

Corgenix 11dhTxB₂ Test Kit (11-Dehydro Thromboxane B₂)

For In Vitro Diagnostic Use

INTENDED USE

The 11dhTxB₂ Test Kit is an enzyme-linked immunoassay (ELISA) to determine levels of 11-Dehydro Thromboxane B₂ (11dhTxB₂) in human urine, which aids in the qualitative detection of acetylsalicylic acid (ASA) effect in apparently healthy individuals post ingestion. For professional use only.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE ASSAY

Activated and aggregated platelets play a key role in clot formation. 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 *in vivo* indicator of platelet activity.

ASA has been known for many years to have antiplatelet activity.⁸ ASA functions by acetylating and irreversibly inhibiting COX-1, thus inhibiting the production of TxA₂ and its metabolites.⁹⁻¹¹ Low dose ASA blocks more than 95% of platelet COX-1 activity.¹²⁻¹³ 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 ASA's effect post ingestion.^{7,14-16} The 11dhTxB₂ test may determine if the ASA ingested by an individual is inhibiting platelet cyclooxygenase activity through the measurement of 11dhTxB₂. ASA is available under multiple brand names and/or in several different forms including Bayer Aspirin®.*

PRINCIPLE OF THE TEST

The 11dhTxB₂ 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 11dhTxB₂ 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.

*Aspirin is a registered trademark of Bayer AG in certain countries.

- 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 11dhTx_{B2} conjugated to alkaline-phosphatase).
- 10 mL Antibody Solution (murine), blue solution (purified anti-11dhTx_{B2} 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).

Warning  Biological Risk .

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Human urine is the recommended sample matrix. Samples should be collected and a urinary preservative should be added within 24 hours if not tested immediately. Recommended preservatives include Chlorstat tablets (Bio-Medical Products Corp.), BD C&S Vacutainer tubes or BD UAP Vacutainer tubes (Becton, Dickenson and Company). If not tested immediately, samples should be stored at 2-8°C. If samples are to be stored for more than 72 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 11dhTx_{B2} for accurate results.

INSTRUCTIONS FOR USE

Materials Provided:

11dhTx_{B2} 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 11dhTxB₂ 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 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 (B₀) should be run (the B₀ contains antibody and tracer, but no competing analyte). Add 100 µL Sample Diluent to duplicate wells designated for the B₀.
6. An assay blank should also be run. Leave duplicate assay blank wells empty.
7. Add 50 µL AP-Tracer Solution (red) to each of the 6 Reference Solution wells, patient sample wells, control wells and the B₀ wells. Leave the assay blank wells empty.

8. Add 50 μL Antibody Solution (blue) to each of the 6 Reference Solution wells, patient sample wells, control wells, and B₀ 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 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>Samples/Controls</u>	<u>AP-Tracer Solution</u>	<u>Antibody Solution</u>
100 μL	50 μL	50 μL

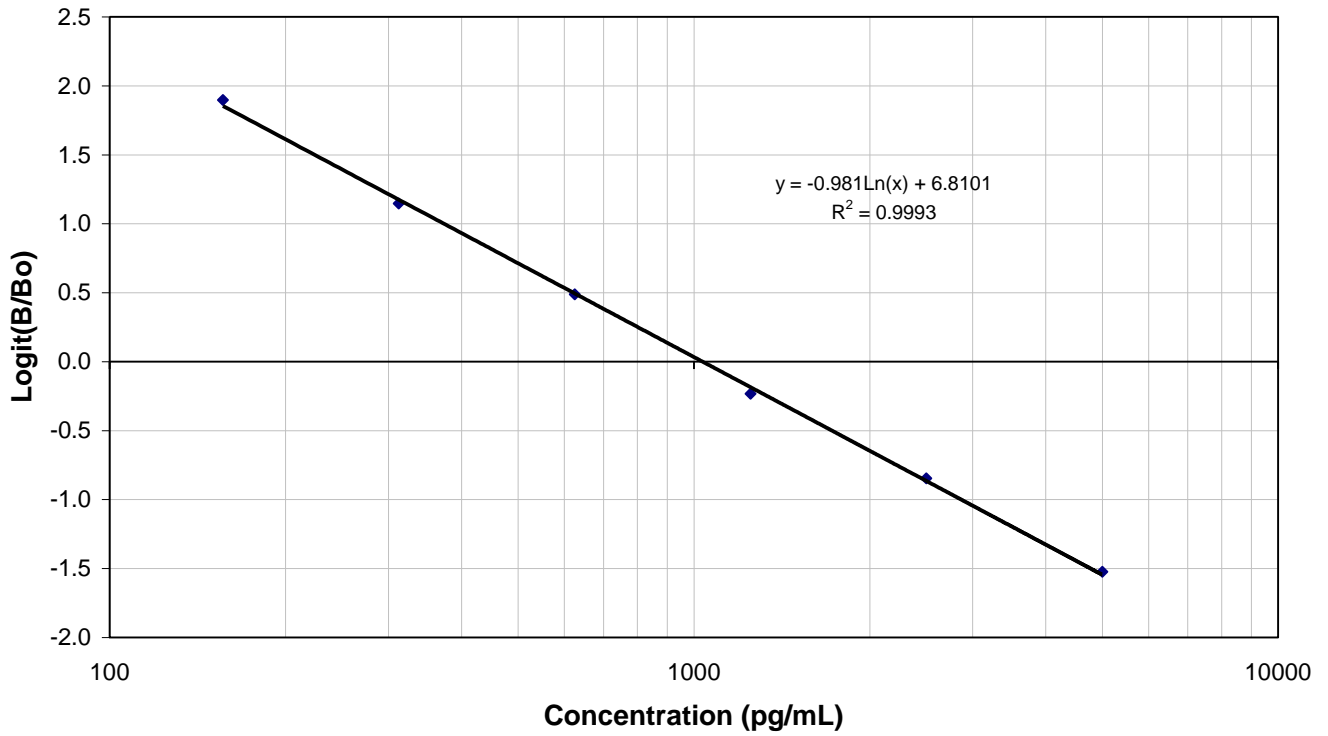
9. Cover plate with adhesive plate sealer provided and incubate 2 hours at room temperature (18-26°C) on a rotary shaker at 300-600 rpm. After the incubation is complete, grip the microplate frame firmly on the top and bottom to retain microwell modules and carefully invert the microwells to empty the 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 μL pNPP Substrate to each well including B₀ 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 11dhTxB₂ present.
12. Add 100 μL Stopping Solution to each well, including B₀ 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

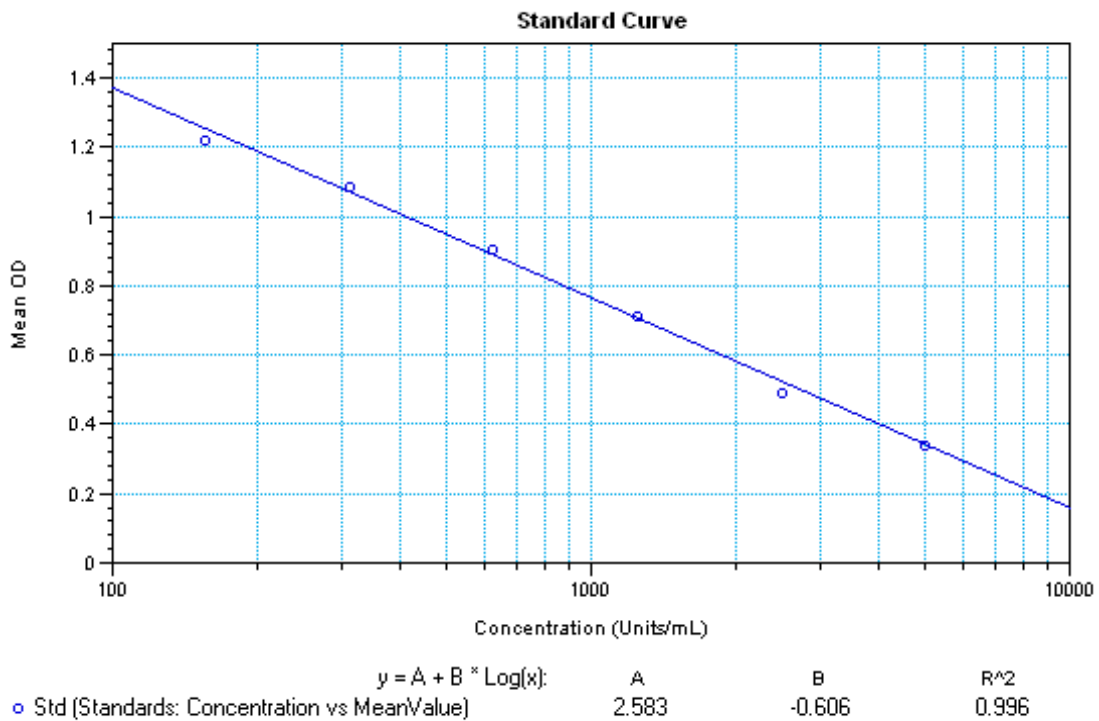
Assay results should be calculated by log-logit or semi-log analysis with linear regression (a “best fit” line) drawn through the reference points. Interpolate control and patient relative values from the reference curve, and multiply the relative values by the Correction Factor for the Reference Solution (see vial label). Normalize patient results by incorporating creatinine levels, i.e divide the 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. Ensure that all quality control parameters have been met (see Quality Control) before reporting test results.

An example of 11dhTxB₂ Reference Curves (log-logit and semi-log) are shown below. These reference curves are for the purposes of illustration only. A reference curve should be generated by the user for each assay performed.

Log-Logit Reference Curve (Example Only - do not use)



Semi-Log Reference Curve (Example Only – do not use)



Log-Logit Results Calculations

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

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

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:

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

$$Y = \text{average from two individual well values} \quad (\text{if duplicates were performed})$$

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 (if performed)

X = average from two individual well values

Semi-Log Linear Regression Results Calculations

Calculate the mean OD (blank subtracted) for the duplicates of each point of the reference curve and controls, and for patient samples (if duplicates were performed). Plot the mean OD obtained for each dilution of the reference curve (y-axis) against the corresponding value of the reference level on a log scale (x-axis). The reference curve can be plotted either automatically using a validated software program or manually using graph paper ("best fit" line). Determine control and patient sample values from the reference curve.

Patient Sample Results

To calculate the level of 11dhTx_{B2} 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 11dhTx_{B2} 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_{B2}/mg creatinine.

