiblement le COX-1 et donc en inhibant la production de TxA₂ et de ses métabolites.⁹⁻¹¹ Une petite dose d'aspirine bloque plus de 95% de l'activité plaquettaire COX-1¹³ et réduit les troubles cardiovasculaires jusqu'à 25% chez les patients atteints d'une maladie vasculaire artérielle.¹⁴ Cependant, la réponse à l'aspirine varie selon les personnes. Il est estimé qu'entre 10-20% des personnes qui prennent de l'aspirine ont des troubles thrombotiques récurrents.¹² Ce phénomène est appelé la résistance à l'aspirine¹⁶ et entre 5-57% des personnes prenant de l'aspirine peuvent démontrer une réponse faible aux doses types, en fonction de la technique de mesure utilisée et de la population analysée.¹⁷⁻²¹

Il existe un certain nombre de méthodes sanguines qui déterminent la réponse d'une personne à une thérapie journalière d'aspirine en mesurant l'activité plaquettaire *ex vivo*.^{15,22} Ces méthodes sont toutefois influencées par des facteurs indépendants de l'effet spécifique de l'aspirine sur la voie cyclooxygénase, y compris le facteur Willebrand (vWF), le facteur VIII et les niveaux hématocrites, ainsi que d'autres variables relatives à la ponction veineuse. D'un autre côté, la mesure de métabolites stables de TxA₂, comme le 11dhTxB₂ urinaire, est une façon de quantifier *in vivo* la production de TxA₂ et donc une manière directe d'analyser l'effet de l'aspirine après ingestion.^{7,23-25} Le test AspirinWorks® peut déterminer si la dose d'aspirine ingérée par une personne inhibe l'activité cyclooxygénase plaquettaire via la mesure de 11dhTxB₂.

PRINCIPE DU TEST

Le kit de test AspirinWorks® mesure le 11dhTxB₂ urinaire et il est réalisé comme un ELISA compétitif. Les échantillons dilués (solution de référence, contrôles et urine du patient), le 11dhTxB₂ purifié conjugué à de la phosphatase alcaline (AP), et l'anticorps monoclonal de souris purifié pour 11dhTxB₂ sont combinés et incubés dans des microcupules revêtues d'un anticorps polyclonal anti-souris. L'incubation permet au 11dhTxB₂ endogène présent dans les échantillons d'interagir avec le 11dhTxB₂ purifié et conjugué à du AP pour une adhésion à l'anticorps anti-11dhTxB₂ monoclonal de souris. L'anticorps monoclonal s'associe ensuite à l'anticorps polyclonal anti-souris présent sur le plateau à micro-titration. Le complexe formé sur le plateau est composé d'un anticorps monoclonal et endogène ou de 11dhTxB₂ conjugué à du AP. Après le retrait des complexes libres par lavage, le conjugué AP-11dhTxB₂ est analysé par l'addition de substrat chromogène de para-nitrophénylphosphate (pNPP). La coloration se développe dans les cupules selon une intensité proportionnellement inversée à la concentration urinaire de 11dhTxB₂ dans l'échantillon et elle est lue à 405nm. Les résultats (pg/mL) sont calculés par rapport à une courbe référentielle préparée à partir de la solution de référence fournie dans le kit.

Les résultats finaux sont reportés en pg 11dhTxB₂ par mg de créatinine pour normaliser les résultats pour la concentration urinaire.

REACTIFS

Stocker entre 2 et 8°C. Ne pas congeler.

Chaque kit de test AspirinWorks® contient les réactifs suivants

(les volumes peuvent varier en fonction de la taille et de la configuration du kit) :

- 12 x 8 microcupules revêtues d'anticorps (chèvre) stabilisés, avec cadre.
- 60 mL de diluant d'échantillon* (bouteille au capuchon vert).
- 1,75 mL 5000 pg/mL de Reference Solution* (11dhTxB₂ dans le tampon), pour la préparation de la courbe référentielle ; voir l'étiquette de la fiole pour le facteur de correction du lot.
- 1 fiole lyophilisée contrôle niveau 1 (urine humaine) à reconstituer en 0,5 mL avec de l'eau purifiée ; voir l'étiquette de la fiole pour la fourchette attendue.
- 1 fiole lyophilisée contrôle niveau 2 (urine humaine) à reconstituer en 0,5 mL avec de l'eau purifiée ; voir l'étiquette de la fiole pour la fourchette attendue.
- 1 fiole lyophilisée contrôle niveau 3 (urine humaine) à reconstituer en 0,5 mL avec de l'eau purifiée ; voir l'étiquette de la fiole pour la fourchette attendue.
- 10 mL AP-Tracer Solution, solution rouge (11dhTxB₂ conjugué à de la phosphatase alcaline purifiée).
- 10 mL Solution D' Anticorps (murine), solution bleue (anticorps anti-11dhTxB₂ purifié).
- 23 mL Un substrat composant de pNPP (paranitrophénylphosphate, stabilisé) ; prêt à l'emploi.
- 15 mL Arrêt De la Solution (0,1 M EDTA) ; prête à l'emploi (capuchon rouge).
- 2 x 50 mL Concentré De Lavage TBS/Tween 20 (20X).
- 2 joints adhésifs.

*** MISE EN GARDE : Contient de l'azoture
de sodium**

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Pour un diagnostic in vitro

1. Les matières de source humaine utilisées pour préparer les contrôles inclus dans ce kit doivent être manipulées comme des matières potentiellement infectieuses. Appliquer les précautions universelles lors de la manipulation.
2. Ne pas pipetter à la bouche.
3. Ne pas fumer, manger ou boire dans les endroits où les échantillons ou les réactifs sont manipulés.
4. Porter des gants jetables lors de la manipulation des réactifs et se laver soigneusement les mains après la manipulation.
5. Le substrat pNPP peut causer une irritation des yeux. L'absorption par la peau est possible. Utiliser des gants lors de la manipulation du substrat et se laver soigneusement les mains après la manipulation.
6. Certains composants de ce produit contiennent de l'azoture de sodium comme conservateur (diluants d'échantillon et solution de référence). L'azoture de sodium forme des azotures de plomb et de cuivre lorsqu'il est laissé en contact avec ces métaux. Ces azotures de métaux sont explosifs. Toute solution contenant de l'azide doit être évacuée avec une grande quantité d'eau pour empêcher l'accumulation d'azotures de métaux explosifs dans les canalisations.
7. Certains composants sont classés de la manière suivante :
Irritant pour les yeux (R 36). Irritant pour la peau (R 38). Eviter le contact avec la peau (S 24). Eviter le contact avec les yeux (S 25). En cas de contact avec les yeux, rincez immédiatement et abondamment avec de l'eau et demandez conseil à votre médecin (S 26). Porter des vêtements de protection appropriés (S 36). En cas d'ingestion, consultez immédiatement un médecin et montrez lui cette boîte ou la notice (S 46).

Irritant  Risque biologique .

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

L'urine humaine est la matrice d'échantillon recommandée. Les échantillons doivent être prélevés et testés dans les quatre heures. S'ils ne sont pas testés immédiatement, les échantillons doivent être conservés entre 2 et 8°C. Si les échantillons doivent être conservés pendant plus de 24 heures, ils doivent être congelés à ≤ -20°C. Les échantillons frais ou décongelés doivent être centrifugés à 1000xg pendant 15 minutes avant le test. Chaque échantillon doit être testé avec précision pour la créatinine et le 11dhTxB₂.

INSTRUCTIONS D'UTILISATION

Éléments fournis :

Kit de test AspirinWorks® ; voir la section « Réactifs » pour la liste complète.

Éléments requis mais non fournis :

- Eau de qualité réactif pour préparer le bain TBS/Tween 20 et les composants lyophilisés
- Des éprouvettes graduées
- Des pipetteurs de précision capables de donner entre 50 µL et 1000 µL, avec les pointes appropriées
- Divers récipients en verre pour la manipulation de petits volumes
- Flasque ou bouteille, 1 litre
- Pissettes, de préférences avec l'embout partiellement coupé pour permettre un large jet, ou un dispositif automatisé ou semi-automatisé.
- Gants jetables
- Spectrophotomètre capable de lire une absorbance entre 405 et 420 nm
- Pipetteurs multicanaux capables de remplir 8 cupules simultanément
- Agitateur rotatif capable de fournir 300 - 600 rpm (les vitesses of 300-600 rpm sont acceptables, mais 600 rpm est recommandé)

Notes de procédure

1. Obtenir les valeurs de créatinine urinaire pour chaque échantillon.
2. Porter les échantillons d'urine et les réactifs du kit à température ambiante (18–26°C) et bien mélanger avant utilisation ; ne pas faire mousser. Replacer au plus vite les réactifs non utilisés dans le compartiment réfrigéré. Les contrôles restants peuvent être placés dans des aliquots à usage unique et congelés au minimum à -20°C pour une utilisation ultérieure.
3. Les échantillons congelés doivent être décongelés et centrifugés à 1000xg avant utilisation.
4. Toutes les dilutions de la solution de référence, des contrôles et des échantillons doivent être réalisées juste avant d'être utilisées pour l'analyse.
5. Le lecteur de plaque doit être programmé pour un essai à blanc.
6. Une technique de lavage appropriée est cruciale pour une performance optimale de l'analyse. Pour un lavage optimal, il est recommandé de diriger un jet puissant de la solution de lavage à partir d'une pissette en plastique avec un embout large et dans le fond des microcupules. Un plateau à micro-titration automatisé peut également être utilisé.
IMPORTANT : Si les résidus de TBS/Tween 20 ne sont pas convenablement éliminés, le développement de la coloration de la solution de substrat peut être incohérent.
7. Utiliser un pipetteur multicanaux capable de remplir 8 cupules simultanément. Ceci permet d'avancer plus vite et de fournir une incubation et des temps de réaction plus uniformes pour toutes les cupules.
8. Ajouter les réactifs avec soin par le côté des microcupules pour éviter la contamination d'une cupule à l'autre par la pointe de la pipette, ou changer les pointes après chaque nouvelle rangée de réactif.
9. Un bon timing, à toutes les étapes, est un élément crucial. Toutes les dilutions de solution de référence, les contrôles et les échantillons doivent être ajoutés aussi rapidement et uniformément que possible.
10. Pour toutes les incubations, le début de la période d'incubation commence avec l'ajout du réactif ou de l'échantillon.
11. L'ajout des échantillons et des réactifs doit être réalisé au même rythme et dans le même ordre, en ajoutant d'abord les échantillons, contrôles, dilutions de la solution de référence, puis le traceur. L'anticorps monoclonal doit être ajouté en dernier.
12. Les températures d'incubation supérieures ou inférieures à une température ambiante normale (18–26°C) peuvent provoquer des résultats imprécis.
13. Éviter toute contamination des réactifs lors de l'ouverture et de la fermeture des aliquots des fioles d'origine.
14. Ne pas utiliser les composants du kit au-delà de la date d'expiration.
15. Ne pas mélanger les composants d'un kit avec ceux d'un autre lot.

Préparation des réactifs

Bain (TBS/Tween 20) : Mesurer 50 mL de concentré de lavage (20X TBS/Tween 20) et diluer jusqu'à 1 litre avec de l'eau de qualité réactif. Conserver la solution TBS/Tween 20 inutilisée au réfrigérateur entre 2 et 8°. Mettre au rebut si la solution montre des signes de contamination microbienne.

Contrôles d'urine : Reconstituer les contrôles d'urine (niveaux 1, 2 et 3) avec 0,5 mL d'eau de qualité réactif. Tourner doucement et laisser 10 minutes pour la reconstitution. Les portions restantes peuvent être placées dans des aliquots à usage unique et congelées au minimum à -20°C pendant un an.

Procédure d'analyse

1. Retirer les bandes de microcupule qui ne seront pas utilisées dans le cadre. Les conserver dans le paquet dessiccatif dans le sac refermable fourni.
2. Préparer la courbe de référence. Numéroté six tubes de 1 à 6. Ajouter 500 µL de solution de référence AspirinWorks® 5000 pg/mL dans le tube #1. Ajouter 250 µL de diluant d'échantillon dans les #2 à 6. Retirer 250 µL du tube #1, transférer au tube #2 et bien mélanger. Répéter cette série de dilution 1:2 jusqu'au tube #6. Les préparations obtenues doivent être les suivantes : 5000, 2500, 1250, 625, 312,5 et 156,25 pg/mL.
3. Préparer une dilution 1:5 des contrôles et des échantillons dans le diluant d'échantillon, ex. 100 µL d'échantillon ajouté à 400 µL de diluant d'échantillon correspond à une dilution d'échantillon de 1:5.
4. Des déterminations de cupule doubles sont recommandées pour la solution de référence, les échantillons patient et les échantillons de contrôle. Mélanger soigneusement toutes les dilutions d'échantillon, et ajouter 100 µL des dilutions (6 dilutions de solution de référence, échantillons patient et contrôles) dans les microcupules appropriées.
5. Un échantillon de liaison maximum (B₀) doit être réalisé (le B₀ contient l'anticorps et le traceur, mais pas d'analyte concurrente). Ajouter 100 µL de diluant d'échantillon pour dupliquer les cupules désignées pour le B₀.
6. Une analyse à blanc doit aussi être réalisée. Laisser les doubles des cupules d'essai à blanc vides.
7. Ajouter 50 µL de AP-Tracer Solution (rouge) à chacune des 6 cupules de solution de référence, aux cupules d'échantillon patient, aux cupules de contrôle et aux cupules B₀. Laisser les cupules d'essai à blanc vides.
8. Ajouter 50 µL Solution D' Anticorps (bleue) à chacune des 6 cupules de solution de référence, aux cupules d'échantillon patient, aux cupules de contrôle et aux cupules B₀. Laisser les cupules d'essai à blanc vides.