Example:

- Patient relative value: 1000
- Reference Solution Correction Factor: 1.05
- Actual patient 11dhTx_{B2} value: $1000 \times 1.05 = 1050$ pg/mL.
- Patient creatinine value = 150 mg/dL
- Final reported value: $(1050 \text{ pg/mL} / 150 \text{ mg/dL}) \times 100 = 700$ pg 11dhTx_{B2}/mg creatinine
- In this example, the result of 700 pg 11dhTx_{B2}/mg creatinine is below the 1500 pg 11dhTx_{B2}/mg creatinine cutoff point, suggesting that ASA 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:

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

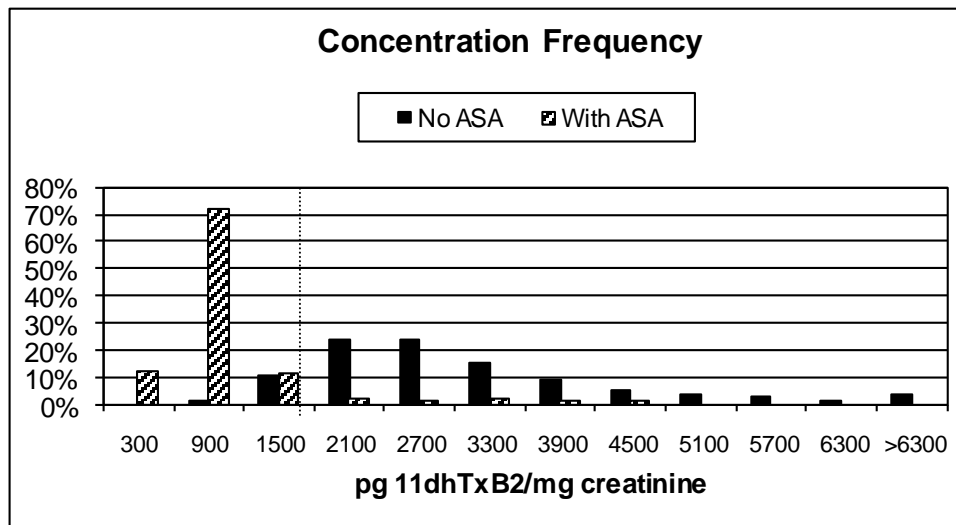
QUALITY CONTROL

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 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). Since final results are based on a 1:5 dilution, be sure to adjust the calculations accordingly (i.e. for a 1:2 dilution multiply the final result by 0.4; for a 1:10 dilution multiply by 2).
6. O.D.s for the duplicates of the controls or patient samples (if performed) 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 11dhTxB₂ Test Kit were evaluated in a study involving 166 apparently healthy adults before and/or after receiving controlled doses of ASA (201 samples from individuals on ASA and 204 samples from individuals not on ASA). 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 11dhTxB₂ test was also evaluated in these individuals. 11dhTxB₂ 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 ASA doses.

		ASA Ingestion	
		Present	Absent
11dhTxB₂ 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%

		ASA Ingestion	
		Present	Absent
11dhTxB₂ 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 11dhTxB₂ 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)
11dhTxB₂ 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 11dhTxB₂ 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:

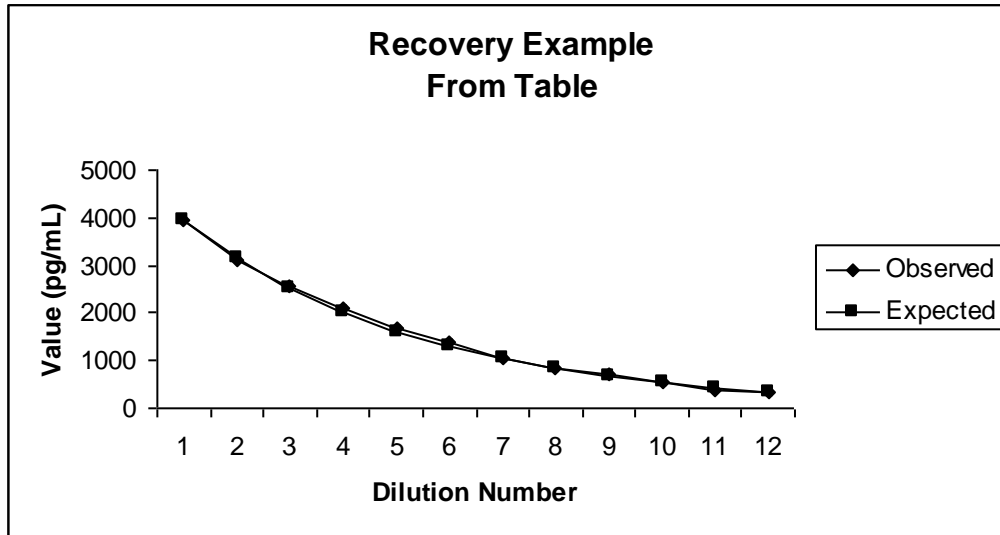
Compound	Concentration
Acetaminophen	200 mg/dL
Acetylsalicylic Acid	200 mg/dL
Ascorbic Acid	200 mg/dL
Caffeine	200 mg/dL
Gentisic Acid	200 mg/dL
Glucose	2000 mg/dL
Hemoglobin	1000 mg/dL
Protein	2000 mg/dL
Salicylic Acid	200 mg/dL

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 11dhTxB₂ 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 ASA 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 ASA effect as certain agents such as alcohol, green tea extract, chocolate, omega-3 fatty acids, ibuprofen, and COX-2 inhibitors may elicit an ASA-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 11dhTxB₂ Test Kit.

The 11dhTxB₂ Test Kit is not intended to measure the return of platelet function upon discontinuation of ASA ingestion.

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.

Some or all of the subject matter contained in the 11dhTxB₂ Package Insert is covered by a pending patent application.

11dhTxB₂ Testkit (11-Dehydro Thromboxan B₂)

In-Vitro-Diagnostikum

VERWENDUNGSZWECK

Das 11dhTxB₂-Nachweiskit ist ein auf Enzymen basierender Immuntest (*enzyme-linked immunoassay*, ELISA) zur Bestimmung des Gehalts an 11-Dehydro-Thromboxan-B₂ (11dhTxB₂) in menschlichem Urin, was zum qualitativen Nachweis der acetylsalicylsäure-Wirkung bei offensichtlich gesunden Personen nach oraler Einnahme beiträgt. Nur zur Anwendung durch Fachpersonal.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNGEN ZUR UNTERSUCHUNG

Aktiviert und aggregierte Thrombozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung. Aktiviert Thrombozyten produzieren Thromboxan A₂ (TxA₂), einen potenten Vasokonstriktor und ein Vorlaufstadium einer Thrombozyten-Aggregation.¹⁻² TxA₂ wird durch eine Thromboxan-Synthase aus Molekülen erzeugt, die aus einer arachidonischen Säure durch eine Zykllooxygenase-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 Daher ist 11dhTxB₂ ein stabiler Metabolit von TxA₂ und ein *in-vivo*-Indikator der Thrombozytenaktivität.

Es ist seit vielen Jahren bekannt, dass ASA (Acetylsalicylsäure) eine gegen Thrombozyten gerichtete Wirkung besitzt.⁸ ASA funktioniert, indem es COX-1 acetyliert und irreversibel hemmt, dadurch die Produktion von TxA₂ und seinen Metaboliten hemmt.⁹⁻¹¹ ASA in niedrigen Dosen blockiert mehr als 95 % der COX-1-Aktivität in Thrombozyten.¹²⁻¹³ Die Bestimmung stabiler Metaboliten von TxA₂, wie z. B. 11dhTxB₂ im Urin, ist eine Methode, die TxA₂-Produktion *in vivo* zu quantifizieren und somit ein direkter Weg, um den ASA-Effekt nach der Einnahme zu analysieren.^{7,14-16} Die 11dhTxB₂-Analyse kann anhand der Messung von 11dhTxB₂ zeigen, ob die von einer Person eingenommene ASA-Dosis die Zykllooxygenase-Aktivität in Thrombozyten hemmt. ASA ist unter verschiedenen Markennamen und/oder in verschiedenen Formen, einschließlich Bayer Aspirin®, erhältlich.*

DER GRUNDSATZ DER ANALYSE

Der 11dhTxB₂ 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.

Die Endergebnisse werden als pg 11dhTxB₂ pro mg Kreatinin angegeben, um die Ergebnisse auf die Urinkonzentration zu normalisieren.

REAGENZIEN

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

Jeder 11dhTxB₂ 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).

*Aspirin ist eine eingetragene Marke der Bayer AG in bestimmten Ländern.

- 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).

Waarschuwing  . Biologisches Risiko .

PROBENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Die empfohlene Probenmatrix ist menschlicher Urin. Proben müssen genommen und innerhalb von 24 Stunden mit einem Urin-Konservierungsmittel versetzt werden, wenn der Test nicht sofort erfolgt. Empfohlene Konservierungsmittel sind z. B. Chlorstat-Tabletten (Bio-Medical Products Corp.), BD C&S Vacutainer-Röhrchen oder BD UAP Vacutainer-Röhrchen (Becton, Dickenson and Company). Werden die Proben nicht sofort analysiert, sind sie bei 2 - 8 °C aufzubewahren. Sollten die Proben länger als 72 Stunden aufbewahrt werden, müssen sie bei mindestens -20 °C eingefroren werden. Frische oder aufgetaute Proben müssen vor der Analyse mit einer Geschwindigkeit von 1000 x g 15 Minuten lang zentrifugiert werden. Um präzise Ergebnisse zu erzielen, muss jede Probe auf Kreatinin und auf 11dhTxB₂ analysiert werden.

GEBRAUCHSANLEITUNG

Bereitgestellte Materialien:

11dhTxB₂ 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 50 bis 1000 Mikroliter
- Diverses Glasgeschirr zur Handhabung kleiner Volumina
- 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 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.

Urinkontrollen: Urinkontrollen (Konzentrationen 1, 2 und 3) mit 0,5 ml analysenreinem Wasser rekonstituieren. Vorsichtig umrühren und zur Rekonstitution 10 Minuten abwarten. 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 11dhTxB₂ 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-, und Kontrollproben werden Doppelbestimmungen 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 (B₀) wird durchgeführt (die B₀ enthält Antikörper und Tracer, aber keinen reaktionsfähigen Analyten). 100 µL Probeverdünnung zu den Duplikatsvertiefungen hinzufügen, die auf das B₀ 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 B₀-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 B₀-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

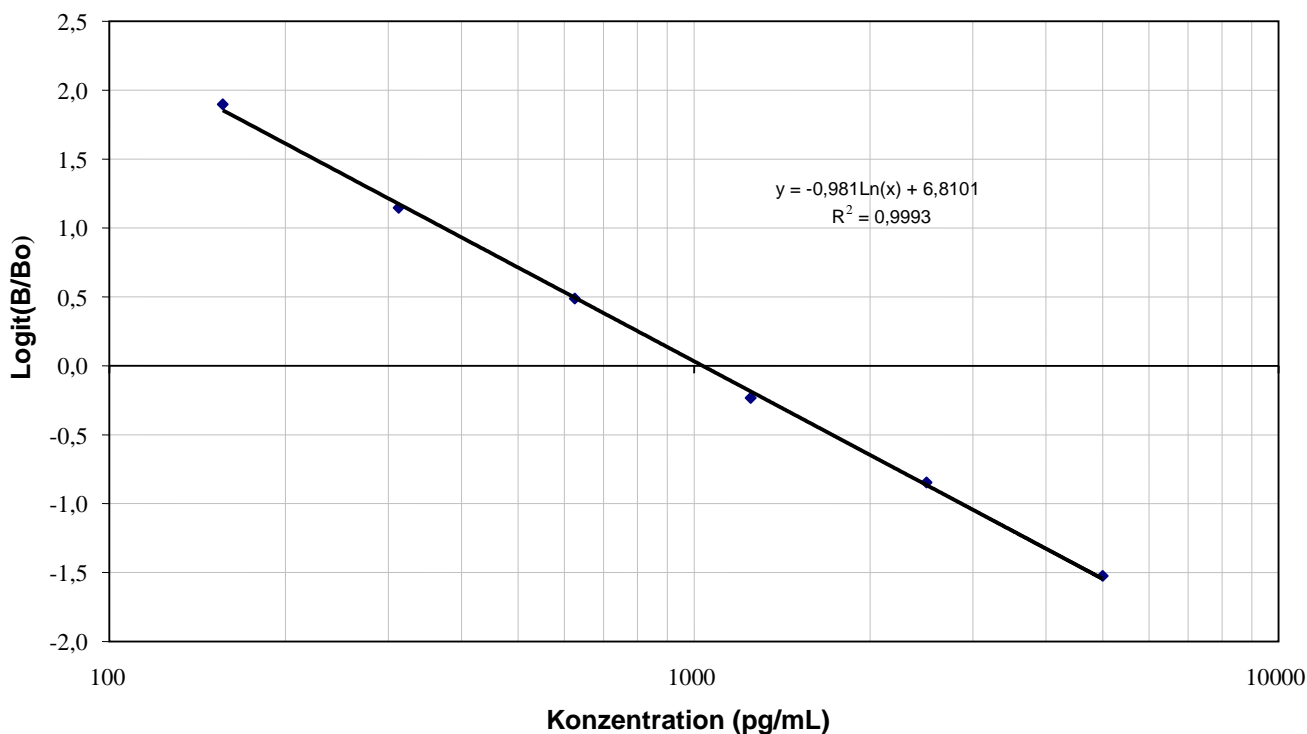
9. Die Platte mit der vorgesehenen klebenden Plattenversiegelung abdecken und eine 2-stündige Inkubation mittels eines rotierenden Mixers (300-600 rpm) bei einer Raumtemperatur zwischen 18-26°C vornehmen. Nach einer vollständigen Inkubation die Mikroplattenhalterung von oben und unten jeweils festhalten, 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 B₀ 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 gleichmäßigem 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

Die Testergebnisse werden nach einer Log-Logit- oder einer Semi-Log-Transformation durch lineare Regression berechnet, was einer durch die Referenzpunkte gezeichneten Ausgleichsgerade entspricht. Ebenso kann eine alternative abgesicherte Kurvenanalyse eingesetzt werden. Kontroll- and 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.