Les microcupules doivent contenir les volumes de réactif suivants :

<u>Courbe de référence</u>	<u>AP-Tracer Solution</u>	<u>Antibody Solution</u>
100 µL 5000 pg/mL	50 µL	50 µL
100 µL 2500 pg/mL	50 µL	50 µL
100 µL 1250 pg/mL	50 µL	50 µL
100 µL 625 pg/mL	50 µL	50 µL
100 µL 312,5 pg/mL	50 µL	50 µL
100 µL 156,25 pg/mL	50 µL	50 µL
100 µL Sample Diluent (B ₀)	50 µL	50 µL
<u>Echantillons/Contrôles</u>	<u>AP-Tracer Solution</u>	<u>Antibody Solution</u>
100 µL	50 µL	50 µL

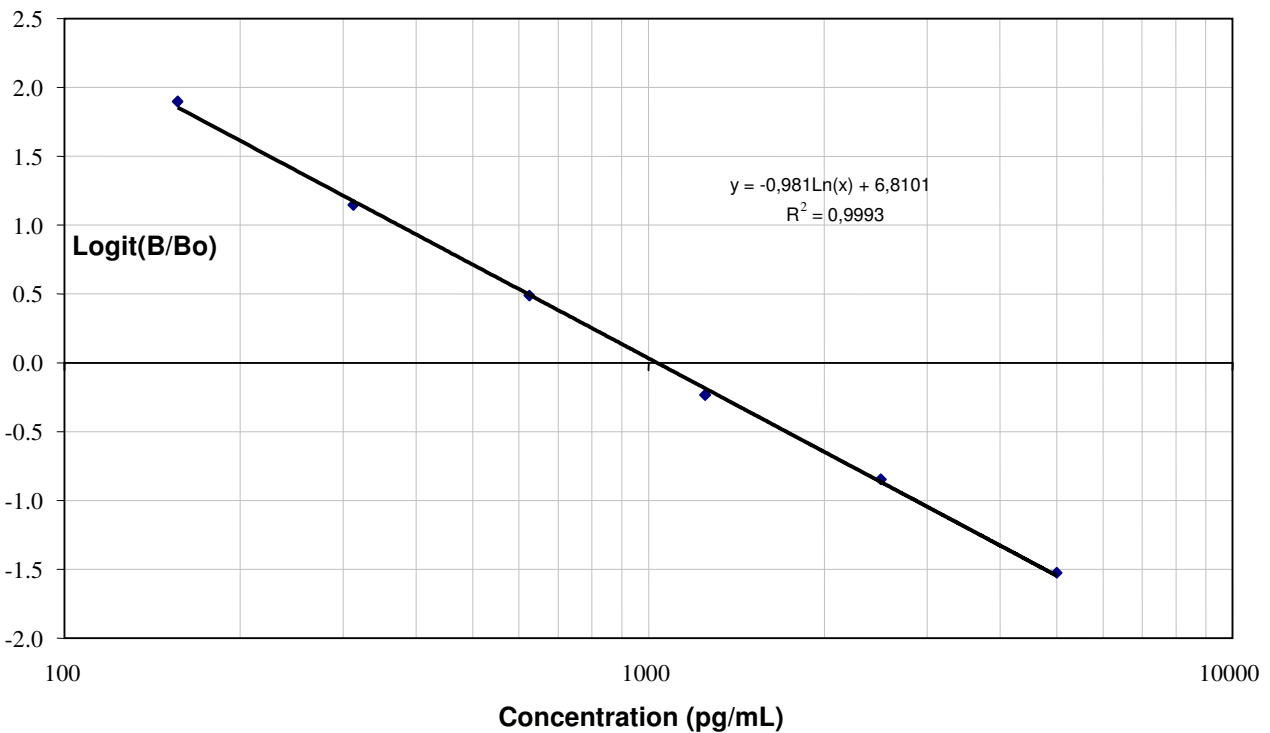
9. Couvrir la plaque avec le joint adhésif fourni et incubé pendant 2 heures à température ambiante (18 à 26°C) sur un agitateur rotatif) 300-600 rpm. Une fois l'incubation terminée, attraper fermement la microplaque par le haut et par le bas pour retenir les modules de microcupule et retourner soigneusement les microcupules pour vider le fluide échantillon. Ne pas laisser les échantillons contaminer d'autres microcupules.
10. Laver 5 fois avec la solution de lavage à température ambiante. Chaque cupule doit être complètement remplie de TBS/Tween 20 à chaque lavage. Retourner les microcupules entre chaque lavage pour vider le fluide. Bien secouer les cupules pour éliminer le liquide. Passer un papier absorbant pour retirer toute trace résiduelle de liquide de lavage. Ne pas laisser les cupules sécher entre les étapes.
11. Ajouter 200 µL de substrat pNPP à chaque cupule y compris le B₀ et tester les cupules à blanc, couvrir avec un nouveau joint adhésif et incubé pendant 30 minutes à température ambiante avec un agitateur rotatif. Ajouter le substrat aux cupules à un rythme régulier. Une coloration jaune va se développer dans les cupules de manière proportionnellement inversée à la quantité de 11dhTxB₂ présente.
12. Ajouter 100 µL de Arrêt De la Solution à chaque cupule, y compris le B₀ et tester les cupules à blanc, pour stopper la réaction enzymique. Veillez à ajouter la Arrêt De la Solution dans les cupules dans le même ordre et au même rythme que pour l'ajout du substrat.
13. Faire marcher à blanc le lecteur de plaque ou le remettre à zéro. Lire la D.O. de chaque cupule entre 405 et 420 nm. Les valeurs D.O. doivent être mesurées dans l'heure qui suit l'ajout de la Arrêt De la Solution.

Résultats

Les résultats d'analyse doivent être calculés par une procédure logarithmique avec une ligne « optimale » tracée entre les points de référence, ou par d'autres procédures reconnues. Intercaler les valeurs relatives des contrôles et des échantillons patient à partir de la courbe de référence, et multiplier les valeurs relatives par le facteur de correction pour la solution de référence (voir l'étiquette de la fiole). Normaliser les résultats des patients en incorporant les niveaux de créatinine, c'est-à-dire en divisant le résultat 11dhTx_{B₂} (en pg/mL) par le résultat créatinine pour l'échantillon patient (en mg/dL) et en multipliant par 100. Le résultat du patient peut être reporté en créatinine pg 11dhTx_{B₂}/mg. Vérifier que tous les paramètres de contrôle de qualité aient été respectés (voir la section Contrôle de qualité) avant de reporter les résultats.

Voir l'exemple d'une courbe de référence 11dhTx_{B₂} ci-dessous. Cette courbe de référence est à titre indicatif uniquement. Une courbe de référence doit être élaborée par l'utilisateur pour chaque analyse réalisée.

Courbe de référence (À titre indicative uniquement – ne pas utiliser)



Calcul de résultats

Calculer la formule suivante pour chaque concentration utilisée dans la courbe de référence et pour chaque échantillon patient, sur base de la D.O. individuelle :

$$P = \frac{(\text{DO individuelle pour cette concentration} - \text{DO moyenne pour les cupules à blanc})}{(\text{DO moyenne pour le } B_0 - \text{DO moyenne pour les cupules à blanc})}$$

Noter que pour chaque niveau de référence et chaque échantillon patient, P doit être entre zéro et 1 ou il n'est pas la peine de continuer les calculs. Puis calculer :

$Y = \text{Log}(P/(1-P))$ pour chaque échantillon patient et pour chaque niveau de référence

Y = moyenne de deux valeurs de cupule individuelles

Reporter Y contre $X = \log(x)$ pour chaque niveau de référence où x est la concentration réelle de cette référence. Les points doivent tomber très près d'une ligne droite. Il est possible d'utiliser la base logarithmique 10 ou d'utiliser la base e (logarithme naturel), mais il ne faut pas mélanger les deux systèmes logarithmiques. Effectuer une régression linéaire et contrôler l'inclinaison (a_1), l'intersection (a_0) et la valeur R^2 . Cette dernière doit être supérieure à 0,95 pour continuer.

Vous pouvez maintenant évaluer les résultats du patient en utilisant la valeur de Y calculée pour chaque patient, en résolvant pour X, puis en obtenant une valeur pour les échantillons du patient :

$$Y = a_1X + a_0 \quad \text{ou} \quad X = (Y - a_0)/a_1$$

La valeur relative est : 10^X si vous avez utilisé la base logarithmique 10
 $\exp(X)$ si vous avez utilisé le logarithme naturel

Déterminer la moyenne des valeurs X dupliquées.

X = moyenne de deux valeurs de cupule individuelles

Pour calculer le niveau de 11dhTx B_2 en pg/mL, multiplier les valeurs relatives des contrôles et des échantillons du patient par le facteur de correction pour la solution de référence (voir l'étiquette de la fiole).

Normaliser les résultats du patient en incorporant les niveaux de créatinine. Diviser le résultat 11dhTx B_2 (en pg/mL) par le résultat créatinine pour l'échantillon patient (en mg/dL) et en multipliant par 100. Le résultat du patient peut être reporté en créatinine pg 11dhTx B_2 /mg.

Exemple :

- La valeur relative du patient est : 1000
- Le facteur de correction de la solution de référence : 1,05
- La valeur 11dhTx B_2 réelle du patient est : $1000 \times 1,05 = 1050$ pg/mL.
- Valeur de créatinine du patient = 150 mg/dL
- Valeur finale reportée : $(1050 \text{ pg/mL} / 150 \text{ mg/dL}) \times 100 = 700$ pg 11dhTx B_2 /mg de créatinine
- Dans cet exemple, le résultat de créatinine de 700 pg 11dhTx B_2 /mg est en dessous du seuil de créatinine de 1500 pg 11dhTx B_2 /mg, ce qui suggère que l'effet de l'aspirine est détecté.

Interprétation des résultats

Le résultat d'échantillon se base sur le niveau de 11-Déhydro Thromboxane B_2 mesuré dans l'échantillon d'urine, normalisé par la concentration de créatinine urinaire dans l'échantillon et reporté en pg/mg. L'interprétation des résultats se base sur les seuils suivants :

Interprétation des résultats :

> 1500 pg/mg Les niveaux normalisés de 11-Déhydro Thromboxane B_2 indiquent un effet insuffisant de l'aspirine

≤ 1500 pg/mg Les niveaux normalisés de 11-Déhydro Thromboxane B_2 indiquent que l'aspirine a un effet

CONTROLE QUALITE

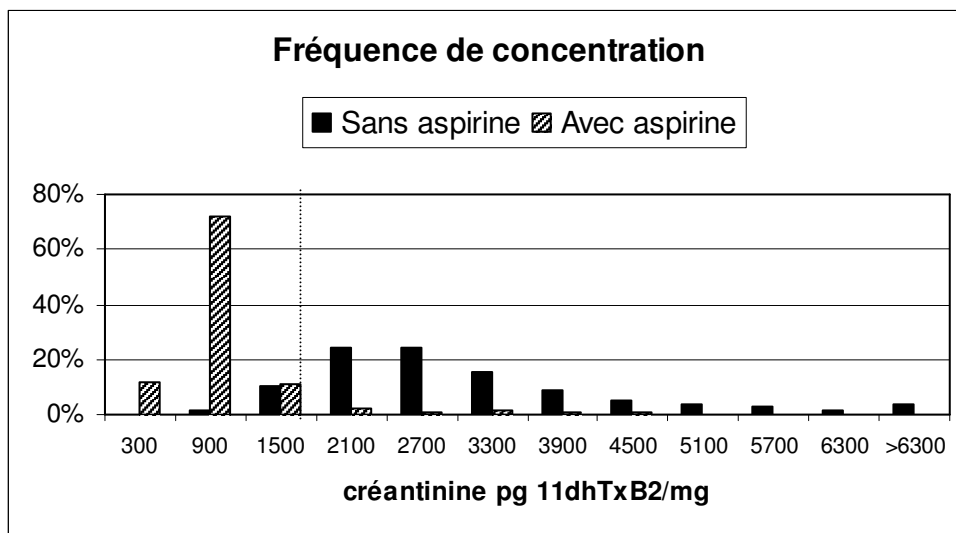
1. La D.O. moyenne des cupules B_0 (liaison maximum) doit être $\geq 0,600$. Les résultats inférieures à 0,600 peuvent indiquer une contamination possible du réactif ou un lavage insuffisant de la plaque.
2. La D.O. moyenne de l'analyse à blanc (point zéro) doit être $\leq 0,300$. Les résultats supérieurs à 0,300 peuvent indiquer une contamination possible du réactif ou un lavage insuffisant de la plaque.
3. Les valeurs 11dhTx B_2 obtenues pour les contrôles doivent se trouver dans les fourchettes imprimées sur chaque étiquette.
4. Chaque laboratoire doit déterminer périodiquement ses propres fourchettes de valeurs suivant la population de ses patients.

5. Les échantillons avec des valeurs en dehors de 300 – 4 000 pg/mL sont en dehors de la fourchette linéaire de la courbe de référence et peuvent être retestés à une dilution appropriée. Si une valeur d'échantillon est en dessous de 300 pg/mL, l'échantillon peut être retesté en utilisant un nouvel aliquot à une dilution 1:2 dans du diluant d'échantillon (250 µL échantillon + 250 µL diluant). Si une valeur d'échantillon est supérieure à 4 000 pg/mL, l'échantillon peut être retesté en utilisant un nouvel à une dilution de 1:10 (50 µL échantillon + 450 µL diluant) ou à une dilution 1:20 (25 µL échantillon + 475 µL diluant).
6. Les D.O. pour les duplicats des contrôles et des échantillons de patient doivent avoir une variation maximum de 20% par rapport à la valeur D.O. moyenne des échantillons et dans la fourchette de 300 – 4 000 pg/mL.
7. Les valeurs R^2 pour la courbe de référence doivent être $\geq 0,95$.

PERFORMANCES

Valeurs attendues :

Les performances du kit de test AspirinWorks® ont été évaluées dans une étude réalisée auprès de 166 adultes apparemment en bonne santé avant et/ou après avoir reçu des doses contrôlées d'aspirine (201 échantillons de personnes prenant de l'aspirine et 204 échantillons de personnes n'en prenant pas). Les concentrations de 11-Déhydro Thromboxane B₂ ont été mesurées et normalisées en divisant par la concentration de créatinine. Un graphique de distribution de la fréquence des 405 échantillons se trouve ci-dessous. Sur base de ces fréquences, un seuil a été établi à 1 500 pg 11dhTxB₂ par mg de créatinine urinaire.



Performance clinique :

La performance clinique du test AspirinWorks® de Corgenix a été évaluée chez ces personnes. Les résultats d'AspirinWorks® sont présentés comme positifs ou négatifs, sur base du seuil de 1500 pg 11-Déhydro Thromboxane B₂ par mg de créatinine urinaire. Un tableau est présenté pour les doses d'aspirine de 81 mg et de 325 mg.

		Ingestion d'aspirine	
		Présente	Absente
Résultat d'AspirinWorks® 81 mg	Positif (≤1500 pg/mg créatinine)	156	20
	Négatif (>1500 pg/mg créatinine)	7	146
Total		163	166

Pourcentage général = 91,8%
 Pourcentage positif = 95,7%
 Pourcentage négatif = 88,0%

		Ingestion d'aspirine	
		Présente	Absente
Résultat d'AspirinWorks® 325 mg	Positif (≤1500 pg/mg créatinine)	34	4
	Négatif (>1500 pg/mg créatinine)	4	34
Total		38	38

Pourcentage général = 89,5%

Pourcentage positif = 89,5%

Pourcentage négatif = 89,5%

Comparaison de dispositif

Le kit de test AspirinWorks® a été comparé à l'Accumetrics® VerifyNow™ Aspirin Assay en utilisant 173 échantillons d'urine d'adultes apparemment en bonne santé. Les données sont présentées dans le tableau ci-dessous.

		Résultat VerifyNow™	
		Positif (<550 ARU)	Négatif (≥550 ARU)
Résultat d'AspirinWorks®	Positif (≤1500 pg/mg créatinine)	77	11
	Négatif (>1500 pg/mg créatinine)	7	78
Total		84	89

Pourcentage général = 89,6%

Pourcentage positif = 91,7%

Pourcentage négatif = 87,6%

Performance analytique :

Fourchette de détection :

La fourchette de détection pour 11-Déhydro Thromboxane B₂ dans le kit de test AspirinWorks® est 300 – 4 000 pg/mL d'urine. Pour une plus grande précision, les échantillons qui génèrent des valeurs supérieures à 4 000 pg/mL doivent être retestés à une dilution appropriée. La concentration analyte reportée doit être normalisée en divisant le 11dhTxB₂ mesuré par la concentration de créatinine mesurée dans une analyse séparée.