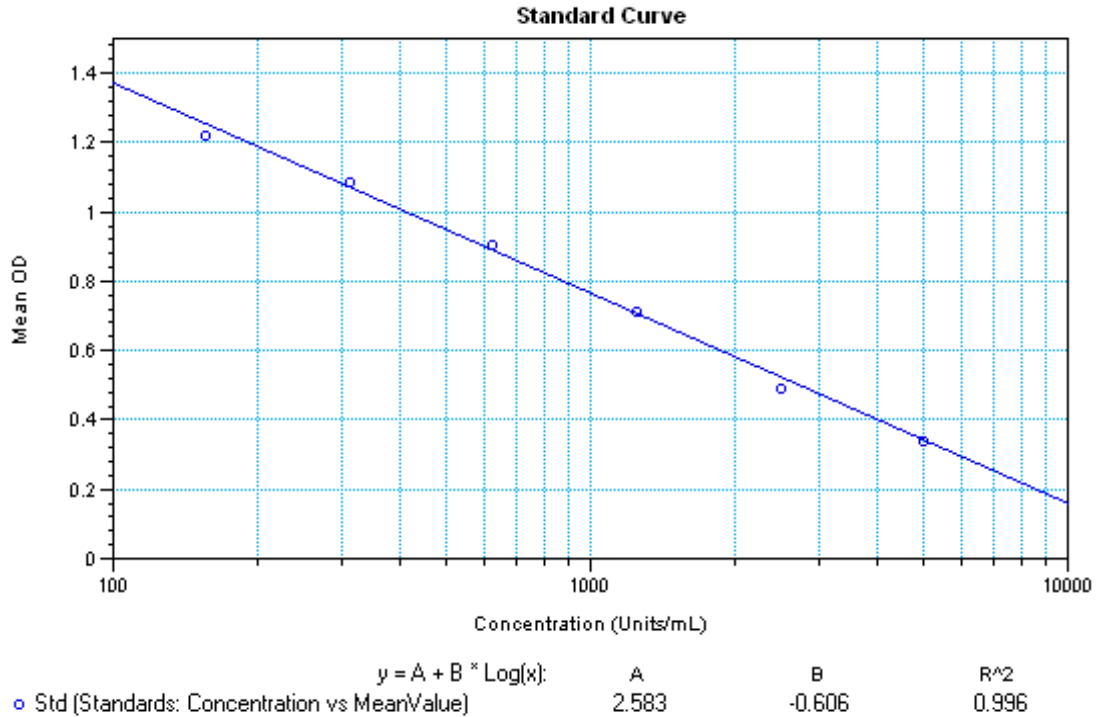
Beispiele für 11dhTxB₂-Kalibrierungskurven (Log-Logit und Semi-Log) sind unten dargestellt. Diese Kalibrierungskurven dienen ausschließlich der Illustration. Eine Kalibrierungskurve sollte vom Anwender für jeden durchgeführten Test erstellt werden.

Log-Logit-Kalibrierungs Kurve
(Nur zur Illustration – Nicht für tatsächlich durchgeführte Tests verwenden)



Semi-Log-Kalibrierungskurve

(Nur zur Illustration – Nicht für tatsächlich durchgeführte Tests verwenden)



Ergebnisberechnung - Log-Logit

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:

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

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:

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

$$Y = \text{Durchschnitt aus zwei unabhängigen Well-Werten (wenn Doppelbestimmungen durchgeführt wurden)}$$

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 R² 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:

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

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

Den Mittelwert aus den doppelten X-Werten ermitteln (wenn durchgeführt).

X= Durchschnitt aus zwei individuellen Vertiefungsleerwerten

Ergebnisberechnung durch Lineare Regression - Semi-Log

Die mittlere OD (Leerwert abgezogen) der Doppelwerte (wenn Doppelbestimmungen durchgeführt wurden) für alle Konzentrationen der Kalibrierungskurve, die Kontrollen und die Patientenproben berechnen. Den für die einzelnen Verdünnungen der Kalibrierungskurve erhaltenen mittleren OD-Wert (y-Achse) gegen die entsprechende Referenzkonzentration der Kontrollen (x-Achse) logarithmisch auftragen. Die Kalibrierungskurve kann entweder automatisch mit Hilfe eines validierten Softwareprogramms oder manuell auf Millimeter-/Logarithmenpapier erstellt werden. Mit Hilfe der Kalibrierungskurve die Werte für Kontrollen und Patientenproben bestimmen.

Ergebnisse der Patientenproben

Der Schwellwert aus 11dhTxB₂ 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 11dhTxB₂ (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 11dhTxB₂/mg angezeigt.

Beispiel:

- Relativwert des Patienten: 1000
- Korrektur-Faktor für die Eichlösung: 1,05
- Istwert des Patienten 11dhTxB₂: $1000 \times 1,05 = 1050$ pg/mL.
- Kreatinin-Wert des Patienten = 150 mg/dL
- Angezeigter Endwert: $(1050 \text{ pg/mL} / 150 \text{ mg/dL}) \times 100 = 700$ pg 11dhTxB₂/mg Kreatinin
- In diesem Beispiel der erstellte Kreatininwert 700 pg 11dhTxB₂/mg liegt unter dem Kreatinin-Grenzwertpunkt von 1500 pg 11dhTxB₂/mg, wodurch angedeutet wird, dass eine ASAWirkung entdeckt worden ist.

Auswertung der Ergebnissbefunde

Der Probebefund basiert auf den Schwellwert aus 11-Dehydro Thromboxan B₂, der aus einer Urinprobe gewonnen worden ist und in pg/mg Mengen angezeigt wird. Die Auswertung der Ergebnissbefunde basiert auf folgenden erstellten Grenzwertpunkten:

> 1500 pg/mg Normalisierte Werte aus 11-Dehydro Thromboxan B₂ zeigen einen Mangel an ASAWirkung an

≤ 1500 pg/mg Normalisierte Werte aus 11-Dehydro Thromboxan B₂ zeigen ASAWirkung an

QUALITÄTSKONTROLLE

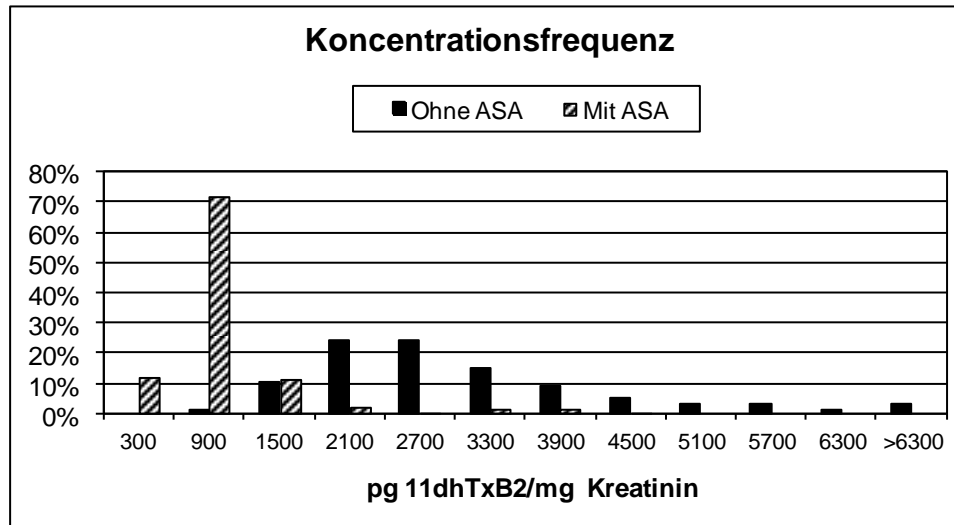
1. Die durchschnittliche optische Dichte der B₀ Leerwerte (maximale Bindung) sollte mindestens 0,600 sein. Anzeigewerte, die geringer als 0,600 sind, weisen möglicherweise auf Reagenzverunreinigung hin oder unausreichende Reinigung der Platte.
2. Die mittlere OD des Leerwerts sollte geringer als 0,300 sein. Höhere Extinktionen können entweder durch Kontamination der Reagenzien oder durch unzureichendes Waschen der Mikrotiterplatte bedingt sein.
3. Die 11dhTxB₂ 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 µL Probe + 250 µL 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 µL Probe + 450 µL Probeverdünnung) oder eine 1:20 Lösung (25 µL Probe + 475 µL Probeverdünnung) einsetzt. Da die Endergebnisse auf einer 1:5-Verdünnung basieren, muss die Berechnung entsprechend angepasst werden (d. h. für eine 1:2-Verdünnung die Endergebnisse mit 0,4 und für eine 1:10-Verdünnung mit 2 multiplizieren).
6. Bei Doppelbestimmungen sollten bei Kontrollen oder Proben mit einer optischen Dichte im Bereich von 300 bis 4000 pg/ml die Messwerte nicht mehr als 20 % vom Mittelwert der optischen Dichte abweichen.

7. Die R^2 -Werte für die Kalibrierungskurve sollten mindestens $\geq 0,95$ sein.

TESTCHARAKTERISTIKA

Voraussichtliche Werte:

Die funktionellen Charakteristika des 11dhTxB₂ Testkits sind in einer Studie evaluiert worden, die 166 scheinbar gesunde Erwachsene zum Inhalt hatte, die vor bzw. nach dem Erhalt von überwachten ASA-Dosierungen untersucht worden sind (201 Probeentnahmen von Personen mit ASA-Gaben und 204 Probeentnahmen von Personen ohne ASA-Gaben). 11-Dehydro Thromboxan B₂ 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 11dhTxB₂ pro mg Urinkreatinin angenommen.



Klinische Durchführung:

Die klinische Durchführung des Corgenix 11dhTxB₂ Testes ist auch anhand dieser Personen evaluiert worden. Die 11dhTxB₂ Resultate werden als positiv oder negativ aufgeführt, die auf eine Grenzwertausrichtung von 1500 pg 11-Dehydro Thromboxan B₂ pro mg Urinkreatinin beruhen. Es gibt jeweils eine Tabelle sowohl für 81 mg als auch für 325 mg-ASADosierungen.