Précision :

Trois échantillons d'urine ont été analysés sur 24 cupules/plaque sur trois plaques/lot, renouvelé sur trois lots pour un total de 216 mesures par échantillon d'urine. Le résultat d'un test est défini comme la moyenne de deux mesures, c'est-à-dire les résultats de l'étude de 108 mesures d'analyse (12 par plaque sur trois plaques/lot réalisé sur trois lots de plaques) sur lesquels baser les calculs de précision indiqués dans le tableau ci-dessous.

Urine #	Concentration moyenne de 11-DéhydroThromboxane B ₂	Répétabilité en %CV	Précision de laboratoire en %CV
---------	---	---------------------	---------------------------------

1	424 pg/mL	8%	14%
2	1399 pg/mL	5%	7%
3	3380 pg/mL	5%	10%

Interférence :

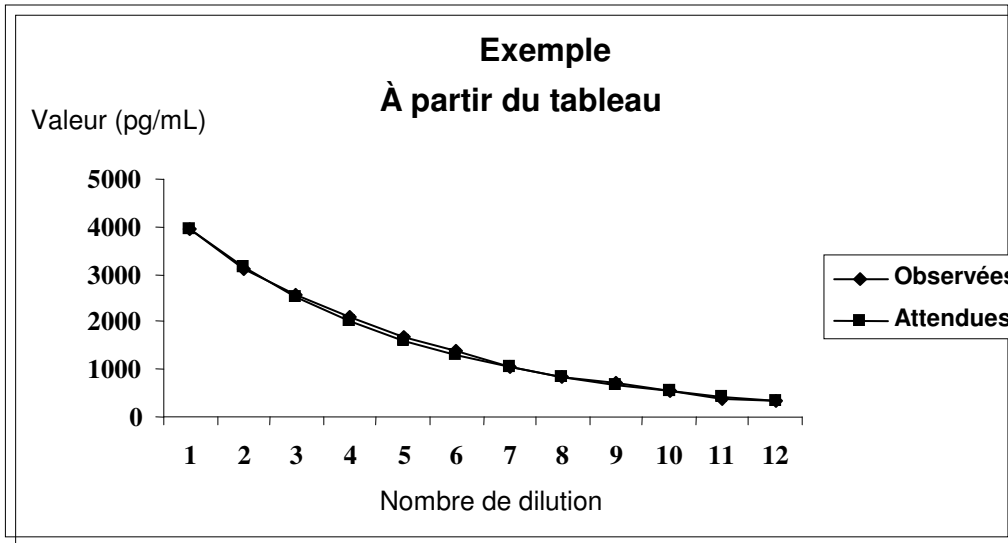
Les échantillons ont été testés pour une interférence potentielle. Les matières suivantes n'ont eu aucun effet significatif sur la concentration mesurée de 11-Déhydro Thromboxane B₂ :

Composé	Concentration
Acétaminophène	200 mg/dL
Acide acétylsalicylique	200 mg/dL
Acide ascorbique	200 mg/dL
Caféine	200 mg/dL
Acide gentisique	200 mg/dL
Glucose	2000 mg/dL
Hémoglobine	1000 mg/dL
Protéine	2000 mg/dL
Acide salicylique	200 mg/dL

Rétablissement :

Différents échantillons contenant une valeur élevée de 11dhTx_{B2} ont été dilués d'après la fourchette de l'analyse. Les échantillons ont ensuite été dilués en série à 1:1,25 avec du diluant d'échantillon pour un ensemble final de 11 - 12 dilutions en série englobant la fourchette de l'analyse et testés avec AspirinWorks®. Les concentrations attendues pour chaque dilution ont été calculées sur base de la valeur obtenue pour la première dilution de chaque échantillon. Les valeurs observées ont été comparées aux valeurs attendues, et un ratio valeurs observées/attendues a été calculé en pourcentage. Le tableau et le graphique ci-dessous montrent les résultats de ces tests. D'autres échantillons d'urine testés ont révélés des résultats similaires.

Dilution #	Observée (pg/mL)	Attendue (pg/mL)	Obs/Att (%)
1	3939	3939	100%
2	3095	3151	98%
3	2573	2521	102%
4	2082	2017	103%
5	1683	1613	104%
6	1391	1291	108%
7	1068	1033	103%
8	835	826	101%
9	694	661	105%
10	538	529	102%
11	399	423	94%
12	342	338	101%



Limite de détection :

Sur base de 216 déterminations utilisant le Document EP17-A de CSLI (72 déterminations à blanc et 144 déterminations positives), la limite de détection de 11dhTx_{B2} est 222 pg/mL, avec une probabilité de 95% d'obtenir une réponse positive à ce niveau et une probabilité de 95% d'obtenir une réponse négative pour les échantillons à blanc. Une limite à blanc de 151 pg/mL a été utilisée.

LIMITES DU TEST

Les niveaux de 11-Déhydro Thromboxane B₂ obtenus dans cette analyse peuvent être utilisés pour évaluer la présence de l'effet de l'aspirine chez une personne. Chaque médecin doit interpréter ces résultats en fonction de l'histoire, du style de vie et d'autres facteurs de risque du patient. Il est nécessaire de prendre en compte les médicaments et les suppléments nutritionnels et/ou diététiques pour déterminer si un patient démontre un effet à l'aspirine étant donné que certains réactifs comme l'alcool, les extraits de thé vert, le chocolat, les acides gras oméga-3, l'ibuprofène et les inhibiteurs COX-2 peuvent provoquer un effet similaire à celui de l'aspirine et réduire la production de thromboxane chez certaines personnes.

Les échantillons contenant trop de sédiments, de sang ou d'autres matières insolubles n'ont pas été évalués et ne doivent pas être utilisés pour ce type d'analyse.

Les échantillons de personnes prenant des anticoagulants oraux, des inhibiteurs de glycoprotéine IIb/IIIa, du clopidogrel ou de l'héparine n'ont pas été pris en compte pour l'analyse avec le kit de test AspirinWorks®.

Il n'est pas recommandé de tester les personnes souffrant d'infections du canal urinaire, de maladies graves du foie ou d'une maladie rénale en phase finale.

Garantie

Ce produit est garanti pour fonctionner comme décrit dans la notice de cet emballage. Corgenix, Inc. refuse toute garantie implicite relative à la qualité marchande ou à l'aptitude à un usage particulier. Corgenix, Inc. ne peut en aucun cas être tenu responsable pour un dommage indirect.

Pour contacter le service technique ou le service client depuis les États-Unis, composer le 1-800-729-5661. En dehors des États-Unis, composer le (303) 457-4345, fax (303) 457-4519, ou contacter un revendeur Corgenix agréé.

AspirinWorks® est une marque déposée de Creative Clinical Concepts, Inc.

Tout ou partie du contenu de la notice du kit de test AspirinWorks® est couvert par un brevet en instance.

AspirinWorks® Kit de Prueba (11-Dehydro Tromboxano B₂)

Para uso de diagnóstico in vitro

USO PREVISTO

El kit de pruebas AspirinWorks® es un ensayo inmunológico vinculado con enzimas (ELISA) para determinar los niveles de 11-Dehydro Tromboxano B₂ (11dhTxB₂) en la orina humana, que ayuda en la detección del efecto de la aspirina después de la ingestión.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL ENSAYO

Las plaquetas activadas y agregadas juegan un papel clave en la patogenia de la enfermedad vascular. Las plaquetas activadas producen Tromboxano A₂ (TxA₂), un potente vasoconstrictor e inductor de la agregación de plaquetas.¹⁻² TxA₂ es generado por medio de síntesis de Tromboxano a partir de las moléculas derivadas del ácido araquidónico mediante cyclooxygenase-1 (COX-1).^{1,3} TxA₂ tiene una vida media breve en plasma y es rápidamente hidrolizada para producir Tromboxano B₂ (TxB₂). A su vez, TxB₂ es metabolizado y se convierte en 11-Dehydro Tromboxano B₂ (11dhTxB₂), 11-Dehydro 2,3 dinor Tromboxano B₂ (11dh2,3DTxB₂, una forma troncada de 11dhTxB₂), y una cantidad de otros metabolitos TxB₂ menos importantes que son excretados por el riñón.⁴⁻⁷ Por tanto, 11dhTxB₂ es un metabolito estable de TxA₂ y un indicador de la actividad de la plaqueta.

Una parte importante de la terapia antiplaqueta en la enfermedad cardiovascular es la aspirina (ácido acetilsalicílico), que se sabe desde hace muchos años que tiene actividad antiplaqueta.⁸ La forma en que funciona la aspirina es acetilando e inhibiendo irreversiblemente COX-1, por tanto inhibiendo la producción de TxA₂ y sus metabolitos.⁹⁻¹¹ La aspirina en dosis bajas boquea más del 95% de la actividad de COX-1 en la plaqueta¹²⁻¹³ y reduce los eventos cardiovasculares hasta un 25% en pacientes con enfermedad vascular arterial.¹⁴ Sin embargo, la respuesta de la aspirina varía entre las personas. Se ha estimado que un 10-20% de los usuarios de aspirina tienen sucesos trombóticos recurrentes.¹² A este fenómeno se le ha denominado resistencia de la aspirina¹⁵⁻¹⁶ y entre un 5 y 57% de los usuarios de aspirina pueden mostrar una pobre respuesta a las dosis típicas, en función de la técnica de medición utilizada y la población analizada.¹⁷⁻²¹

Hay un número de métodos basados en sangre que determinan la respuesta de una persona a la terapia diaria de aspirina al medir la activación de plaqueta *ex vivo*.^{15,22} Estos métodos, sin embargo, están influidos por factores no relacionados con el efecto específico de la aspirina en la vía cyclooxygenase, que incluyen el factor von Willebrand factor (vWF), Factor VIII y los niveles de hematocritos, así como otras variables presentes en la venopunción. De forma alternativa, la medición de los metabolitos estables de TxA₂, por ejemplo el urinario 11dhTxB₂, es una forma de cuantificar en modo estimado la producción de TxA₂ *in vivo* y, por tanto, es una forma directa de analizar el efecto de la aspirina después de su ingestión.^{7,23-25} La prueba AspirinWorks® puede determinar si la dosis de aspirina ingerida por una persona está inhibiendo la actividad de cyclooxygenase en la plaqueta, mediante la medición de 11dhTxB₂.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El kit de prueba AspirinWorks® mide el urinario 11dhTxB₂ y se realiza como método ELISA competitivo. Las muestras diluidas (Solución de referencia, controles y orina del paciente), el 11dhTxB₂ purificado, conjugado en fosfatasa alcalina, y el anticuerpo monoclonal de ratón dirigido a 11dhTxB₂ son combinados e incubados en micropozos revestidos de un anticuerpo antiratón policlonal. La incubación permite al 11dhTxB₂ endógeno, presente en las muestras, competir con el 11dhTxB₂ purificado y conjugado con AP para unirse con el anticuerpo anti-11dhTxB₂ monoclonal de ratón. El anticuerpo monoclonal entonces se une con el anticuerpo anti-ratón policlonal que está revestido sobre la placa microtiter. El complejo formado sobre la placa está compuesto de anticuerpo monoclonal y 11dhTxB₂ endógeno o conjugado con AP. Después de la extracción por medio de lavado de los componentes no unidos, el conjugado AP-11dhTxB₂ unido es sometido a ensayo mediante la adición de un sustrato cromogénico de paranitrofenil fosfato (pNPP). Se desarrolla color en los pozos de una intensidad inversamente proporcional a la concentración de 11dhTxB₂ en la orina de la muestra, y se obtiene la lectura de 405nm. Los resultados (pg/mL) son calculados en contraste con una curva de referencia preparada a partir de la Solución de referencia que se proporciona con el kit.

Los resultados finales aparecen en el informe como creatinina pg 11dhTxB₂ por mg, con el fin de normalizar los resultados para la concentración de orina.

REACTIVOS

Almacénelos a una temperatura de 2–8 °C. No los congele.

Cada kit de pruebas AspirinWorks® contiene los siguientes reactivos

(los volúmenes pueden variar en función del tamaño y configuración del kit):

- Micropozos revestidos de anticuerpo estabilizado (cabra) de 12 x 8, con estructura.
- Diluyente de muestra de 60 mL* (Botella con tapón verde).
- Solución de referencia de 1,75 mL 5000 pg/mL* (11dhTxB₂ en tampón), para preparación de la curva de referencia; consulte la etiqueta del vial para conocer el factor de corrección específico del lote.
- 1 frasco liofilizado Control de nivel 1 (orina humana) que será reconstituido a 0,5 mL con agua purificada; consulte la etiqueta del vial para conocer el rango previsto.
- 1 frasco liofilizado Control de nivel 2 (orina humana) que será reconstituido a 0,5 mL con agua purificada; consulte la etiqueta del vial para conocer el rango previsto.
- 1 frasco liofilizado Control de nivel 3 (orina humana) que será reconstituido a 0,5 mL con agua purificada; consulte la etiqueta del vial para conocer el rango previsto.
- Solución de trazador AP de 10 mL, solución roja (11dhTxB₂ purificado, conjugado en fosfatasa alcalina).
- Solución anticuerpo de 10 mL (murina), solución azul (anticuerpo purificado de anti-11dhTxB₂).
- Sustrato pNPP de un componente de 23 mL (para-nitrofenilfosfato, estabilizado); listo para usarse.
- Solución de detención de 15 mL (0,1 M EDTA); listo para el uso (tapón rojo).
- Concentrado para lavado de 2 x 50 mL TBS/Tween 20 (20X).
- 2 adhesivos selladores de placa.

* **PRECAUCIÓN: Contiene azida sódica**

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso de diagnóstico in vitro

1. El material de origen humano que se usa para preparar los controles incluidos en este kit debe ser manipulado como material potencialmente infeccioso. Use las precauciones universales cuando lo esté manipulando.
2. No utilice la pipeta con la boca.
3. No fume, coma ni beba en áreas en las que se están manipulando muestras o reactivos del kit.
4. Use guantes desechables mientras manipula los reactivos del kit y lávese las manos minuciosamente después.
5. El sustrato pNPP puede causar irritación en los ojos. Es posible que se produzca absorción a través de la piel. Utilice guantes cuando esté manipulando el sustrato y láveselas bien después.
6. Ciertos componentes de este producto contienen azida sódica como preservativo (el diluyente de muestra y la solución de referencia). Existen informes de que la azida sódica forma azida de plomo y cobre cuando se deja en contacto con estos metales. Estas azidas de metal son explosivas. Cualquier solución que contenga azida debe ser eliminada con cantidades abundantes de agua para evitar que se acumulen azidas de metal explosivas en las tuberías.
7. Determinados componentes están etiquetados con lo siguiente:
Irritante para los ojos (R 36). Irritante para la piel (R 38). Evite el contacto con la piel (S 24). Evite el contacto con los ojos (S 25). En caso de que se produzca un contacto con los ojos, enjuáguelos inmediatamente con cantidades abundantes de agua y obtenga atención médica (S 26). Lleve ropas de protección adecuadas (S 36) Si se traga, obtenga atención médica inmediata y muestre este contenedor o etiqueta (S 46)

Irritante  Riesgo biológico .