		ASA-Einnahme	
		Anwesend	Abwesend
11dhTxB₂ 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%

		ASA-Einnahme	
		Anwesend	Abwesend
11dhTxB2Resultate 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 11dhTxB2Testkit 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)
11dhTxB2Resultate	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 11dhTxB2Testkit 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 B ₂ - 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:

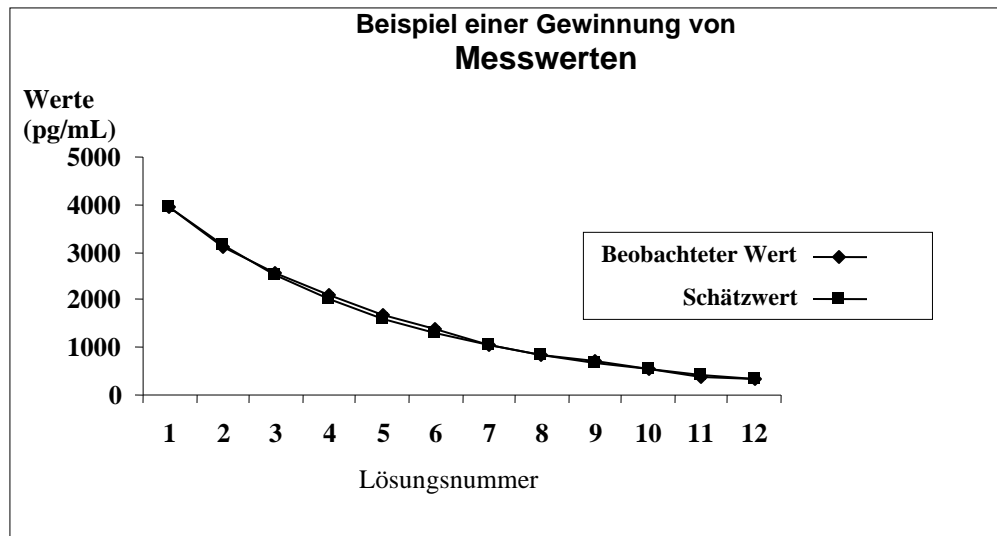
Es gab Kontrolluntersuchungen der Proben auf mögliche Beeinträchtigungen. Im nachfolgenden sehen Sie eine tabellarische Auflistung von Substanzen, die keine bedeutende Wirkung auf die abgemessene Konzentration aus 11-Dehydro Thromboxan B₂ zeigten:

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 11dhTxB₂ 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 Urineinzelpben zeigten ähnliche Resultate auf.

Lösung Nr.	Beobachteter Wert (pg/mL)	Voraussichtlicher Wert (pg/mL)	Beobachteter und 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 11dhTxB₂ 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 ASAEffektes 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 Medikamentverabreichungen des Patienten miteingeschlossen werden, sowie seine Ernährungsgewohnheiten bzw. diätische Supplemente, um entscheiden zu können, ob der Patient bestimmte ASAWirkungen 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 ASA 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 Antikoagulanen, Glykoprotein IIb/IIIa Inhibitoren, Klopido­grel oder Heparin oral einnehmen, haben bei dem 11dhTxB₂Testkit keine Beachtung gefunden.

Das 11dhTxB₂-Nachweiskit ist nicht geeignet, die Wiederaufnahme der Thrombozytenfunktion nach Absetzen der oralen ASAEinnahme zu bewerten.

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.

Unsere(n) 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.

11dhTxB₂ ist eine registrierte Handelsmarke von Creative Clinical Concepts, Inc.

Teile oder der gesamte Inhalt, der in der 11dhTxB₂Packungsbeilage aufgeführt ist, ist durch eine noch ausstehende Patentanmeldung abgedeckt.

Kit de test 11dhTxB₂ (11-Dehydro Thromboxane B₂)

Pour un diagnostic in vitro

APPLICATION

La trousse 11dhTxB₂Test est un dosage par méthode immunoenzymatique (ELISA) permettant de déterminer le taux de 11-déhydro thromboxane B₂ (11dhTxB₂) dans l'urine humaine, ce qui facilite la détection qualitative de l'effet de l'acide acétylsalicylique (ASA) chez les personnes apparemment en bonne santé après l'ingestion. À usage professionnel exclusivement.

RESUME ET EXPLICATION DE L'ANALYSE

Les plaquettes activées et les agrégats de plaquettes jouent un rôle clé dans la formation de caillot. 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 Ainsi, 11dhTxB₂ est un métabolite stable de TxA₂ et un indicateur *in vivo* de l'activité plaquettaire.

L'ASA (acide acétylsalicylique) est connu depuis de nombreuses années pour avoir une activité antiplaquettaire.⁸ L'ASA fonctionne en acétylant et en inhibant irréversiblement le COX-1 et donc en inhibant la production de TxA₂ et de ses métabolites.⁹⁻¹¹ De l'ASA à faible dose bloque plus de 95 % de l'activité COX-1 dans les plaquettes.¹²⁻¹³ Le dosage des métabolites stables de TxA₂, comme le 11dhTxB₂ urinaire, est un moyen de quantifier *in vivo* la production de TxA₂ et, par conséquent, une manière directe d'analyser l'effet de l'ASA après ingestion.^{7,14-16} Le test 11dhTxB₂ peut déterminer si l'ASA ingérée par une personne inhibe l'activité cyclooxygénase dans les plaquettes par dosage du 11dhTxB₂. L'ASA est disponible sous plusieurs noms de marque et/ou sous diverses formes, y compris l'Aspirin® de Bayer.*

PRINCIPE DU TEST

Le kit de test 11dhTxB₂ 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 de 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 11dhTxB₂ 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.

*Dans certains pays, l'aspirine est une marque déposée de Bayer AG.



- 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 diagnostique 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 (diluant 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).

Avertissement . Risque biologique .

PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

L'urine humaine est la matrice d'échantillon recommandée. Les échantillons doivent être prélevés et un conservateur urinaire doit être ajouté dans les 24 heures si le test n'est pas effectué immédiatement. Les conservateurs recommandés sont notamment les comprimés Chlorstat (Bio-Medical Products Corp.), les tubes BD C&S Vacutainer ou les tubes BD UAP Vacutainer (Becton, Dickenson and Company). 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 72 heures, ils doivent être congelés à ≤ -20°C. Les échantillons frais ou décongelés doivent être centrifugés à 1000 g pendant 15 minutes avant le test. Chaque échantillon doit être testé quant à la créatinine et au 11dhTxB₂ pour obtenir des résultats précis.

INSTRUCTIONS D'UTILISATION

Eléments fournis :

Kit de test 11dhTxB₂ ; voir la section « Réactifs » pour la liste complète.

Eléments 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. Eviter 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 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 dessiccateur dans le sac refermable fourni.
2. Préparer la courbe de référence. Numérotter six tubes de 1 à 6. Ajouter 500 µL de solution de référence 11dhTxB₂ 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 dosages de puits en double sont recommandés pour la solution de référence 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

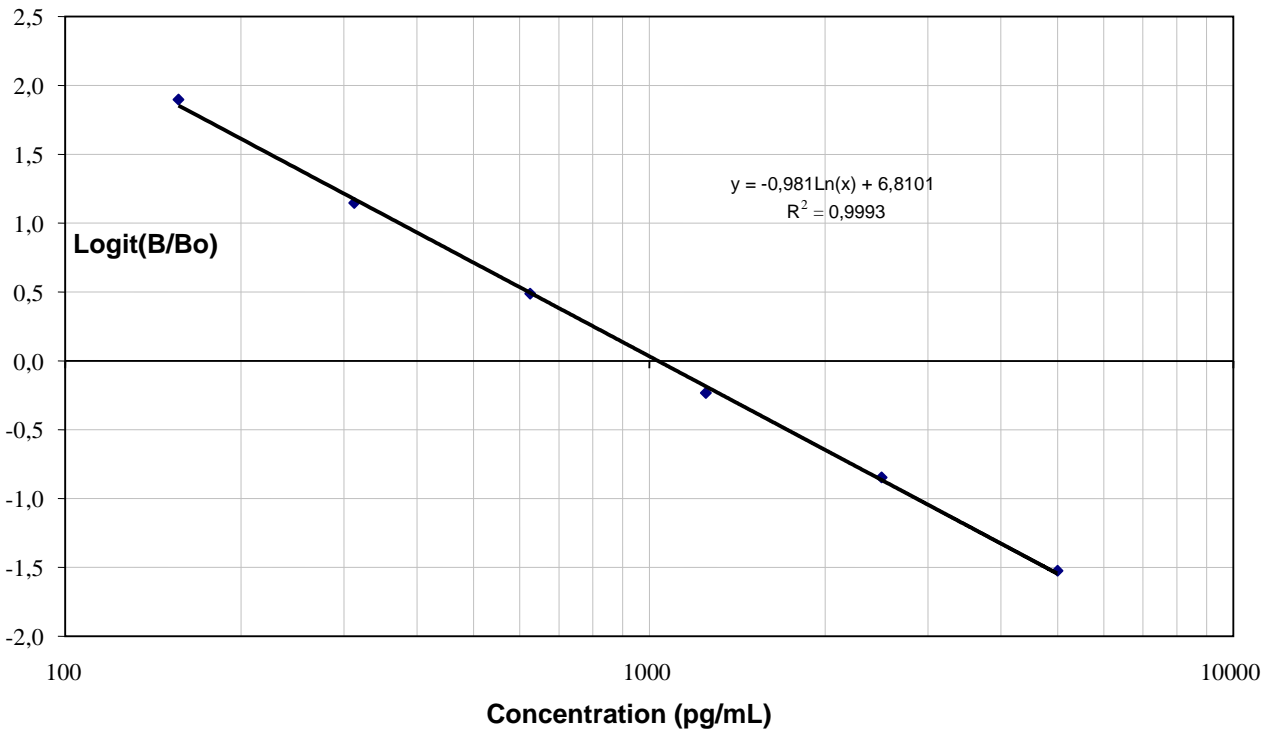
9. Couvrir la plaque avec le joint adhésif fourni et incubé pendant 2 heures à température ambiante (18 à 26°C) sur un agitateur rotatif 300-600 rpm. Une fois l'incubation terminée, attraper fermement la microplaque par le haut et par le bas pour retenir les modules de microcupule et retourner soigneusement 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