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

La orina humana es la matriz de muestra recomendada. Las muestras deben recogerse y someterse a prueba en un plazo de cuatro horas. Si no se someten a prueba inmediatamente, las muestras deben almacenarse a una temperatura de entre 2 y 8 °C. Si se van a almacenar durante más de 24 horas, deberán congelarse a ≤ -20 °C. Las muestras frescas o descongeladas deben centrifugarse a 1000xg durante 15 minutos antes de realizar la prueba. Cada muestra debe ser sometida a prueba tanto con creatinina como 11dhTxB₂ para obtener resultados exactos.

INSTRUCCIONES DE USO

Materiales suministrados:

AspirinWorks® Test Kit; para una lista completa, vea la sección “Reactivos”.

Materiales necesarios pero no suministrados:

- Agua de grado reactivo para preparar la solución de lavado TBS/Tween 20 y los componentes liofilizados
- Cilindros graduados
- Pipetas de precisión capaces de administrar entre 50 µL y 1000 µL, con las puntas apropiadas
- Varios recipientes de cristal apropiados para la manipulación pequeños volúmenes
- Frasco o botella, 1 litro
- Botellas de lavado, preferiblemente con la punta parcialmente recortada con el fin de proporcionar un chorro amplio, o un sistema de lavado automático o semi automático
- Guantes desechables
- Espectrofotómetro para lectura de placas capaz de leer valores de absorbancia entre 405 y 420 nm
- Pipetas de varios canales capaces de administrar hasta 8 pozos simultáneamente
- Agitador rotatorio con una capacidad de 300 - 600 rpm (Son aceptables las velocidades entre 300 y 600 rpm pero 600 rpm es la recomendada)

Notas sobre el procedimiento

1. Obtenga los valores de creatinina urinaria para cada muestra de paciente.
2. Ponga las muestras de orina y los reactivos del kit a la temperatura ambiente (18–26°C) y mezcle bien antes de usar; evita la formación de espuma. Devuelva todos los reactivos no usados a un lugar de almacenamiento refrigerado lo antes posible. Los controles que quedan pueden administrarse en porciones de un solo uso y refrigerados a -20°C o temperaturas más bajas para uso posterior.
3. Las muestras congeladas deben descongelarse y centrifugarse a 1000 xg antes de la prueba.
4. Todos los diluidos de la solución de referencia, controles y muestra de paciente deben hacerse justo antes de utilizarlas en el ensayo.
5. El lector de placas debe programarse para blanco de aire.
6. Una buena técnica de lavado es crucial para el rendimiento óptimo del ensayo. El lavado adecuado se realiza mejor mediante un chorro enérgico de solución de lavado hacia la parte inferior de los micropozos, apretando una botella de plástico de boca ancha. También se puede usar un sistema automático de lavado de placas microtiter.
IMPORTANTE: No eliminar de forma adecuada los residuos de TBS/Tween 20 puede producir un desarrollo inconsistente del color en la solución del sustrato.
7. Cuando sea posible, utilice una pipeta de varios canales que sea capaz de administrar 8 pozos simultáneamente. Así se acelera el proceso y se proporcionan tiempos de incubación y reacción más uniformes para todos los pozos.
8. Añada reactivos cuidadosamente al lado de los micropozos para evitar la contaminación entre pozos por la punta de la pipeta, o cambie las puntas con cada fila de reactivos añadidos.
9. Una temporización cuidadosamente controlada de todos los pasos es crucial. Todos los diluidos de solución de referencia, controles y muestras deben ser agregados con la mayor rapidez y consistencia posibles.
10. En todas las incubaciones el inicio del periodo de incubación comienza en el momento en que se termina de agregar reactivo o muestra.
11. La adición de muestras y reactivos debe realizarse al mismo ritmo y en la misma secuencia, con la adición en primer lugar de los diluidos de muestras, controles y solución de referencia, y a continuación la adición del trazador. El anticuerpo monoclonal debe añadirse en último lugar.
12. Las temperaturas de incubación que no sean la temperatura de ambiente normal (18-26°C) pueden contribuir a que se produzcan resultados imprecisos.
13. Evite la contaminación de reactivos al abrir y retirar las porciones de los viales primarios.
14. No utilice los componentes del kit después de su fecha de caducidad.
15. No mezcle los componentes de kit que pertenezcan a números de lote diferentes.

Preparación de los reactivos

Solución de lavado (TBS/Tween 20): Tome una medida de 50 mL de concentrado de lavado (20X TBS/Tween 20) y dilúyalo con 1 litro de agua de grado reactivo. Almacene la solución no utilizada de TBS/Tween 20 en el frigorífico a una temperatura de 2–8°C. Deséchela si muestra signos de contaminación microbiana.

Controles de orina: Reconstituya los controles de orina (Niveles 1, 2, y 3) con 0,5 ml agua de grado reactivo. Déle vueltas suavemente y déjelo secar durante 10 minutos para su reconstitución. Las porciones no utilizadas pueden administrarse en porciones de un solo uso y refrigeradas a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ durante un tiempo máximo de un año.

Procedimiento del ensayo

1. Retire de la estructura cualquier banda de micropozo que no se vaya a usar. Almacénelas con el paquete de secante en la bolsa resellable que se suministra.
2. Prepare la curva de referencia. Etiquete los seis tubos nº 1-6. Añada 500 μL de Solución de referencia AspirinWorks® 5000 pg/mL al tubo nº 1. Añada 250 μL de diluido de muestra a los tubos nº 2-6. Retire 250 μL del tubo nº 1, transfíralo al tubo nº 2 y mézclelo bien. Repita esta serie de diluidos 1:2 hasta el tubo nº 6. Los estándares preparados resultantes son 5000, 2500, 1250, 625, 312,5, y 156,25 pg/mL.
3. Prepare un diluido 1:5 de los controles y muestras de paciente en el Diluido de muestra, por ejemplo, 100 μL de muestra añadido a 400 μL de diluido de muestra es igual a un diluido de muestra de proporción 1:5.
4. Se recomienda determinar pozos duplicados para la solución de referencia y las muestras de paciente y controles. Mezcle todos los diluidos de muestra completamente, y añada 100 μL de diluidos (6 diluidos de solución de referencia, muestras de pacientes y controles) a los micropozos apropiados.
5. Se debería realizar una muestra de máxima unión (B_0) (la B_0 contiene anticuerpo y trazador, pero no contiene un analito competitivo). Añada 100 μL de diluido de muestra a los pozos duplicados designados por la B_0 .
6. También se debería ejecutar un blanco de ensayo. Deje vacíos los pozos duplicados del blanco de ensayo.
7. Añada 50 μL de solución de trazador de AP (rojo) a cada uno de los 6 pozos de solución de referencia, a los pozos de muestra de paciente y a los pozos de B_0 . Deje vacíos los pozos del blanco de ensayo.
8. Añada 50 μL de solución de anticuerpo (azul) a cada uno de los 6 pozos de solución de referencia, pozos de muestra de paciente, pozos de controles y a los pozos de B_0 . Deje vacíos los pozos del blanco de ensayo.

Los micropozos deberían contener los siguientes volúmenes de reactivos:

<u>Curva de referencia</u>	<u>Solución de trazador AP</u>	<u>Solución de anticuerpo</u>
100 μL 5000 pg/mL	50 μL	50 μL
100 μL 2500 pg/mL	50 μL	50 μL
100 μL 1250 pg/mL	50 μL	50 μL
100 μL 625 pg/mL	50 μL	50 μL
100 μL 312,5 pg/mL	50 μL	50 μL
100 μL 156,25 pg/mL	50 μL	50 μL
100 μL de diluido de muestra (B_0)	50 μL	50 μL
<u>Muestras/Controles</u>	<u>Solución de trazador AP</u>	<u>Solución de anticuerpo</u>
100 μL	50 μL	50 μL

9. Cubra la placa con el sellador de placa adhesivo que se suministra e incube durante dos horas a la temperatura ambiente (18-26°C) en un agitador rotatorio a 300-600 rpm. Una vez que la incubación se haya terminado, sujete firmemente el armazón de la microplaca por la parte superior e inferior para retener los módulos de micropozo y cuidadosamente invierta los micropozos para vaciar el fluido de la muestra. No permita que las muestras contaminen otros micropozos.
10. Lávelos 5 veces con una solución de lavado que se encuentre a la temperatura ambiente. Se debe llenar completamente cada pozo con TBS/Tween 20 por lavado. Invierta los micropozos entre cada lavado para vaciar el fluido. Haga un movimiento brusco de muñeca para sacudir el líquido de modo que se desprenda de los pozos. Séquelo con papel absorbente para eliminar los residuos de líquido de lavado. No deje que los pozos se sequen en los intervalos entre pasos.
11. Añada 200 μL de sustrato pNPP a cada pozo, incluidos los B_0 y los pozos de blancos de ensayo, cúbralos con un sellador de placa adhesivo nuevo e incube durante 30 minutos a la temperatura ambiente con agitación por rotación. Añada el sustrato a los pozos a un ritmo constante. Se desarrollará un color amarillo en los pozos inversamente proporcional a la cantidad de 11dhTx B_2 presente.

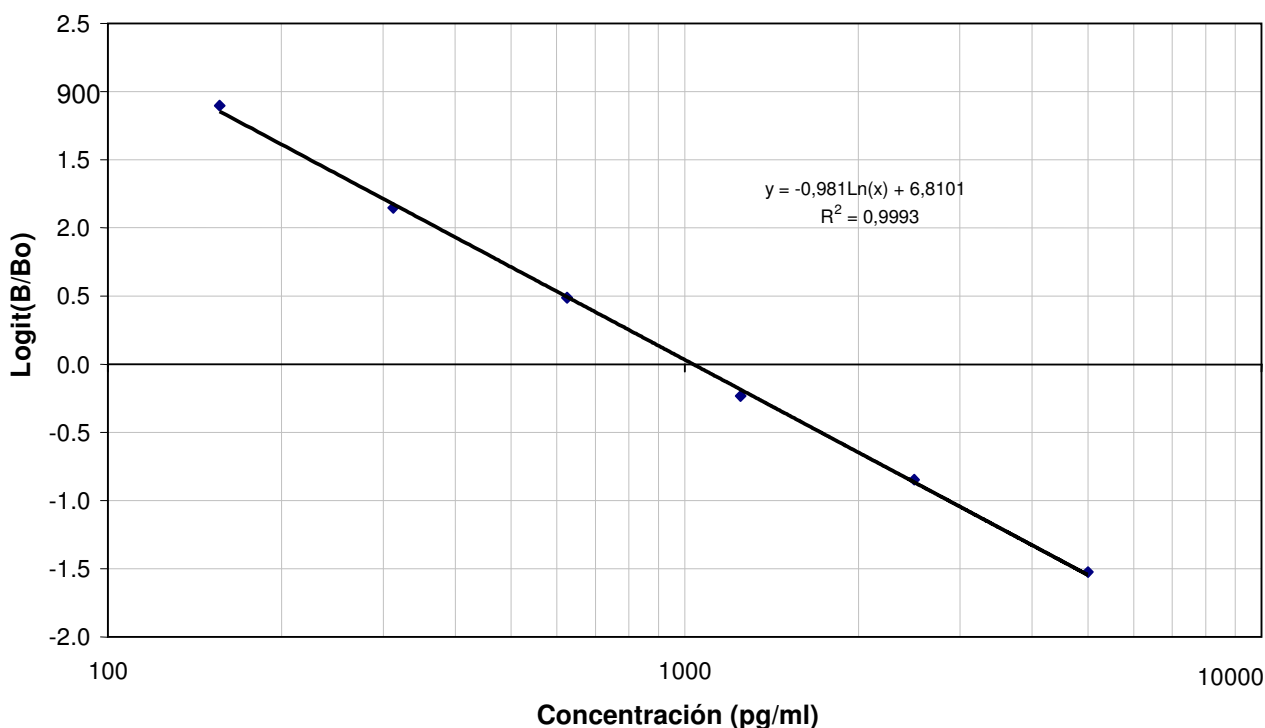
12. Añada 100 µL de solución de detención a cada pozo, incluidos los B₀ y los pozos de blancos de ensayo, para detener la reacción de enzima. Asegúrese de añadir solución de detención a los pozos en el mismo orden y al mismo ritmo que añadió el sustrato.
13. Borre con aire el lector de placas o póngalo a cero. Lea el O.D. de cada pozo entre 405 y 420 nm. Los valores de O.D. deben medirse en un plazo de una hora desde la adición de la solución de detención.

Resultados

Los resultados del ensayo deben calcularse por medio de un análisis con Log-logit, con una línea de “más apropiado” trazada a través de los puntos de referencia, o por medio de otro análisis de curva validado. Interpolar los valores relativos de control y paciente de la curva de referencia y multiplique los valores relativos por el factor de corrección de la solución de referencia (véase la etiqueta del vial). Normalice los resultados del paciente incorporando los niveles de creatinina, por ejemplo divida el resultado de 11dhTxB₂ (en pg/mL) entre el resultado de creatinina de la muestra de paciente (en mg/dL) y multiplique por 100. El resultado del paciente puede transmitirse en el informe como creatinina pg 11dhTxB₂/mg. Asegúrese de que se han logrado todos los parámetros de control de calidad (véase Control de calidad) antes de informar de los resultados de la prueba.

A continuación se muestra un ejemplo de la curva de referencia de 11dhTxB₂. Esta curva de referencia se muestra solamente como ilustración. El usuario debe generar una curva de referencia para cada ensayo realizado.

Curva de referencia (No utilizarla – es sólo un ejemplo)



Cálculos de resultados

Calcule lo siguiente por cada concentración que se usa en la curva de referencia y por cada muestra de paciente, basado en el OD del pozo específico:

$$P = \frac{(\text{OD específico para esa concentración} - \text{OD mediano para blancos de pozo})}{(\text{OD mediano para } B_0 - \text{OD mediano para blancos de pozo})}$$

Tenga en cuenta que por cada nivel de referencia y cada muestra de paciente se espera que el valor P sea entre cero y uno, o no continúe con los cálculos. Entonces calcule:

$$Y = \text{Log}(P/(1-P)) \text{ por cada muestra de paciente y por cada nivel de referencia}$$

$$Y = \text{promedio de dos valores de pozos concretos}$$

Trazo Y versus $X = \log(x)$ por cada nivel de referencia, donde x es la concentración real para esa referencia. Los puntos debe quedar en una posición muy cerca a una línea recta. Uno puede usar log base 10 en todos los cálculos o usar log base e de forma alternativa (logaritmo natural) pero no debe mezclar los dos sistemas de log. Realice una regresión lineal y conserve el registro de los valores cuesta (a_1), intercepción (a_0), y R^2 . El último debe ser mayor de 0,95 para poder continuar.

Ahora puede continuar y evaluar los resultados del paciente, usando el valor Y calculado para cada paciente, resolviendo la ecuación para el valor X y a continuación obteniendo un valor para las muestras de paciente:

$$Y = a_1X + a_0 \quad \text{o} \quad X = (Y - a_0)/a_1$$

El valor relativo de paciente es: 10^X si utilizó log base 10
 $\exp(X)$ si usó natural log

Determine la media de los valores X duplicados.

$$Y = \text{promedio de dos valores de pozos concretos}$$

Para calcular el nivel de 11dhTx B_2 en pg/mL, multiplique los valores relativos de control y paciente por el factor de corrección de la solución de referencia (véase la etiqueta del vial).