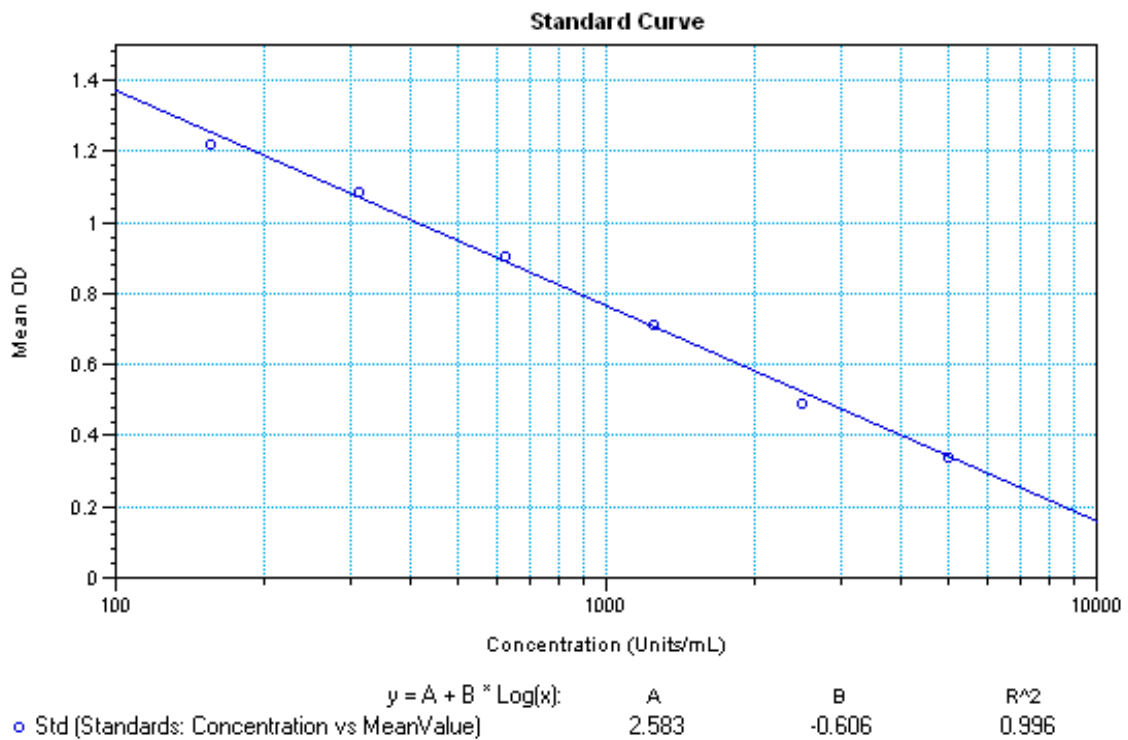
Les résultats du dosage doivent être calculés par analyse logarithmique ou semi-logarithmique et tracé de régression linéaire (courbe de « meilleur ajustement ») entre les points de référence. Intercaler les valeurs relatives des contrôles et des échantillons patient à partir de la courbe de référence, 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 11dhTxB₂ (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 11dhTxB₂/mg. Vérifier que tous les paramètres de contrôle de qualité aient été respectés (voir la section Contrôle de qualité) avant de reporter les résultats.

Des exemples de courbes de référence 11dhTxB₂ (système logarithmique ou semi-logarithmique) sont représentés ci-dessous. Ces courbes de référence sont données à titre indicatif uniquement. Une courbe de référence doit être élaborée par l'utilisateur pour chaque dosage effectué.

**Courbe de référence logarithmique
(À titre d'exemple – ne pas utiliser)**



**Courbe de référence semi-logarithmique
(À titre d'exemple – ne pas utiliser)**



Calcul des résultats en système logarithmique

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 :

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

$$Y = \text{moyenne des valeurs de deux puits individuels (si mesures en double effectuées)}$$

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

Calculer la moyenne des valeurs X en double (si effectuées)

X = moyenne de deux valeurs de cupule individuelles

Calcul des résultats par régression linéaire semi-logarithmique

Calculer la densité optique moyenne (blanc soustrait) des mesures en double pour chaque point de la courbe de référence et des contrôles, ainsi que pour les échantillons de patients (si des mesures en double ont été effectuées). Représenter graphiquement la densité optique moyenne obtenue pour chaque dilution de la courbe de référence (axe Y) en fonction de la valeur correspondante du niveau de référence sur une échelle logarithmique (axe X). La courbe de référence peut être tracée automatiquement à l'aide d'un programme logiciel validé ou manuellement sur du papier millimétré (courbe de « meilleur ajustement »). Déterminer les valeurs des contrôles et des échantillons patients à partir de la courbe de référence.

Résultats des échantillons de patients

Pour calculer le niveau de 11dhTx_{B2} 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_{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.

Exemple :

- La valeur relative du patient est : 1000
- Le facteur de correction de la solution de référence : 1,05
- La valeur 11dhTx_{B2} réelle du patient est : 1000 x 1,05 = 1050 pg/mL.
- Valeur de créatinine du patient = 150 mg/dL
- Valeur finale reportée : (1050 pg/mL/150 mg/dL)*100 = 700 pg 11dhTx_{B2}/mg de créatinine
- Dans cet exemple, le résultat de créatinine de 700 pg 11dhTx_{B2}/mg est en dessous du seuil de créatinine de 1500 pg 11dhTx_{B2}/mg, ce qui suggère que l'effet de l'ASA est détecté.

Interprétation des résultats

Le résultat d'échantillon se base sur le niveau de 11-Déhydro Thromboxane B₂ 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 :

> 1500 pg/mg Les niveaux normalisés de 11-Déhydro Thromboxane B₂ indiquent un effet insuffisant de l'ASA

≤ 1500 pg/mg Les niveaux normalisés de 11-Déhydro Thromboxane B₂ indiquent que l'ASA a un effet

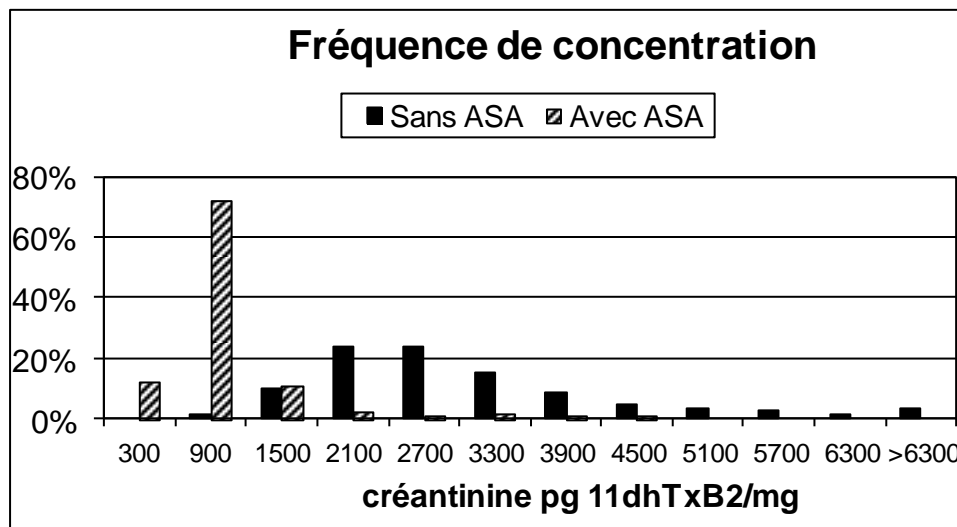
CONTROLE QUALITE

1. La D.O. moyenne des cupules B₀ (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 densité optique moyenne du dosage du blanc doit être $\leq 0,3$. Une mesure supérieure à 0,3 peut indiquer une contamination possible du réactif ou un lavage insuffisant de la plaque.
3. Les valeurs 11dhTxB₂ 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 μ L échantillon + 250 μ L 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 μ L échantillon + 450 μ L diluant) ou à une dilution 1:20 (25 μ L échantillon + 475 μ L diluant). Étant donné que les résultats finaux sont basés sur une dilution au 1:5, ne pas oublier d'ajuster les calculs en conséquence (c'est-à-dire, pour une dilution au 1:2, multiplier le résultat final par 0,4 ; pour une dilution au 1:10, multiplier par 2).
6. La densité optique des dosages en double des contrôles et échantillons de patients (si effectués) doit présenter une variation maximale de 20 % par rapport à la densité optique. moyenne des échantillons et se situer dans un intervalle de 300 à 4 000 pg/ml.
7. Les valeurs R2 pour la courbe de référence doivent être $\geq 0,95$.

PERFORMANCES

Valeurs attendues :

Les performances du kit de test 11dhTxB₂ 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'ASA (201 échantillons de personnes prenant de l'ASA 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 11dhTxB2 de Corgenix a été évaluée chez ces personnes. Les résultats d'11dhTxB2 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'ASA de 81 mg et de 325 mg.

		Ingestion d'ASA	
		Présente	Absente
Résultat d'11dhTxB2 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'ASA	
		Présente	Absente
Résultat d'11dhTxB2 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 11dhTxB2a 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'11dhTxB2	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 11dhTxB2 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 :

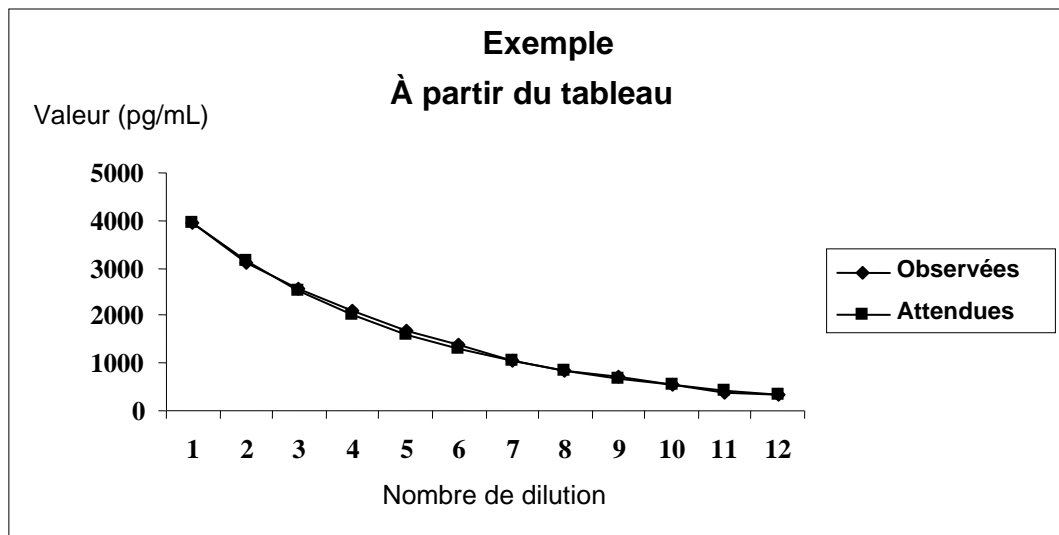
Les échantillons ont été testés pour une interférence potentielle. Les matières suivantes n'ont eu aucun effet significatif sur la concentration mesurée de 11-Déhydro Thromboxane B₂ :

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 11dhTxB₂ 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 11dhTxB₂. 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 11dhTxB₂ 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'ASA 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'ASA 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'ASA 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 11dhTxB₂.

La trousse 11dhTxB₂Test n'a pas vocation à mesurer la reprise de la fonction plaquettaire à l'arrêt de l'ingestion d'ASA.

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.

Tout ou partie du contenu de la notice du kit de test 11dhTxB₂ est couvert par un brevet en instance.

11dhTxB₂ Kit de Prueba (11-Dehydro Thromboxano B₂)

Para uso de diagnóstico in vitro

USO PREVISTO

La prueba 11dhTxB₂ es un ensayo inmunológico vinculado con enzimas (ELISA) para determinar los niveles de 11-Dehidro Tromboxano B₂ (11dhTxB₂) en la orina humana, que ayuda en la detección del efecto de la ácido acetilsalicílico (AAS) después de la ingestión en individuos aparentemente sanos. Para uso profesional solamente.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL ENSAYO

Las plaquetas activadas y agregadas desempeñan una función clave en la coagulación. 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-Dehidro Tromboxano B₂ (11dhTxB₂), 11-Dehidro 2,3 dinor Tromboxano B₂ (11dh2,3DTxB₂, una forma truncada 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 *in vivo* de la actividad de la plaqueta.

Desde hace muchos años se sabe que el AAS (ácido acetilsalicílico) tiene actividad antiplaquetaria.⁸ La forma en que funciona el AAS es acetilando e inhibiendo irreversiblemente COX-1, por tanto inhibiendo la producción de TxA₂ y sus metabolitos.⁹⁻¹¹ El AAS en dosis bajas boquea más del 95% de la actividad de COX-1 en la plaqueta.¹²⁻¹³ La medición de los metabolitos estables de TxA₂, por ejemplo el urinario 11dhTxB₂, 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 el AAS después de su ingestión.^{7, 14-16} La prueba 11dhTxB₂ puede determinar si el AAS ingerida por una persona está inhibiendo la actividad de cyclooxygenase en la plaqueta, mediante la medición de 11dhTxB₂. El AAS está disponible bajo varios nombres de marca y/o en diferentes formas, tales como Aspirina® de Bayer.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El kit de prueba 11dhTxB₂ 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 se informan como pg 11dhTxB₂ por mg de creatinina 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 11dhTxB₂ 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.

*Aspirina es una marca registrada de Bayer AG en ciertos países.



- 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)

Advertencia . Riesgo biológico .

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

La orina humana es la matriz de muestra recomendada. Una vez recogidas las muestras, el preservante urinario debe añadirse dentro de 24 horas, si no se analizan inmediatamente. Los preservantes recomendados incluyen las tabletas Chlorstat (Bio-Medical Products Corp.), los tubos Vacutainer BD C&S o BD UAP (Becton, Dickenson and Company). 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 72 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:

11dhTxB₂ 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. Revuelva suavemente y deje pasar 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 11dhTxB₂ 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 duplicar las determinaciones de las cubetas para la solución de referencia y las muestras de control. 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

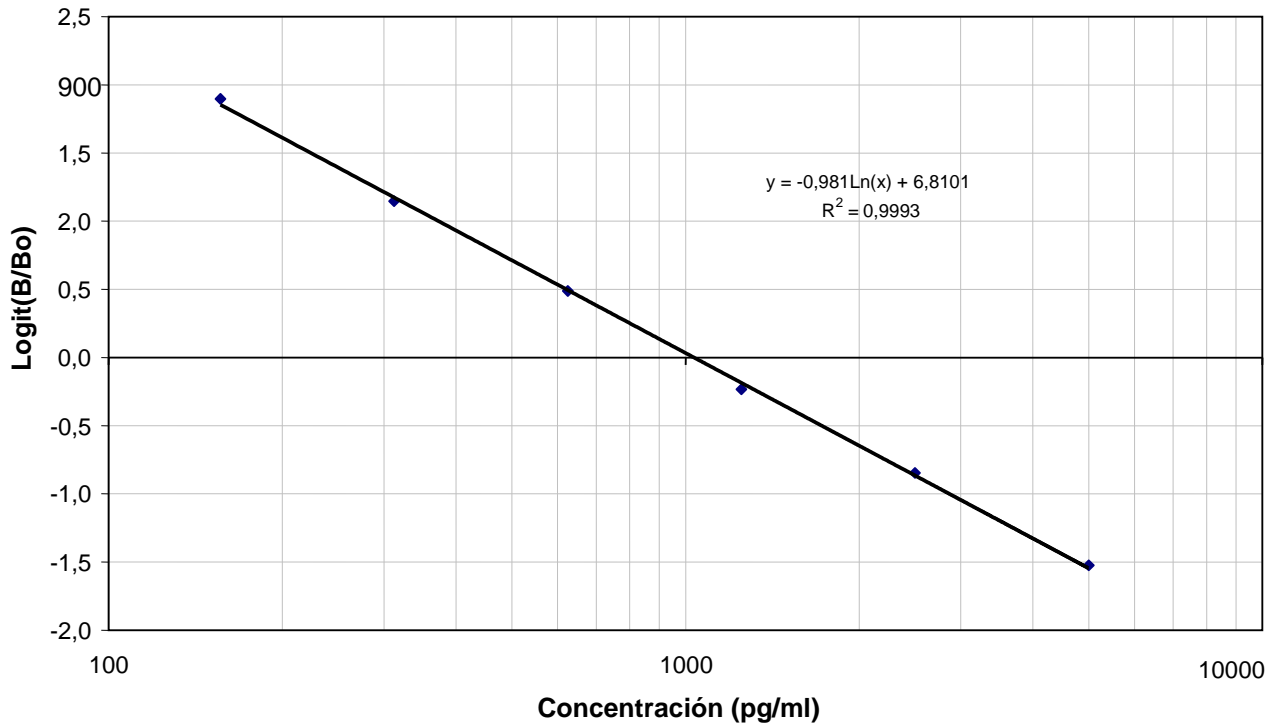
9. Cubra la placa con el sellador de placa adhesivo que se suministra e incube durante dos horas a la temperatura ambiente (18-26°C) en un agitador rotatorio a 300-600 rpm. Una vez que la incubación se haya terminado, sujete firmemente el armazón de la microplaca por la parte superior e inferior para 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 la 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 B_0 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

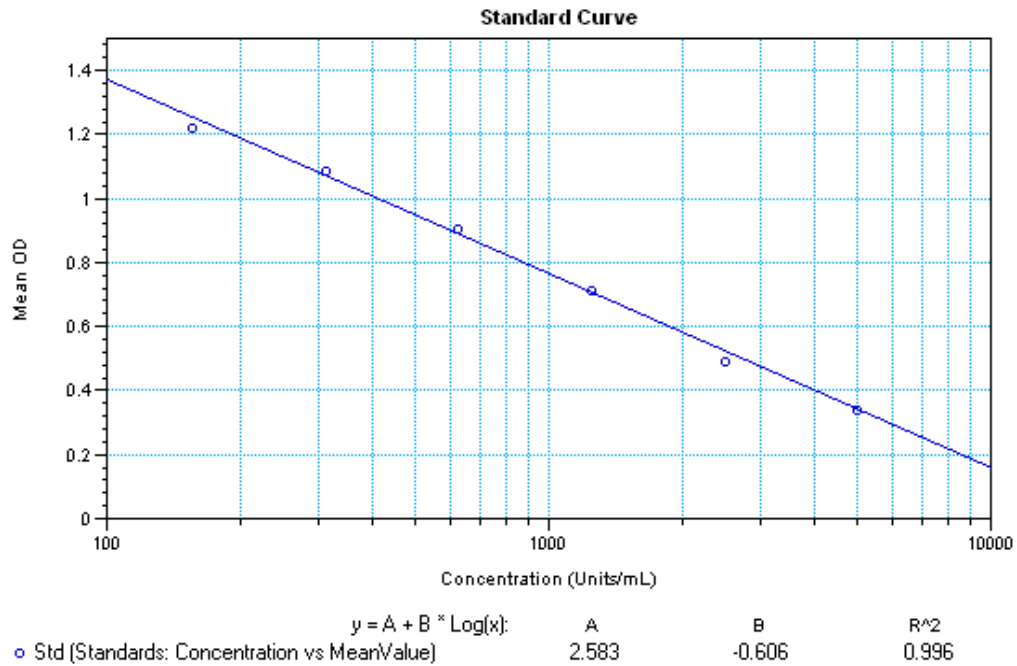
Los resultados del ensayo deben calcularse mediante análisis log-logit o semi-log con una regresión lineal (línea del "mejor encaje") a través de los puntos de referencia. Interpole los valores relativos de control y paciente de la curva de referencia y multiplique los valores relativos por el factor 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 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. 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 las curvas de referencia de 11dhTx B_2 (log-logit y semi-log). Estas curvas de referencia se muestran solamente como ilustración. El usuario debe generar una curva de referencia para cada ensayo realizado.

**Curva de referencia log-logit
(Sólo como ejemplo–no lo use)**



**Curva de referencia semi-Log
(Sólo como ejemplo – no lo use)**



Cálculos de resultados Log-Logit

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 = promedio de dos valores de cubetas individuales (si se utilizaron duplicados)

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 (si se utilizaron).

X = promedio de dos valores de pozos concretos

Cálculos de resultados de regresión lineal semi-log

Calcule los valores medios de la D.O. (tras restar el blanco) para los duplicados de cada punto de la curva de referencia y de los controles, y de las muestras de pacientes (si se hicieron duplicados). Trace las D.O. medias obtenidas con cada dilución de la curva de referencia (eje y) respecto al valor correspondiente del nivel de referencia en una escala logarítmica (eje x). La curva de referencia puede trazarse automáticamente con un programa informático validado o manualmente con papel para gráficas (línea del "mejor encaje"). Determine los valores de los controles y las muestras de pacientes obtenidos a partir de la curva de referencia.

Resultados de las muestras de pacientes

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 ASA.

Interpretación de los resultados

El resultado de muestra está basado en el nivel de 11-Dehydro Tromboxano B₂ 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:

- > 1500 pg/mg Unos niveles normalizados de 11-Dehydro Tromboxano B₂ indican una ausencia de efecto de el AAS
- ≤ 1500 pg/mg Unos niveles normalizados de 11-Dehydro Tromboxano B₂ indican la presencia de efecto de el AAS

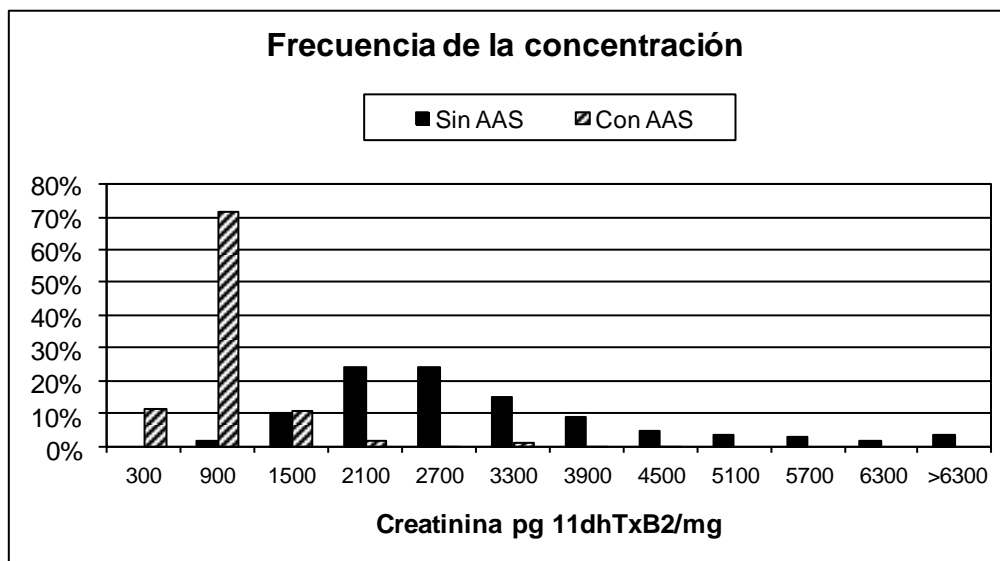
CONTROL DE CALIDAD

1. El O.D.promedio de los pozos B₀ (máxima unión) debería ser ≥ 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. medio del blanco de ensayo debe ser ≤ 0,300. Las lecturas cuyo valor es superior a 0,300 pueden indicar una posible contaminación de reactivo o un lavado incorrecto de la placa.
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 µL muestra + 250 µL 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 µL muestra + 450 µL diluido de la muestra) o una dilución de 1:20 (25 µL muestra + 475 µL diluido de la muestra). Como los resultados finales se basan en una dilución de 1:5, asegúrese de ajustar los cálculos en consecuencia (es decir, para una dilución de 1:2 multiplique el resultado final por 0,4; para una dilución de 1:10 multiplique por 2).
6. Los valores O.D. de los duplicados (si se utilizaron) de los controles o muestras de paciente deben tener una diferencia máxima del 20% del valor O.D. medio para muestras que estén dentro del rango 300 – 4000 pg/mL.
7. Los valores R² para la curva de referencia deben ser ≥ 0,95.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Valores previstos:

Las características de rendimiento del kit de pruebas 11dhTxB₂ fueron evaluadas en un estudio en el que participaron 166 adultos aparentemente sanos, antes y/o después de recibir dosis controladas de AAS (201 muestras de personas que habían tomado AAS y 204 muestras de personas que no había tomado AAS). 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 11dhTxB2 fue también evaluado en estas personas. Los resultados de 11dhTxB2son 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 AAS de 81 mg y de 325 mg.