Normalice los resultados del paciente incorporando niveles de creatinina. Divida el resultado de 11dhTx B_2 (en pg/mL) entre el resultado de creatinina de la muestra de paciente (en mg/dL) y multiplique por 100. El resultado del paciente puede transmitirse en el informe como creatinina pg 11dhTx B_2 /mg.

Ejemplo:

- Valor relativo de paciente: 1000
- Factor de corrección de la solución de referencia: 1,05
- Valor 11dhTx B_2 real del paciente: $1000 \times 1,05 = 1050$ pg/mL.
- Valor de creatinina del paciente = 150 mg/dL
- Valor final del informe: $(1050 \text{ pg/mL} / 150 \text{ mg/dL}) \times 100 = 700$ pg 11dhTx B_2 /mg creatinina
- En este ejemplo, el resultado de 700 pg 11dhTx B_2 /mg de creatinina está por debajo del punto de corte de creatinina de 1500 pg 11dhTx B_2 /mg, lo cual sugiere que se ha detectado el efecto de la aspirina.

Interpretación de los resultados

El resultado de muestra está basado en el nivel de 11-Dehydro Thromboxano B_2 medido en la muestra de orina, normalizado por la concentración de creatinina de orina en la misma muestra, y presentado en cantidades de pg/mg en los informes. La interpretación de los resultados está basada en los siguientes puntos de corte asignados:

Interpretación de resultados:

> 1500 pg/mg Unos niveles normalizados de 11-Dehydro Tromboxano B_2 indican una ausencia de efecto de la aspirina

≤ 1500 pg/mg Unos niveles normalizados de 11-Dehydro Tromboxano B_2 indican la presencia de efecto de la aspirina

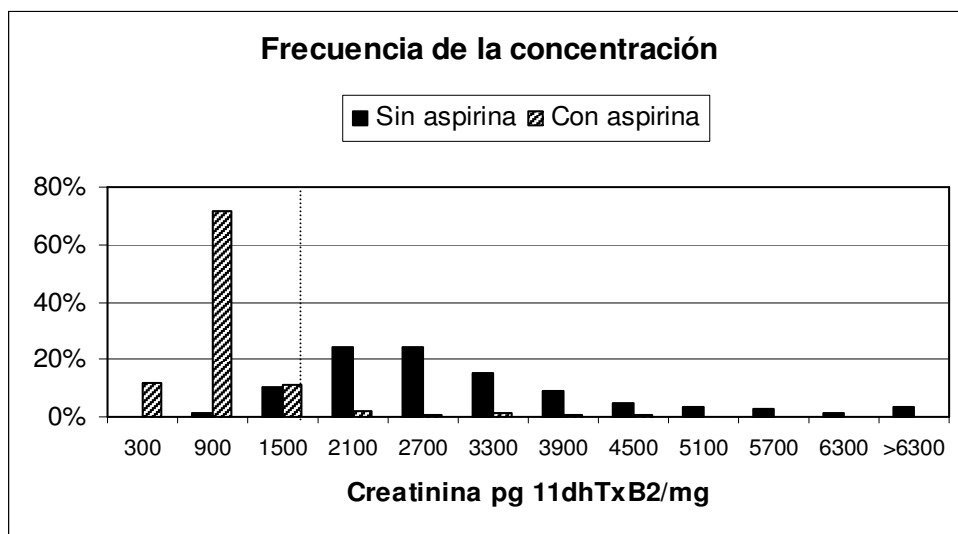
CONTROL DE CALIDAD

1. El O.D.promedio de los pozos B₀ (máxima unión) debería ser $\geq 0,600$. Las lecturas cuyo valor es menor de 0,600 pueden indicar una posible contaminación de reactivo o un lavado de placa inapropiado.
2. El O.D. promedio del blanco de ensayo (punto cero) debería ser $\leq 0,300$. Las lecturas cuyo valor es superior a 0,300 pueden indicar una posible contaminación de reactivo o un lavado de placa inapropiado.
3. Los valores de 11dhTxB₂ obtenidos para los controles deberían estar dentro de los rangos impresos en la etiqueta de cada contenedor.
4. Cada laboratorio deber determinar periódicamente su propio rango normal para la población de pacientes apropiada.
5. Las muestras con valores que están fuera del rango 300 – 4000 pg/mL se encuentra fuera del rango lineal de la curva de referencia y pueden ser sometidos a pruebas de nuevo con un diluido apropiado. Si el valor de una muestra está por debajo de 300 pg/mL, se puede someter de nuevo a pruebas la muestra usando una porción nueva con una dilución de 1:2 en el diluido de la muestra (250 μ L muestra + 250 μ L diluido de la muestra). Si un valor de muestra está por encima de 4000 pg/mL, se puede someter de nuevo a prueba la muestra usando una porción nueva con una dilución de 1:10 (50 μ L muestra + 450 μ L diluido de la muestra) o una dilución de 1:20 (25 μ L muestra + 475 μ L diluido de la muestra).
6. Los valores O.D. de los duplicados de los controles o muestras de paciente deben tener una diferencia máxima del 20% del valor O.D. promedio para muestras que estén dentro del rango 300 – 4000 pg/mL.
7. Los valores R² para la curva de referencia deberían ser $\geq 0,95$.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Valores previstos:

Las características de rendimiento del kit de pruebas AspirinWorks® fueron evaluadas en un estudio en el que participaron 166 adultos aparentemente sanos, antes y/o después de recibir dosis controladas de aspirina (201 muestras de personas que habían tomado aspirina y 204 muestras de personas que no había tomado aspirina). Se midieron y normalizaron las concentraciones de 11-Dehydro Tromboxano B₂ dividiéndolas entre la concentración de creatinina. A continuación se muestra una gráfica de la distribución de la frecuencia en las 405 muestras. Utilizando como base esas frecuencias, se estableció un punto de corte de 1500 pg 11dhTxB₂ por mg de creatinina urinaria.



Rendimiento clínico:

El rendimiento clínico de la prueba con Corgenix AspirinWorks® fue también evaluado en estas personas. Los resultados de AspirinWorks® son presentados como positivos o negativos, en función del punto de corte de 1500 pg 11-Dehydro Tromboxano B₂ por mg de creatinina urinaria. Se presenta una tabla para las dosis de aspirina de 81 mg y de 325 mg.

		Ingestión de aspirina	
		Presente	Ausente
Resultado de AspirinWorks® 81 mg	Positivo (≤1500 pg/mg de creatinina)	156	20
	Negativo (>1500 pg/mg de creatinina)	7	146
Total		163	166

Acuerdo de porcentajes generales = 91,8%

Acuerdo de porcentajes positivos = 95,7%

Acuerdo de porcentajes negativos = 88,0%

		Ingestión de aspirina	
		Presente	Ausente
Resultado de AspirinWorks® 325 mg	Positivo (≤1500 pg/mg de creatinina)	34	4
	Negativo (>1500 pg/mg de creatinina)	4	34
Total		38	38

Acuerdo de porcentajes generales = 89,5%

Acuerdo de porcentajes positivos = 89,5%

Acuerdo de porcentajes negativos = 89,5%

Comparación predicada del dispositivo

El kit de pruebas AspirinWorks® fue comparado con el ensayo sobre aspirina Accumetrics® VerifyNow™, utilizando muestras de orina de 173 adultos de apariencia sana. Los datos se presentan en la tabla que aparece a continuación.

		Resultado de VerifyNow™	
		Positivo (<550 ARU)	Negativo (≥550 ARU)
Resultado de AspirinWorks®	Positivo (≤1500 pg/mg de creatinina)	77	11
	Negativo (>1500 pg/mg de creatinina)	7	78
Total		84	89

Acuerdo de porcentajes generales = 89,6%

Acuerdo de porcentajes positivos = 91,7%

Acuerdo de porcentajes negativos = 87,6%

Rendimiento analítico:

Rango de detección:

El rango de detección para 11-Dehydro Tromboxano B₂ en el kit de pruebas AspirinWorks® es de 300 – 4000 pg/mL orina. Para obtener la mayor precisión posible, las muestras que generan valores superiores a 4000 pg/mL deberían ser sometidas de nuevo a prueba con una dilución apropiada. La concentración de analito presentada en el informe debería ser normalizada dividiendo el 11dhTxB₂ medido entre la concentración de creatinina que se midió mediante un ensayo por separado.

Precisión:

Se realizaron pruebas de tres muestras de orina en 24 pozos/placa sobre tres placas/lote, repetidas en tres lotes para un total de 216 mediciones por muestra de orina. El resultado de la prueba es definido como el promedio de dos mediciones, de modo que los resultados de diseño del estudio en 108 mediciones de prueba (12 por placa sobre tres placas/lote realizadas en tres lotes de placas) sobre los que basar los cálculos de precisión, se muestran en la tabla que aparece a continuación.

Orina nº	Concentración promedio de 11-DehydroTromboxano B₂	Repetibilidad como %CV	Precisión en el laboratorio como %CV
1	424 pg/mL	8%	14%
2	1399 pg/mL	5%	7%
3	3380 pg/mL	5%	10%

Interferencia:

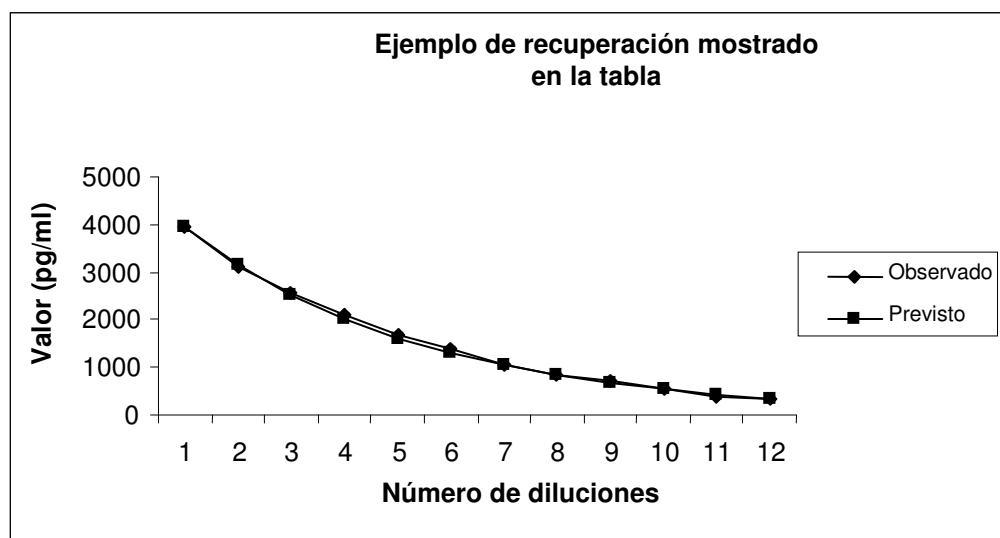
Se sometieron a prueba las muestras para averiguar la posible interferencia. Los materiales siguientes no tuvieron efecto significativo en la concentración medida de 11-Dehydro Tromboxano B₂:

Compuesto	Concentración
Acetaminofen	200 mg/dL
Ácido acetilsalicílico	200 mg/dL
Ácido ascórbico	200 mg/dL
Cafeína	200 mg/dL
Ácido gentísico	200 mg/dL
Glucosa	2000 mg/dL
Hemoglobina	1000 mg/dL
Proteína	2000 mg/dL
Ácido salicílico	200 mg/dL

Recuperación:

Diversas muestras que contenían un alto valor de 11dhTxB₂ fueron diluidas en el rango del ensayo. Luego las muestras fueron seriamente diluidas en una proporción de 1:1,25, en diluido de muestra, hasta tener un panel final de 11 – 12 diluciones en serie que abarcaban el abanico completo del ensayo, y ejecutadas con el kit de pruebas AspirinWorks®. Las concentraciones previstas de cada dilución fueron calculadas utilizando como base el valor obtenido para la mejor dilución de cada muestra. Se compararon los valores observados con los valores previstos y se calculó una relación de valores observados/previstos en forma de porcentaje. La tabla y gráfica que aparecen a continuación presentan los resultados de la prueba con una muestra de orina como la mencionada. Otras muestras de orina que fueron sometidas a prueba mostraron resultados similares.

Dilución nº	Observado (pg/mL)	Previsto (pg/mL)	Obs/Prev (%)
1	3939	3939	100%
2	3095	3151	98%
3	2573	2521	102%
4	2082	2017	103%
5	1683	1613	104%
6	1391	1291	108%
7	1068	1033	103%
8	835	826	101%
9	694	661	105%
10	538	529	102%
11	399	423	94%
12	342	338	101%



Límite de detección:

Utilizando como base las 216 determinaciones realizadas en CSLI Document EP17-A (72 determinaciones en blanco y 144 determinaciones positivas), el límite de detección para 11dhTx_{B2} es de 222 pg/mL, con un 95% de probabilidad de obtener una respuesta positiva en este nivel y un 95% de probabilidad de obtener una respuesta negativa en las muestra en blanco. Se utilizó un límite para blancos de 151 pg/mL.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

Los niveles de 11-Dehydro Tromboxano B₂ obtenidos con este ensayo pueden ser utilizados para evaluar la presencia del efecto de aspirina en personas. Cada médico debe interpretar estos resultados en relación con el historial del paciente, su estilo de vida y otros factores de riesgo. Es necesario tener en cuenta la medicación de la persona y los suplementos nutricionales o dietéticos al determinar si el paciente demuestra tener un efecto de aspirina, ya que agentes tales como el alcohol, los extractos de té verde, el chocolate, los ácidos grasos omega-3, el ibuprofen y los inhibidores COX-2 pueden provocar un efecto similar al de la aspirina y reducir la cantidad de producción de tromboxano en determinadas personas.

Las muestras que tienen excesivo sedimento, sangre u otros materiales insolubles, no han sido evaluadas y deberían ser evitadas para realizar este ensayo.

No se han estudiado con el kit de pruebas AspirinWorks® muestras de personas que estén tomando anticoagulantes orales, inhibidores de glucoproteína IIb/IIIa, clopidrogel o heparina.

No se recomienda someter a prueba a personas que sufran de infecciones del tracto urinario, enfermedad grave del hígado o enfermedad renal de fase terminal.

Garantía

Este producto está garantizado para funcionar como se describe en el encarte del producto. Corgenix, Inc. niega que exista cualquier garantía implícita o de comerciabilidad o de idoneidad para un uso particular, y en ningún caso Corgenix, Inc. será responsable de daños consecuentes.

Para contactar con el departamento técnico o de servicio al cliente en Estados Unidos, llame al teléfono 1-800-729-5661. Fuera de Estados Unidos, llame al teléfono (303) 457-4345, número de fax (303) 457-4519, o póngase en contacto con un distribuidor de Corgenix autorizado.

AspirinWorks® es una marca registrada de Creative Clinical Concepts, Inc.

Parte del material o todo el tema contenido en el encarte del paquete AspirinWorks® está protegido por una solicitud de patente actualmente en curso.

Kit di analisi AspirinWorks® (11-deidro trombossano B₂)

Per uso diagnostico in vitro

IMPIEGO PREVISTO

Il kit di analisi AspirinWorks® è un immunodosaggio a legame enzimatico (ELISA) per determinare i livelli di 11-deidro trombossano B₂ (11dhTxB₂) nell'urina umana, che favorisce il rilevamento dell'effetto dell'aspirina dopo l'ingestione.

COMPENDIO E SPIEGAZIONE DEL DOSAGGIO

Le piastrine attivate e aggregate giocano un ruolo chiave nella patogenesi della patologia cardiovascolare. Le piastrine attivate producono Trombossano A₂ (TxA₂), un potente vasocostrittore e induttore di aggregazione piastrinica.¹⁻² TxA₂ è generato da trombossano sintasi da molecole derivate da acido arachidonico per cicloossigenasi-1 (COX-1).^{1,3} TxA₂ ha una breve emivita nel plasma ed è rapidamente idrolizzato in Trombossano B₂ (TxB₂). TxB₂, a sua volta, è metabolizzato a 11-deidro trombossano B₂ (11dhTxB₂), 11-deidro 2,3 dinor Trombossano B₂ (11dh2,3DTxB₂, una forma troncata di 11dhTxB₂), e numerosi altri metaboliti secondari di TxB₂ che sono secreti dal rene.⁴⁻⁷ In questo modo, 11dhTxB₂ è un metabolita stabile di TxA₂ e un indicatore di attività piastrinica.

Una parte importante della terapia antiplastrinica nella patologia cardiovascolare è l'aspirina (acido acetilsalicilico), che è nota da molti anni per la sua attività antiplastrinica.⁸ L'aspirina agisce acetilando e inibendo in maniera irreversibile COX-1, inibendo in questo modo la produzione di TxA₂ e dei suoi metaboliti.⁹⁻¹¹ L'aspirina a basso dosaggio blocca oltre il 95% dell'attività piastrinica di COX-1¹²⁻¹³ e riduce gli eventi cardiovascolari fino al 25% nei pazienti con patologia vascolare arteriosa.¹⁴ Tuttavia, la risposta dell'aspirina varia tra i soggetti. È stato stimato che il 10-20% dei soggetti che fanno uso di aspirina abbiano eventi trombotici ricorrenti.¹² Questo fenomeno è stato indicato come resistenza all'aspirina¹⁵⁻¹⁶ e il 5-57% dei soggetti che fanno uso di aspirina potrebbero presentare una risposta insoddisfacente ai dosaggi tipici, a seconda della tecnica di misurazione utilizzata e della popolazione analizzata.¹⁷⁻²¹

Esistono numerosi metodi a base ematica che determinano la risposta individuale alla terapia quotidiana con aspirina misurando l'attivazione piastrinica *ex vivo*.^{15,22} Questi metodi, tuttavia, sono influenzati da fattori non correlati all'effetto specifico dell'aspirina sul percorso della cicloossigenasi comprendente il fattore di von Willebrand (vWF), il fattore VIII e i livelli di ematocrito, nonché altre variabili interessate nella venipuntura. In alternativa, la misurazione dei metaboliti stabili di TxA₂, ad esempio 11dhTxB₂ urinario, è un mezzo per quantificare la produzione di TxA₂ *in vivo* e quindi un modo diretto per analizzare l'effetto dell'aspirina dopo l'ingestione.^{7,23-25} L'analisi AspirinWorks® può determinare se il dosaggio di aspirina ingerito da un soggetto stia inibendo l'attività piastrinica della cicloossigenasi tramite la misurazione di 11dhTxB₂.

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il kit di analisi AspirinWorks® misura il 11dhTxB₂ urinario ed è eseguito da un ELISA competitivo. I campioni diluiti (soluzione di riferimento, controlli e urina del paziente), 11dhTxB₂ purificato coniugato a fosfatasi alcalina (AP) e anticorpo monoclonale murino purificato diretto a 11dhTxB₂, sono combinati e incubati in micropozzetti rivestiti con un anticorpo policlonale antimurino. L'incubazione consente al 11dhTxB₂ endogeno presente nei campioni di competere con 11dhTxB₂ coniugato con AP purificato per il legame all'anticorpo monoclonale murino anti-11dhTxB₂. L'anticorpo monoclonale quindi si lega all'anticorpo policlonale antimurino rivestito sulla piastra per microtitolazione. Il complesso formato sulla piastra è composto da anticorpo monoclonale e 11dhTxB₂ endogeno o coniugato AP. Dopo la rimozione dei complessi non legati tramite lavaggio, il coniugato AP-11dhTxB₂ legato è dosato dall'aggiunta di substrato cromogeno para-nitrofenilfosfato (pNPP). Il colore si sviluppa nei pozzetti ad un'intensità inversamente proporzionale alla concentrazione di 11dhTxB₂ nell'urina del campione ed è letto a 405 nm. I risultati (pg/ml) vengono calcolati in base ad una curva di riferimento creata mediante la soluzione di riferimento fornita nel kit.

I risultati finali sono riferiti come pg 11dhTxB₂ per mg di creatinina per normalizzare i risultati per la concentrazione di urina.

REAGENTI

Conservare a 2–8 °C. Non congelare.

Ciascun kit di analisi AspirinWorks® contiene i seguenti reagenti

(i volumi possono variare a seconda della misura e della configurazione del kit):

- 12 strisce da 8 micropozzetti (con telaio) rivestite con anticorpi caprini stabilizzati.
- 60 ml di diluente per campione* (flacone con tappo verde).
- 1,75 ml di soluzione di riferimento da 5000 pg/ml* (11dhTxB₂ in soluzione tampone), per la preparazione della curva di riferimento; fare riferimento all'etichetta della fiala per il fattore di correlazione specifico del lotto.
- 1 fiala di controllo di livello 1 liofilizzato (urina umana) da ricostituire a 0,5 ml con acqua purificata; vedere l'etichetta della fiala per il range atteso.
- 1 fiala di controllo di livello 2 liofilizzato (urina umana) da ricostituire a 0,5 ml con acqua purificata; vedere l'etichetta della fiala per il range atteso.
- 1 fiala di controllo di livello 3 liofilizzato (urina umana) da ricostituire a 0,5 ml con acqua purificata; vedere l'etichetta della fiala per il range atteso.
- 10 ml di soluzione di tracciante AP, soluzione rossa (11dhTxB₂ purificato coniugato a fosfatasi alcalina).
- 10 ml di soluzione anticorpale (murina), soluzione blu (anticorpo purificato anti-11dhTxB₂).
- 23 ml di substrato pNPP monocomponente (para-nitrofenilfosfato, stabilizzato); pronto per l'uso.
- 15 ml di soluzione di arresto (0,1 M EDTA); pronto per l'uso (tappo rosso).
- 2 x 50 ml di concentrato di lavaggio TBS/Tween 20 (20X).
- 2 coperchi sigillanti adesivi.

* ATTENZIONE - Contiene sodio azide

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico in vitro

1. Il materiale di origine umana utilizzato per preparare i controlli inclusi in questo kit vanno maneggiati come materiale potenzialmente infettivo. Usare le normali precauzioni per la manipolazione.
2. Non pipettare con la bocca.
3. Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui si maneggiano i campioni o i reagenti del kit.
4. Indossare guanti monouso quando si maneggiano i reagenti del kit e lavarsi bene le mani subito dopo.
5. Il substrato pNPP può essere irritante per gli occhi. L'assorbimento attraverso la cute è possibile. Usare i guanti quando si maneggia il substrato e lavarsi bene le mani subito dopo.
6. Alcuni componenti di questo prodotto contengono sodio azide come conservante (diluente per campioni e soluzione di riferimento). È noto che la sodio azide, a contatto con rame o piombo, può dare luogo alla formazione di azidi metalliche. Tali azidi metalliche sono esplosive. Tutte le soluzioni a base di azide devono essere eliminate con abbondanti quantità di acqua per evitare l'accumulo di azidi metalliche esplosive nelle tubature.
7. Alcuni componenti sono etichettati come segue.

Irritante per gli occhi (R 36). Irritante per la cute (R 38). Evitare il contatto con la cute (S 24). Evitare il contatto con gli occhi (S 25). In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e richiedere l'intervento di un medico (S 26). Usare indumenti protettivi adatti (S36). In caso di ingestione, richiedere l'immediato intervento di un medico e mostrare il contenitore o l'etichetta (S 46).

Irritante . Rischio biologico .

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

L'urina umana è la matrice del campione consigliata. I campioni vanno prelevati e analizzati entro quattro ore. Se l'analisi non è eseguita immediatamente, i campioni vanno conservati a 2-8 °C. Se i campioni devono essere conservati per oltre 24 ore, vanno congelati a ≤ -20 °C. I campioni freschi o scongelati vanno centrifugati a 1000xg per 15 minuti prima di eseguire l'analisi. Ciascun campione va analizzato per la creatinina e 11dhTxB₂ per garantire risultati accurati.

ISTRUZIONI PER L'USO

Materiali forniti

Kit di analisi AspirinWorks®; per un elenco completo, vedere "Reagenti".

Materiali necessari, ma non forniti:

- Acqua distillata per la preparazione di componenti liofilizzati e soluzione di lavaggio TBS/Tween 20
- Cilindri graduati
- Pipette di precisione capaci di misurare tra 50 µl e 1000 µl, con puntali appropriati
- Vetreria assortita adatta a piccoli volumi di liquidi
- Beuta o flacone, 1 litro
- Flaconi per lavaggio, preferibilmente con punta parzialmente tagliata per allargare il getto, o un sistema di lavaggio automatico o semiautomatico
- Guanti monouso
- Spettrofotometro per piastra in grado di leggere l'assorbanza tra 405 e 420 nm
- Pipette multicanale per la dispensazione simultanea in 8 pozzetti
- Agitatore rotante in grado di raggiungere 300 - 600 giri/min (velocità di 300-600 giri/min sono accettabili, tuttavia si consiglia 600 giri/min)

Note procedurali

1. Ottenere valori di creatinina urinaria per ciascun campione del paziente.
2. Portare i campioni di urina e i reagenti del kit a temperatura ambiente (18-26 °C) e mescolarli bene prima dell'uso; evitare la formazione di schiuma. Riporre al più presto in frigorifero tutti i reagenti non utilizzati. I controlli restanti possono essere dispensati in aliquote monouso e congelati a -20 °C o temperature inferiori per l'utilizzo successivo.
3. I campioni congelati vanno scongelati e centrifugati a 1000xg prima dell'analisi.
4. Tutte le diluizioni della soluzione di riferimento, dei controlli e dei campioni devono essere eseguite solo immediatamente prima del dosaggio.
5. Il lettore di piastre va azzerato contro l'aria.
6. Una buona tecnica di lavaggio è molto importante per la riuscita ottimale del dosaggio. Per un lavaggio adeguato, dirigere nel fondo dei micropozzetti un getto forte di soluzione di lavaggio erogato da un flacone di plastica morbida con punta larga. È anche possibile utilizzare un sistema di lavaggio automatico delle piastre per microtitolazione.
IMPORTANTE: Eventuali residui di TBS/Tween 20 possono causare uno sviluppo inadeguato della colorazione della soluzione di substrato.
7. Se possibile, utilizzare una pipetta multicanale in grado di effettuare la dispensazione simultanea in 8 pozzetti. Ciò aumenta la rapidità dell'analisi e fornisce tempi di incubazione e di reazione uniformi per tutti i pozzetti.
8. Aggiungere con cura i reagenti al lato dei micropozzetti per evitare la contaminazione dei puntali per pipette da pozzetto a pozzetto, oppure cambiare puntali con ciascuna fila di aggiunta del reagente.
9. Il preciso controllo dei tempi in tutte le fasi dell'analisi è essenziale. Tutte le diluizioni della soluzione di riferimento, i controlli e i campioni devono essere quanto più rapidamente e uniformemente possibile.
10. Per tutte le incubazioni, il periodo di incubazione comincia al termine dell'aggiunta dei reagenti o dei campioni.
11. L'aggiunta di tutti i campioni e reagenti va eseguita alla stessa velocità e nella stessa sequenza con i campioni, i controlli e le diluizioni della soluzione di riferimento aggiunti per primi, seguiti da tracciante. L'anticorpo monoclonale deve essere aggiunto per ultimo.
12. Se l'incubazione avviene ad una temperatura diversa dalla normale temperatura ambiente (18-26 °C) si potrebbero ottenere risultati inesatti.
13. Quando si aprono le fiale originali e si prelevano le aliquote, evitare la contaminazione dei reagenti.
14. Non utilizzare i componenti del kit oltre la loro data di scadenza.
15. Non miscelare componenti di kit appartenenti a lotti differenti.

Preparazione dei reagenti

Soluzione di lavaggio (TBS/Tween 20): Dosare 50 ml di soluzione di lavaggio concentrata (20X TBS/Tween 20) e aggiungere acqua distillata quanto basta per ottenere 1 litro. Conservare la soluzione di PBS/Tween 20 inutilizzata in frigorifero a 2-8 °C. Eliminare la soluzione se presenta segni di contaminazione microbica.

Controlli urinari: Ricostituire i controlli urinari (livelli 1, 2 e 3) con 0,5 ml di acqua distillata. Agitare delicatamente e lasciare trascorrere 10 minuti per la ricostituzione. Le parti non utilizzate possono essere dispensate in aliquote monouso e congelate a -20 °C o temperature inferiori per un periodo massimo di un anno.

Procedura di analisi

1. Staccare dal telaio le strisce di micropozzetti da non utilizzare. Riporle nella confezione risigillabile in alluminio contenente una sostanza igroscopica.
2. Preparare la curva di riferimento. Etichettare sei provette come n. 1-6. Aggiungere 500 µl di AspirinWorks® 5000 pg/ml di soluzione di riferimento alla provetta n. 1. Aggiungere 250 µl di diluente per campioni alle provette n. 2-6. Rimuovere 250 µl dalla provetta n. 1, trasferire alla provetta n. 2 e miscelare bene. Ripetere questa serie di diluizione seriale 1:2 fino alla provetta n. 6. Gli standard preparati risultanti sono 5000, 2500, 1250, 625, 312,5 e 156,25 pg/ml.
3. Preparare una diluizione 1:5 dei controlli e dei campioni con il diluente per campione; ad esempio, 100 µl di campione aggiunti a 400 µl di diluente per campione equivalgono a una diluizione del campione 1:5.
4. Si consiglia di eseguire determinazioni dei pozzetti in duplicato per quanto riguarda la soluzione di riferimento, i campioni dei pazienti e i controlli. Miscelare bene tutte le diluizioni di campioni e aggiungere 100 µl delle diluizioni (6 diluizioni della soluzione di riferimento, campioni e controlli) ai micropozzetti appropriati.
5. Va analizzato un campione di legame massimo (B₀) (B₀ contiene anticorpo e tracciante, ma nessun analita in competizione). Aggiungere 100 µl di diluente per campioni ai pozzetti duplicati designati per B₀.
6. Va anche eseguito un bianco del dosaggio. Lasciare vuoti i pozzetti duplicati di bianco del dosaggio.
7. Aggiungere 50 µl di soluzione di tracciante AP (rosso) a ciascuno dei 6 pozzetti della soluzione di riferimento, ai pozzetti di controllo e ai pozzetti di B₀. Lasciare vuoti i pozzetti di bianco del dosaggio.
8. Aggiungere 50 µl di soluzione di anticorpo (blu) a ciascuno dei 6 pozzetti della soluzione di riferimento, ai pozzetti di controllo e ai pozzetti di B₀. Lasciare vuoti i pozzetti di bianco del dosaggio.