		Ingestión de AAS	
		Presente	Ausente
Resultado de 11dhTxB ₂ 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 AAS	
		Presente	Ausente
Resultado de 11dhTxB ₂ 325 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 11dhTxB2fue 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 11dhTxB ₂	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 11dhTxB₂es 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:

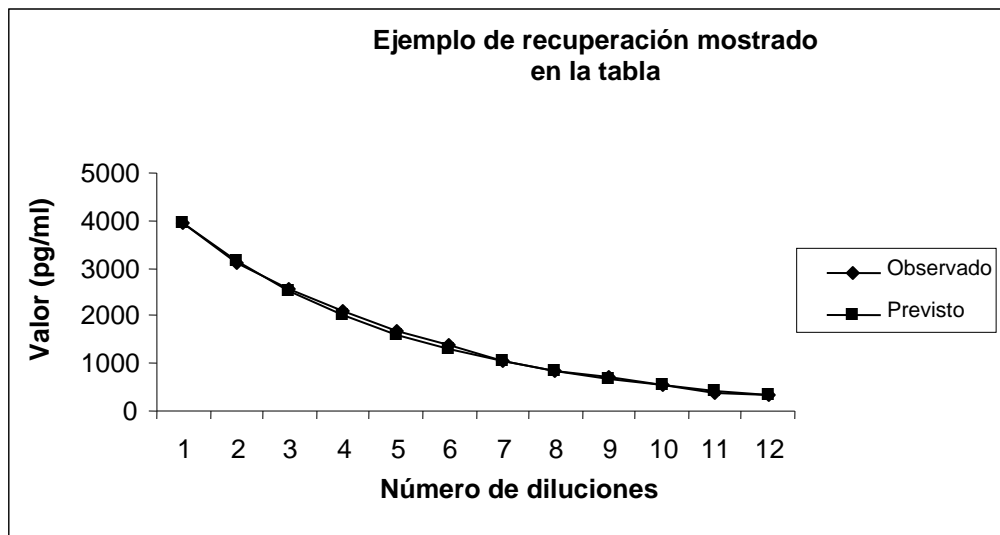
Se sometieron a prueba las muestras para averiguar la posible interferencia. Los materiales siguientes no tuvieron efecto significativo en la concentración medida de 11-Dehydro Tromboxano B₂:

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 11dhTxB₂. 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 11dhTxB₂ 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 AAS 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 AAS, 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 el AAS 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 11dhTxB₂ muestras de personas que estén tomando anticoagulantes orales, inhibidores de glucoproteína IIb/IIIa, clopidrogel o heparina.

La prueba 11dhTxB₂ no está diseñada para medir el retorno de la función plaquetaria tras la suspensión de la ingesta de AAS.

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.

Parte del material o todo el tema contenido en el encarte del paquete 11dhTxB₂ está protegido por una solicitud de patente actualmente en curso.

Kit di analisi 11dhTxB₂ (11-deidro trombossano B₂)

Per uso diagnostico in vitro

IMPIEGO PREVISTO

Il kit di analisi 11dhTxB₂ è un immunodosaggio a legame enzimatico (ELISA) per determinare i livelli di 11-deidro trombossano B₂ (11dhTxB₂) nell'urina umana, che favorisce il rilevamento quantitativo dell'effetto dell'acido acetilsalicilico (AAS) dopo l'ingestione in soggetti apparentemente sani. Solo per uso professionale.

COMPENDIO E SPIEGAZIONE DEL DOSAGGIO

Le piastrine attivate e aggregate hanno un ruolo chiave nella patogenesi della formazione dei coaguli. 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 Quindi 11dhTxB₂ è un metabolita stabile di TxA₂ e un indicatore *in vivo* dell'attività piastrinica.

L'AAS (acido acetilsalicilico) è nota da anni per la sua attività anti-piastrinica.⁸ L'AAS agisce acetilando e inibendo in maniera irreversibile COX-1, inibendo in questo modo la produzione di TxA₂ e dei suoi metaboliti.⁹⁻¹¹ Una dose di AAS bassa è in grado di bloccare oltre il 95% dell'attività piastrinica di COX-1.¹²⁻¹³ 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 AAS post-ingestione.^{7,14-16} L'analisi 11dhTxB₂ può determinare se l'ASA ingerita da un soggetto stia inibendo l'attività piastrinica della cicloossigenasi tramite la misurazione di 11dhTxB₂. L'AAS viene commercializzato con vari marchi e/o in arie forme, tra cui Bayer Aspirin®.*

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il kit di analisi 11dhTxB₂ 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 11dhTxB₂ 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.

*Il nome Aspirina è un marchio registrato di Bayer AG in alcuni paesi.

- 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).

Avvertimento . Rischio biologico .

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

L'urina umana è la matrice del campione consigliata. È necessario aggiungere ai campioni raccolti un conservante urinario entro 24 ore se non si prevede di analizzarli immediatamente. I conservanti consigliati comprendono le pasticche Chlorstat (Bio-Medical Products Corp.) e le provette BD C&S Vacutainer o BD UAP Vacutainer (Becton, Dickenson and Company). Se l'analisi non viene eseguita immediatamente, è necessario conservare i campioni a 2-8 °C. Se i campioni devono essere conservati per oltre 72 ore, è necessario congelarli a ≤ -20 °C. I campioni freschi o scongelati devono essere centrifugati a 1000xg per 15 minuti prima dell'analisi. Per ottenere risultati accurati, è necessario analizzare ciascun campione per la creatinina e 11dhTxB₂.

ISTRUZIONI PER L'USO

Materiali forniti

Kit di analisi 11dhTxB₂; 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 passare 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 11dhTxB₂ 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 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

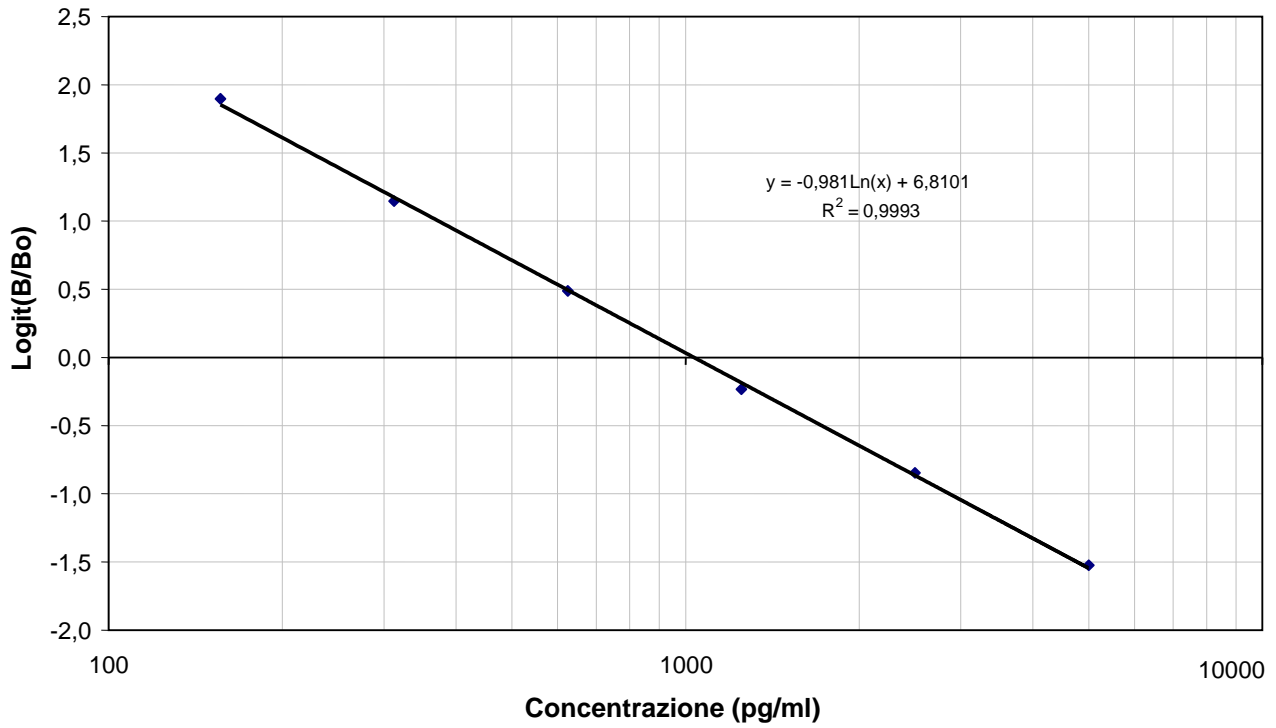
9. Coprire la piastra con la piastra sigillatrice adesiva fornita e incubare per 2 ore a temperatura ambiente (18-26 °C) su un agitatore rotante a 300-600 giri/min. Al termine dell'incubazione, afferrare saldamente la struttura delle micropiastre nella parte superiore e inferiore per trattenere i moduli 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 picchiando 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

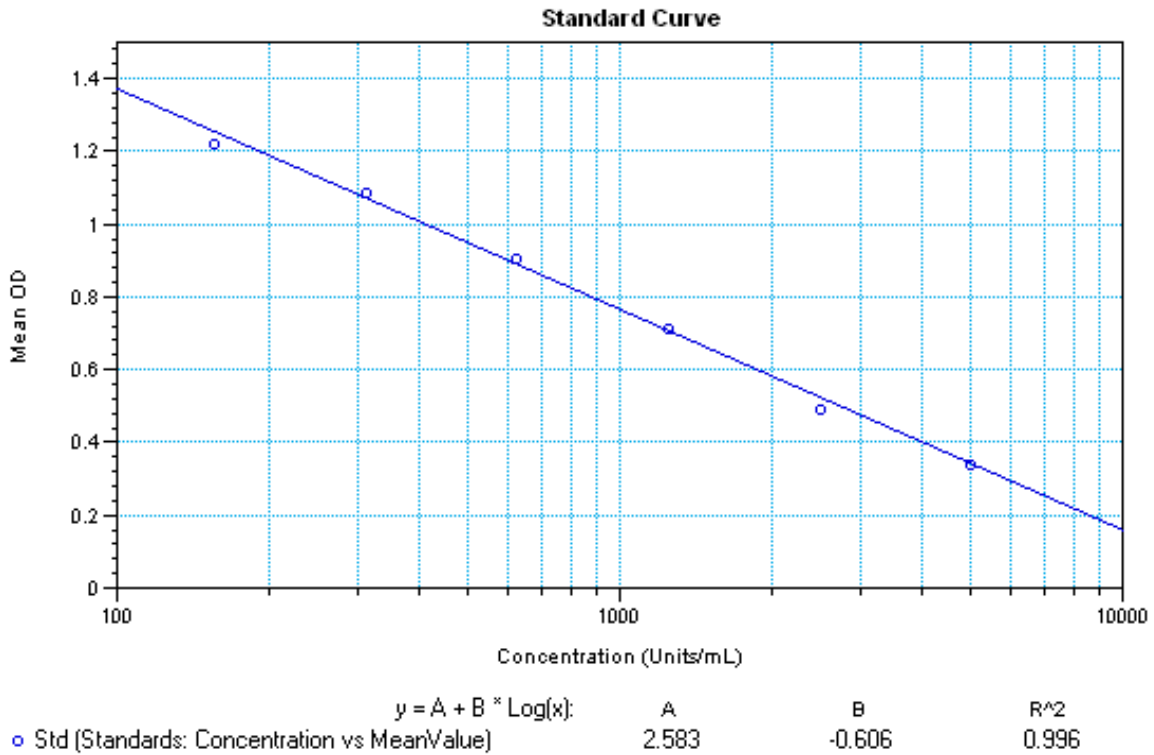
I risultati delle analisi devono essere calcolati con un'analisi log-logit o semi-logaritmica con regressione lineare, con una linea di "best fit" tracciata tra i punti di riferimento. Interpolare i valori relativi del controllo e del campione dalla curva di riferimento e moltiplicarli per il fattore 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 11dhTxB₂ (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 11dhTxB₂/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.