I micropozzetti dovranno contenere i seguenti volumi di reagente:

<u>Curva di riferimento</u>	<u>Soluzione di tracciante AP</u>	<u>Soluzione di anticorpo</u>
100 µl a 5000 pg/ml	50 µl	50 µl
100 µl a 2500 pg/ml	50 µl	50 µl
100 µl a 1250 pg/ml	50 µl	50 µl
100 µl a 625 pg/ml	50 µl	50 µl
100 µl a 312,5 pg/ml	50 µl	50 µl
100 µl a 156,25 pg/ml	50 µl	50 µl
100 µl di diluente per campioni (B ₀)	50 µl	50 µl
<u>Campioni/controlli</u>	<u>Soluzione di tracciante AP</u>	<u>Soluzione di anticorpo</u>
100 µl	50 µl	50 µl

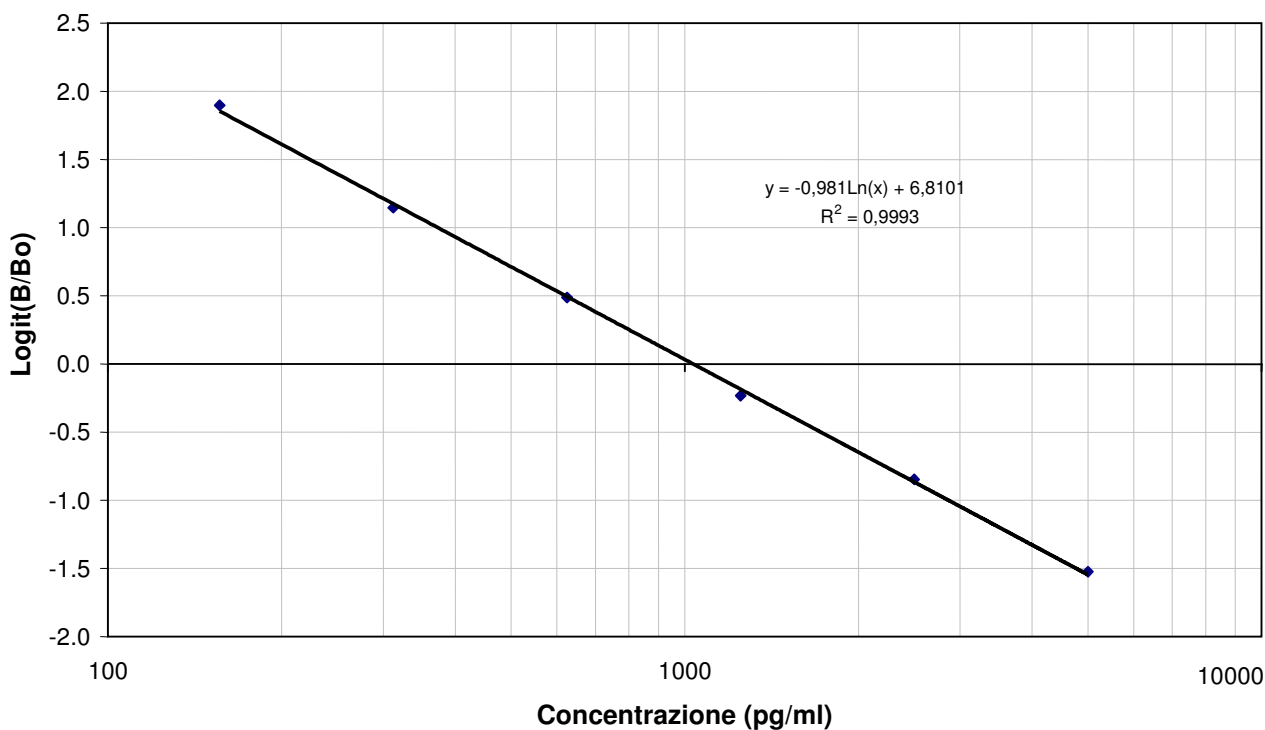
9. Coprire la piastra con la piastra sigillatrice adesiva fornita e incubare per 2 ore a temperatura ambiente (18-26 °C) su un agitatore rotante a 300-600 giri/min. Al termine dell'incubazione, afferrare saldamente la struttura delle micropiastre nella parte superiore e inferiore per trattenere i moduli dei micropozzetti e capovolgere con cautela i micropozzetti per eliminare il liquido dei campioni. Evitare la contaminazione degli altri micropozzetti con i campioni.
10. Lavare 5 volte con soluzione di lavaggio a temperatura ambiente. In ciascuna fase del lavaggio In ciascuna fase del lavaggio, tutti i pozzetti vanno riempiti completamente con la soluzione di TBS/Tween 20. Capovolgere i micropozzetti tra un lavaggio e l'altro per eliminare il liquido. Con un movimento a scatto del polso, scuotere i pozzetti provocando la fuoriuscita del liquido. Asciugare il liquido residuo picchiettando su carta assorbente. Evitare che i pozzetti si asciughino tra le varie fasi.
11. Aggiungere 200 µl di substrato pNPP a ciascun pozzetto inclusi B₀ e pozzetti bianchi dei dosaggi, coprire con una piastra sigillatrice adesiva fresca e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente con agitazione rotante. Aggiungere il substrato ai pozzetti a velocità costante. Nei pozzetti si svilupperà un colore giallo inversamente proporzionale alla quantità di 11dhTxB₂ presente.
12. Aggiungere 100 µl di soluzione di arresto in ciascun pozzetto, incluso B₀ e pozzetti di bianco del dosaggio, per fermare la reazione enzimatica. Fare attenzione ad aggiungere la soluzione di arresto ai pozzetti nello stesso ordine ed alla stessa velocità in cui si è precedentemente aggiunto il substrato.
13. Azzerare il lettore di piastre contro l'aria. Leggere la densità ottica di ciascun pozzetto tra 405 e 420 nm. I valori di densità ottica devono essere misurati entro 1 ora dall'aggiunta della soluzione di arresto.

Risultati

I risultati dei dosaggi vanno calcolati tramite analisi log-logit con una linea di "best fit" tracciata attraverso i punti di riferimento, oppure con altra analisi convalidata della curva. Interpolare i valori relativi del controllo e del campione dalla curva di riferimento e moltiplicarli per il fattore di correzione della soluzione di riferimento (vedere l'etichetta della fiala). Normalizzare i risultati del paziente incorporando i livelli di creatinina, cioè dividere il risultato di 11dhTx B_2 (in pg/ml) per il risultato della creatinina per il campione del paziente (in mg/dl) e moltiplicare per 100. Il risultato del paziente può essere riferito come pg 11dhTx B_2 /mg di creatinina. Assicurarsi che tutti i parametri di controllo di qualità siano stati osservati (vedere la sezione Controllo di qualità) prima di refertare i risultati delle analisi.

Un esempio di curva di riferimento 11dhTx B_2 è mostrato nel seguito. Questa curva di riferimento è fornita unicamente a scopo illustrativo. L'operatore deve generare una curva di riferimento per ciascun dosaggio eseguito.

Curva di riferimento (solo esempio – non utilizzare)



Calcoli dei risultati

Calcolare quanto segue per ciascuna concentrazione utilizzata nella curva di riferimento e per ciascun campione di paziente, in base alla densità ottica del singolo pozzetto:

$$P = \frac{\text{(singola densità ottica per tale concentrazione – densità ottica media per pozzetti di bianco)}}{\text{(densità ottica media per } B_0 \text{ – densità ottica media per pozzetti di bianco)}}$$

Notare che per ciascun livello di riferimento e per ciascun campione di paziente si prevede che P sia compreso tra zero e uno, altrimenti non procedere con i calcoli. Quindi calcolare:

$$Y = \text{Log}(P/(1-P)) \text{ per ciascun campione di paziente e per ciascun livello di riferimento}$$

Y = media da due singoli valori di pozzetti

Rappresentare Y in funzione di $X = \log(x)$ per ciascun livello di riferimento dove x è la concentrazione effettiva per tale riferimento. I punti dovranno ricadere molto vicini ad una linea retta. È possibile utilizzare sempre log base 10 o in alternativa log base e (logaritmo naturale), ma i due sistemi logaritmici non vanno mescolati. Eseguire una regressione lineare e tenere traccia della pendenza (a_1), dell'intercetta (a_0) e del valore di R^2 . Quest'ultimo dovrà essere maggiore di 0,95 per poter procedere.

Ora è possibile procedere a valutare i risultati del paziente utilizzando il valore di Y calcolato per ciascun paziente, risolvendo per X e quindi ottenendo un valore per i campioni di paziente:

$$Y = a_1 X + a_0 \quad \text{o} \quad X = (Y - a_0) / a_1$$

Il valore relativo al paziente è: 10^X se si è utilizzato il log base 10
 $\exp(X)$ se si è utilizzato il log naturale

Determinare il valore medio dei valori duplicati di X.

X = media da due singoli valori di pozzetti

Per calcolare il livello di 11dhTx B_2 in pg/ml, moltiplicare i valori relativi del controllo e del paziente per il fattore di correzione per la soluzione di riferimento (vedere l'etichetta della fiala).

Normalizzare i risultati del paziente incorporando i livelli di creatinina. Dividere il risultato di 11dhTx B_2 (in pg/ml) per il risultato della creatinina per il campione del paziente (in mg/dl) e moltiplicare per 100. Il risultato del paziente può essere riferito come pg 11dhTx B_2 /mg di creatinina.

Esempio:

- Valore relativo al paziente: 1000
- Fattore di correzione della soluzione di riferimento: 1,05
- Valore effettivo di 11dhTx B_2 del paziente: $1000 \times 1,05 = 1050$ pg/ml.
- Valore di creatinina del paziente = 150 mg/dl
- Valore riferito finale: $(1050 \text{ pg/ml} / 150 \text{ mg/dl}) \times 100 = 700$ pg 11dhTx B_2 /mg di creatinina
- In questo esempio, il risultato di 700 pg 11dhTx B_2 /mg di creatinina è inferiore al punto di cutoff di 1500 pg 11dhTx B_2 /mg di creatinina, il che suggerisce il rilevamento dell'effetto dell'aspirina.

Interpretazione dei risultati

Il risultato del campione si basa sul livello di 11-deidro trombossano B_2 misurato nel campione di urina, normalizzato per la concentrazione di creatinina nell'urina nello stesso campione e riferito in quantità di pg/mg. L'interpretazione dei risultati si basa sui seguenti cutoff assegnati:

Interpretazione dei risultati:

> 1500 pg/mg Livelli normalizzati di 11-deidro trombossano B_2 indicano una mancanza di effetto aspirina

≤ 1500 pg/mg Livelli normalizzati di 11-deidro trombossano B_2 indicano un effetto aspirina

CONTROLLO DI QUALITÀ

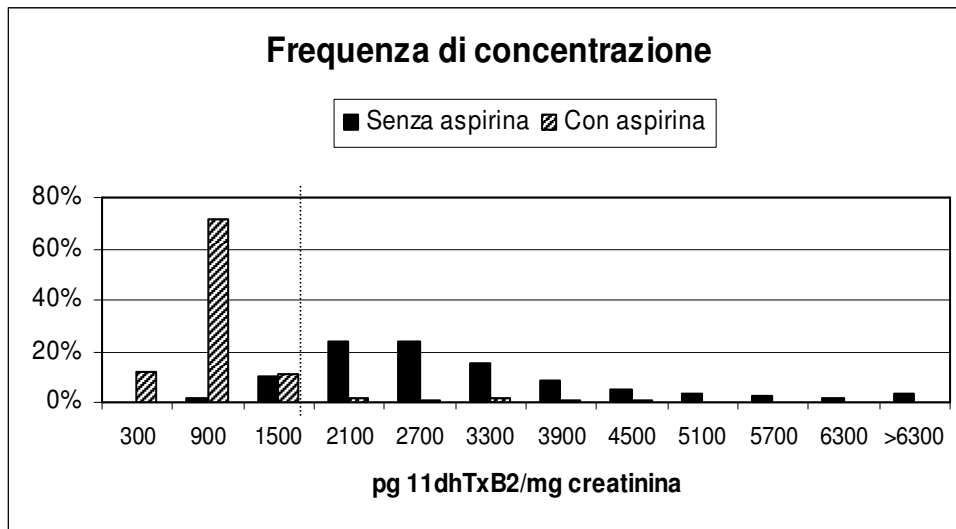
1. Il valore della densità ottica media dei pozzetti B_0 (legame massimo) dovrà essere $\geq 0,600$. Valori inferiori a 0,600 possono indicare la possibile contaminazione del reagente, oppure un insufficiente lavaggio della piastra.
2. Il valore della densità ottica media del bianco dosaggio (punto zero) deve essere $\leq 0,300$. Valori superiori a 0,300 possono indicare la possibile contaminazione del reagente, o un insufficiente lavaggio della piastra.
3. I valori di 11dhTx B_2 ottenuti per i controlli devono essere compresi nei range indicati sulle etichette dei rispettivi contenitori.
4. Ogni laboratorio deve periodicamente determinare il proprio range normale per una determinata popolazione di pazienti.

- I campioni con valori esterni all'intervallo 300 – 4000 pg/ml sono esterni al range lineare della curva di riferimento e possono essere rianalizzati ad una diluizione appropriata. Se un valore di campione è minore di 300 pg/ml, il campione può essere rianalizzato utilizzando un'aliquota fresca ad una diluizione 1:2 nel diluente campione (250 µl di campione + 250 µl di diluente campione). Se un valore di campione è maggiore di 4000 pg/ml, il campione può essere rianalizzato utilizzando un'aliquota fresca ad una diluizione 1:10 (50 µl di campione + 450 µl di diluente campione) o ad una diluizione 1:20 (25 µl di campione + 475 µl di diluente campione).
- I valori di densità ottica dei duplicati dei controlli o dei campioni prelevati dai pazienti devono rimanere entro il 20% del valore medio della densità ottica per campioni entro il range 300 – 4000 pg/ml.
- I valori di R^2 per la curva di riferimento dovranno essere $\geq 0,95$.

PRESTAZIONI METODOLOGICHE

Valori attesi:

Le caratteristiche prestazionali del kit di analisi AspirinWorks® sono state valutate in uno studio che interessava 166 adulti apparentemente sani prima e/o dopo la ricezione di dosi controllate di aspirina (201 campioni da soggetti sotto aspirina e 204 campioni da soggetti non sotto aspirina). Le concentrazioni di 11-deidro trombossano B₂ sono state misurate e normalizzate dividendo per la concentrazione di creatinina. Un grafico di distribuzione in frequenza dei 405 campioni è mostrato nel seguito. In base a queste frequenze, è stato stabilito un cutoff a 1500 pg di 11dhTxB₂ per mg di creatinina urinaria.



Prestazioni cliniche:

Le prestazioni cliniche dell'analisi Corgenix AspirinWorks® sono state valutate in questi soggetti. I risultati di AspirinWorks® sono presentati come positivi o negativi, in base ad un cutoff di 1500 pg di 11-deidro trombossano B₂ per mg di creatinina urinaria. È presentata una tabella per dosi di aspirina di 81 mg e 325 mg.

		Ingestione di aspirina	
		Presente	Assente
Risultato di AspirinWorks® 81 mg	Positivo (≤ 1500 pg/mg di creatinina)	156	20
	Negativo (> 1500 pg/mg di creatinina)	7	146
	Totale	163	166

Concordanza percentuale complessiva = 91,8%
 Concordanza percentuale positiva = 95,7%
 Concordanza percentuale negativa = 88,0%

		Ingestione di aspirina	
		Presente	Assente
Risultato di AspirinWorks® 325 mg	Positivo (≤1500 pg/mg di creatinina)	34	4
	Negativo (>1500 pg/mg di creatinina)	4	34
Totale		38	38

Concordanza percentuale complessiva = 89,5%

Concordanza percentuale positiva = 89,5%

Concordanza percentuale negativa = 89,5%

Confronto tra i dispositivi indicati

Il kit di analisi AspirinWorks® è stato confrontato col dosaggio di aspirina Accometrics® VerifyNow™ utilizzando 173 campioni di urina da adulti apparentemente sani. I dati sono presentati nella seguente tabella.

		Risultato di VerifyNow™	
		Positivo (<550 ARU)	Negativo (≥550 ARU)
Risultato di AspirinWorks®	Positivo (≤1500 pg/mg di creatinina)	77	11
	Negativo (>1500 pg/mg di creatinina)	7	78
Totale		84	89

Concordanza percentuale complessiva = 89,6%

Concordanza percentuale positiva = 91,7%

Concordanza percentuale negativa = 87,6%

Prestazioni analitiche:

Range di rilevamento:

Il range di rilevamento per 11-deidro trombossano B₂ nel kit di analisi AspirinWorks® è di 300 – 4000 pg/ml di urina. Per una maggiore accuratezza, i campioni che generano valori maggiori di 4000 pg/ml vanno rianalizzati ad una diluizione appropriata. La concentrazione di analita riferita dovrà essere normalizzata dividendo il valore misurato di 11dhTxB₂ per la concentrazione di creatinina come misurato da un dosaggio separato.

Precisione:

Tre campioni di urina sono stati analizzati su 24 pozzetti/piastre su tre piastre/lotto, ripetuti su tre lotti per un totale di 216 misurazioni per ciascun campione di urina. Un risultato dell'analisi è definito come la media di due misurazioni, quindi i risultati della progettazione dello studio in 108 misurazioni dell'analisi (12 per piastre su tre piastre/lotto analizzate su tre lotti di piastre) su cui basare i calcoli di precisione mostrati nella tabella seguente.

N. di urina	Media Concentrazione di 11-deidro trombossano B₂	Riproducibilità come %CV	Precisione in laboratorio come %CV
1	424 pg/ml	8%	14%
2	1399 pg/ml	5%	7%
3	3380 pg/ml	5%	10%

Interferenza:

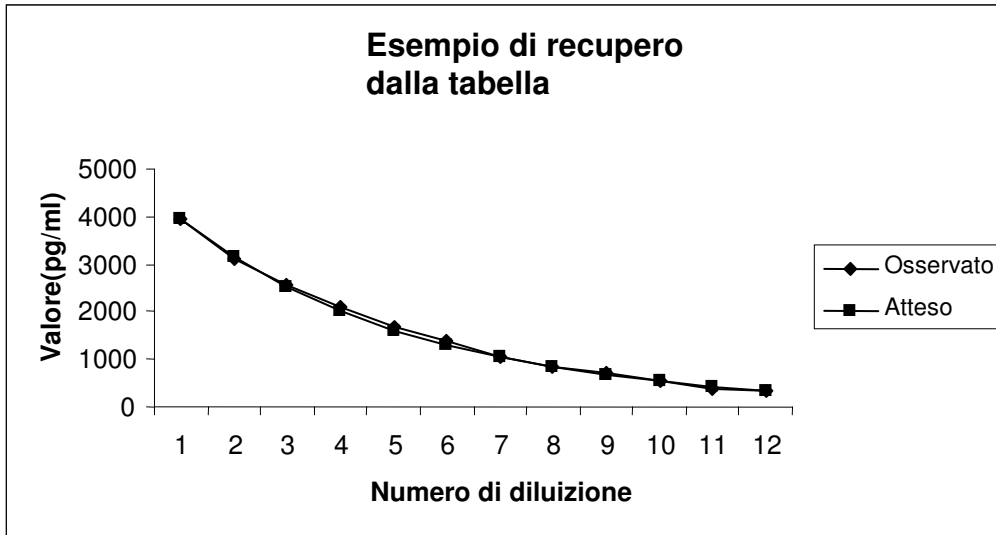
I campioni sono stati analizzati per rilevare l'interferenza potenziale. I seguenti materiali non hanno avuto alcun effetto significativo sulla concentrazione misurata di 11-deidro trombossano B₂:

Composto	Concentrazione
Acetaminofen	200 mg/dl
Acido acetilsalicilico	200 mg/dl
Acido ascorbico	200 mg/dl
Caffeina	200 mg/dl
Acido gentisinico	200 mg/dl
Glucosio	2000 mg/dl
Emoglobina	1000 mg/dl
Proteina	2000 mg/dl
Acido salicilico	200 mg/dl

Recupero:

Diversi campioni contenenti un valore elevato di 11dhTxB₂ sono stati diluiti nel range del dosaggio. I campioni sono stati quindi diluiti serialmente 1:1,25 in diluente campione per un pannello finale di 11 - 12 diluizioni seriali che coprivano il range del dosaggio e sono stati analizzati col kit di analisi AspirinWorks®. Le concentrazioni attese di ciascuna diluizione sono state calcolate in base al valore ottenuto per la diluizione massima di ciascun campione. I valori osservati sono stati confrontati con i valori attesi e un rapporto di valori osservati/attesi è stato calcolato come percentuale. La tabella e il grafico seguenti rappresentano i risultati di uno di tali test di urina. Altri campioni di urina analizzati hanno mostrato risultati simili.

N. diluizion	Osservati (pg/ml)	Attesi (pg/ml)	Oss./Att. (%)
1	3939	3939	100%
2	3095	3151	98%
3	2573	2521	102%
4	2082	2017	103%
5	1683	1613	104%
6	1391	1291	108%
7	1068	1033	103%
8	835	826	101%
9	694	661	105%
10	538	529	102%
11	399	423	94%
12	342	338	101%



Limite di rilevamento:

In base a 216 determinazioni che utilizzano il documento CSLI EP17-A (72 determinazioni del bianco e 144 determinazioni positive), il limite di rilevamento per 11dhTxB₂ è 222 pg/ml, con una probabilità del 95% di ottenere una risposta positiva a questo livello e una probabilità del 95% di ottenere una risposta negativa su campioni di bianco. È stato utilizzato un limite di bianco di 151 pg/ml.

LIMITI DEL TEST

I livelli di 11-deidro trombossano B₂ ottenuti con questo dosaggio possono essere utilizzati per valutare la presenza di un effetto aspirina nei soggetti. Ciascun medico deve interpretare questi risultati tenendo conto dell'anamnesi del paziente, del suo stile di vita e di altri fattori di rischio. È necessario prendere in considerazione i farmaci e gli integratori nutrizionali e/o dietetici di un soggetto per la determinazione del fatto che il paziente dimostri o meno un effetto aspirina, in quanto alcuni agenti quali l'alcool, l'estratto di tè verde, il cioccolato, gli acidi grassi omega-3, l'ibuprofen e gli inibitori di COX-2 possono provocare un effetto simile all'aspirina e ridurre il valore della produzione di trombossano in alcuni soggetti.

I campioni con livelli eccessivi di sedimenti, sangue o altri materiali insolubili non sono stati valutati e vanno evitati per questo dosaggio.

I campioni di soggetti sottoposti ad anticoagulanti orali, inibitori della glicoproteina IIb/IIIa, clopidogrel o eparina non sono stati studiati col test di analisi AspirinWorks®.

Non si consiglia di analizzare soggetti sofferenti per infezioni delle vie urinarie, gravi patologie epatiche o patologie renali in fase terminale.

Garanzia

Si garantisce che le prestazioni di questo prodotto corrispondano a quanto descritto nel presente foglietto illustrativo. La Corgenix, Inc. non rilascia alcuna garanzia implicita di commerciabilità o idoneità a uno scopo particolare, e in nessuna circostanza la Corgenix, Inc. si riterrà responsabile di eventuali danni indiretti.

Per il servizio di assistenza tecnica o di assistenza clienti negli Stati Uniti chiamare il numero 1-800-729-5661. Negli altri Paesi, chiamare il numero +1 (303) 457-4345, fax +1 (303) 457-4519, oppure rivolgersi ad un distributore autorizzato Corgenix.












AspirinWorks® è un marchio registrato di Creative Clinical Concepts, Inc.

Gli argomenti contenuti nel foglietto illustrativo di AspirinWorks® sono coperti, in tutto o in parte, da una richiesta di brevetto in attesa di approvazione.

REFERENCES

1. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *PNAS*. 1975;72:2994-2998.
2. Ellis EF, Oelz O, Roberts LJ, et al. Coronary arterial smooth muscle contraction by a substance released from platelets: Evidence that it is Thromboxane A₂. *Science*. 1976;193:1135-1137.
3. Smith WL. Prostanoid biosynthesis and the mechanism of action. *Am J Physiol*. 1992;263:F118-F191.
4. Lawson JA, Patrono C, Ciabattone G, et al. Long-lived enzymatic metabolites of Thromboxane B₂ in the human circulation. *Anal. Biochem*. 1986;155:198-205.
5. Uedelhoven WM, Meese CO, Weber PC. Analysis of the major urinary Thromboxane metabolites, 2,3-dinor Thromboxane B₂ and 11-Dehydro Thromboxane B₂, by gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr*. 1989;497:1-16.
6. Roberts LJ, Sweetman BJ, Oates JA. Metabolism of Thromboxane B₂ in man. *J Biol Chem*. 1981;256:8384-8393.
7. Chiabrando C, Rivoltella L, Alberti E, et al. Urinary excretion and origin of 11-Dehydro-2,3-dinor Thromboxane B₂ in man. *Prostaglandins*. 1993;45:401-411.
8. Weiss JH, Aledort LM. Impaired platelet-connective-tissue reaction in man after aspirin ingestion. *Lancet*. 1967;2:495-497.
9. Awtry EH, Loscalzo J. Aspirin. *Circulation*. 2000;101:1206-1218.
10. Roth GJ, Majerus PW. The mechanism of the effect of aspirin on human platelets, I: acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest*. 1975;56:624-632.
11. Loll PJ, Picot D, Garavito RM. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H₂ synthase. *Nat Struct Biol*. 1995;2:637-643.
12. Patrono C, Collier B, Dalen JE, et al. Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects. *Chest*. 2001;119:39S-63S.
13. Vejar M, Fragasso G, Hackett D, et al. Dissociation of platelet activation and spontaneous myocardial ischemia in unstable angina. *Thromb Haemost*. 1990;63:163-168.
14. Antiplatelet Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomized trials of antiplatelet therapy, I: prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *BMJ*. 1994;308:81-106.
15. Patrono C. Aspirin resistance: definition, mechanisms and clinical read-outs. *J Thromb Haemost*. 2003;1:1710-1713.
16. Szczeklik A, Musial J, Undas A, et al. Aspirin resistance. *J Thromb Haemost*. 2005;3:1655-1662.
17. Gum PA, Kottke-Mardchant K, Poggio ED, et al. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2001;88:230-235.
18. Tarjan J, Salamon A, Jager R, et al. [The rate of acetylsalicylic acid non-respondents among patients hospitalized for acute coronary disease, previously undergoing secondary salicylic acid prophylaxis.] *Orv Hetil*. 1999;140:2339-2343.
19. Sane DC, McKee SA, Malinin AI, et al. Frequency of aspirin resistance in patients with congestive heart failure treated with antecedent aspirin. *Am J Cardiol* 2002;90:893-895.
20. Helgason CM, Bolin KM, Hoff JA, et al. Development of aspirin resistance in persons with previous ischemic stroke. *Stroke* 1994;25:2331-2336.
21. Roller RE, Dorr A, Ulrich S, et al. Effect of aspirin treatment in patients with peripheral arterial disease monitored with the platelet function analyzer PFA-100. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002;13:277-281.
22. Sanderson S, Emery J, Baglin T et al. Narrative review: aspirin resistance and its clinical implications. *Ann Intern Med*. 2005;142:370-380.
23. Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, et al. Aspirin-resistant Thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation*. 2002;105:1650-1655.
24. Foegh ML, Zhao, Y, Madren L, et al. Urinary Thromboxane A₂ metabolites in patients presenting in the emergency room with acute chest pain. *J Internal Med*. 1994;235:153-161.
25. Catella F, Healy D, Lawson J, et al. 11-Dehydro Thromboxane B₂: a quantitative index of Thromboxane A₂ formation in the human circulation. *PNAS*. 1986; 83:5861-5865.

SYMBOL LEGEND / LÉGENDE EXPLICATIVE DES SYMBOLES / SYMBOL LEGEND / LEGENDA DEI SIMBOLI / LEYENDA DE SÍMBOLOS

										
Manufacturer	Authorized Representative	In vitro diagnostic medical device	Batch Code	Use by/ Expiry Date	Temperature Limitation	Irritant	Biological Risk	Catalog Number	European Conformity	Consult Instructions for Use/ Package Insert
Hersteller	Bevoll-mächtiger	In-vitro-Diagnostikum	Chargennummer	Verfallsdatum	Temperatur-beschränkungen	Reizend	Biologisches Risiko	Katalognummer	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Gebrauchsanweisung im Inneren der Verpackung beachten
Fabriqué par	Représentant agréé	Dispositif de diagnostic in vitro	Code de Lot	Utiliser jusqu' à/ Date de péremption	Limites de température	Irritant	Risque biologique	Numéro de catalogue	Conformité aux normes européennes	Consulter le mode d'emploi/ notice jointe au conditionnement
Fabricado por	Representante autorizado	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro	Código de Lote	Usar antes de/ Fecha de caducidad	Limitación de temperatura	Irritante	Riesgo biológico	Número de catálogo	Conformidad europea	Consultar las instrucciones de uso/ prospecto del envase
Prodotta da	Rappresentante autorizzato	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Codice del lotto	Scade il/ data di scadenza	Limite di temperatura	Irritante	Rischio biologico	Numero di catalogo	Conformità europea	Consultare le istruzioni per l'uso/ il foglietto illustrativo



MT Promedt Consulting GmbH
 Altenhofstrasse 80
 D-66386 St. Ingbert/Germany



Corgenix, Inc.
 11575 Main Street, Suite 400
 Broomfield, Colorado 80020 USA

© 2007, Corgenix, Inc.

12225 04
 Effective: 2008-06-17