Di seguito viene mostrato un esempio delle curve di riferimento 11dhTxB₂ (log-logit e semi-logaritmica). Queste curve di riferimento vengono fornite unicamente a scopo illustrativo. L'operatore deve generare una curva di riferimento per ciascun dosaggio eseguito.

**Curva di riferimento log-logit
(solo esempio – non utilizzare)**



**Curva di riferimento semi-logaritmica
(solo esempio – non utilizzare)**



Calcoli dei risultati log-logit

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:

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

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:

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

$$Y = \text{Media da due singoli valori di pozzetti (se sono stati eseguiti duplicati)}$$

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:

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

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 (se eseguito).

X = media da due singoli valori di pozzetti

Calcolo dei risultati della regressione lineare semi-logaritmica

Calcolare la densità ottica media (dopo aver sottratto il bianco) per i duplicati di ciascun punto della curva di riferimento, dei controlli e dei campioni dei pazienti (se sono stati effettuati duplicati). Tracciare un grafico del valore medio della densità ottica ottenuto per ciascuna diluizione della curva di riferimento (asse y) rispetto al valore corrispondente del livello di riferimento (asse x) sulla scala logaritmica (asse x). La curva di riferimento può essere tracciata automaticamente usando un software convalidato o manualmente su carta millimetrata (linea di "best fit"). Determinare i valori del controllo e del campione dalla curva di riferimento.

Risultati dei campioni dei pazienti

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'ASA.

Interpretazione dei risultati

Il risultato del campione si basa sul livello di 11-deidro trombossano B₂ 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:

> 1500 pg/mg Livelli normalizzati di 11-deidro trombossano B₂ indicano una mancanza di effetto AAS

≤ 1500 pg/mg Livelli normalizzati di 11-deidro trombossano B₂ indicano un effetto AAS

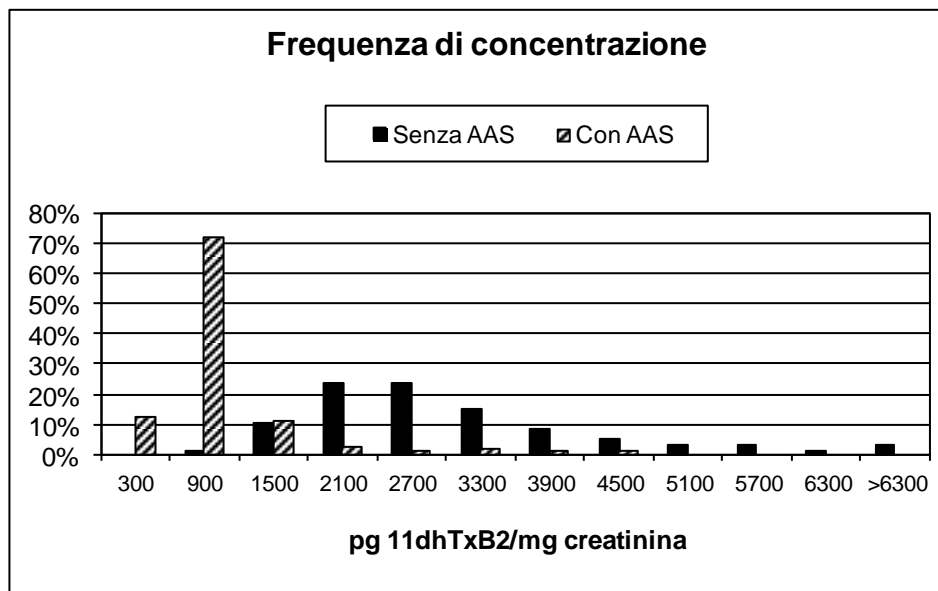
CONTROLLO DI QUALITÀ

1. Il valore della densità ottica media dei pozzetti B₀ (legame massimo) dovrà essere ≥ 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 deve essere ≤ 0,300. Valori superiori a 0,300 possono indicare la possibile contaminazione del reagente, o un insufficiente lavaggio della piastra.
3. I valori di 11dhTxB₂ 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.
5. 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). Poiché i risultati finali si basano su una diluizione di 1:5, ricordarsi di correggere in modo appropriato i calcoli (per una diluizione di 1:2, moltiplicare il risultato finale per 0,4; per una diluizione di 1:10 moltiplicare per 2).
6. I valori di densità ottica dei duplicati dei controlli o dei campioni dei pazienti (se prelevati) devono rimanere entro il 20% del valore medio della densità ottica per campioni entro il range 300 – 4000 pg/ml.
7. I valori di R² per la curva di riferimento dovranno essere ≥ 0,95.

PRESTAZIONI METODOLOGICHE

Valori attesi:

Le caratteristiche prestazionali del kit di analisi 11dhTxB₂ sono state valutate in uno studio che interessava 166 adulti apparentemente sani prima e/o dopo la ricezione di dosi controllate di AAS (201 campioni da soggetti sotto AAS e 204 campioni da soggetti non sotto AAS). 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 11dhTxB2 sono state valutate in questi soggetti. I risultati di 11dhTxB2 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 AAS di 81 mg e 325 mg.

		Ingestione di AAS	
		Presente	Assente
Risultato di 11dhTxB ₂ 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 AAS	
		Presente	Assente
Risultato di 11dhTxB ₂ 325 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 11dhTxB₂ 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 11dhTxB ₂	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 11dhTxB₂ 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:

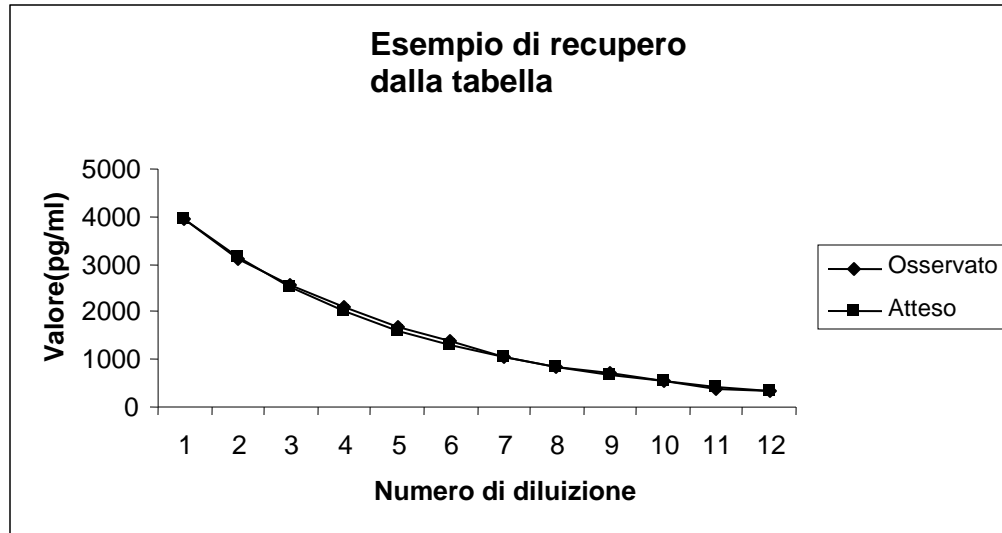
Composto	Concentrazione
Acetaminofen	200 mg/dl
Acido acetilsalicilico	200 mg/dl
Acido ascorbico	200 mg/dl
Caffeina	200 mg/dl
Acido gentisinico	200 mg/dl
Glucosio	2000 mg/dl
Emoglobina	1000 mg/dl
Proteina	2000 mg/dl
Acido salicilico	200 mg/dl

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 11dhTxB₂. 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)	Attessi (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 AAS 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 AAS, 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'AAS 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 11dhTxB₂.

Il kit di analisi 11dhTxB₂ non è indicato per misurare il ripristino della funzione piastrinica dopo l'interruzione dell'ingestione di AAS.

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.

Gli argomenti contenuti nel foglietto illustrativo di 11dhTxB₂ 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. 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.
15. 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.
16. 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

	Manufacturer Hersteller Fabriqué par Fabricado por Prodotta da
	Authorized Representative Bevoll-mächtiger Représentant agréé Representante autorizado Rappresentante autorizzato
	In vitro diagnostic medical device In-vitro-Diagnostikum Dispositif de diagnostic in vitro Dispositivo médico para diagnóstico in vitro Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Batch Code Chargennummer Code de Lot Código de Lote Codice del lotto
	Use by/Expiry Date Verfallsdatum Utiliser jusqu' à/ Date de péremption Usar antes de/ Fecha de caducidad Scade il/ data di scadenza
	Temperature Limitation Temperatur-beschränkungen Limites de température Limitación de temperatura Limite di temperatura
	Warning Waarschuwing Avertissement Advertencia Avvertimento
	Caution Voorzichtigheid Prudence Precaución Cautela
	Biological Risk Biologisches Risiko Risque biologique Riesgo biológico Rischio biologico
	Catalog Number Katalognummer Número de catalogue Número de catálogo Numero di catalogo
	European Conformity CE-Konformitäts-kennzeichnung Conformité aux normes européennes Conformidad europea Conformità europea
	Consult Instructions for Use/ Package Insert Gebrauchsanweisung im Inneren der Verpackung beachten Consulter le mode d'emploi/ notice jointe au conditionnement Consultar las instrucciones de uso/ prospecto del envase Consultare le istruzioni per l'uso/ il foglietto illustrativo
	Importer Importeur Importateur Importador Importatore
	Prescription Only per U.S. FDA Verschreibungspflichtig nur gemäß US-amerikanischer FDA Prescription uniquement selon la FDA des États-Unis Solo con receta, conforme a la FDA de EE. UU. Solo prescrizione per la FDA degli Stati Uniti



MT Promedt Consulting GmbH
Ernst-Heckel-Straße 7
66386 St. Ingbert
Germany



Endotell AG
Gewerbstrasse 25,
CH-4123 Allschwil
Switzerland



ORGENTEC Diagnostika GmbH
Carl-Zeiss-Straße 49-51
55129 Mainz
Germany



Corgenix, Inc.
11575 Main Street, Suite 400
Broomfield, Colorado 80020, USA
REAADS® is a registered trademark of Corgenix, Inc.
© 2023, Corgenix, Inc.



12225 08
Effective: 2023-09-07

THIS PAGE INTENTIONALLY LEFT BLANK

THIS PAGE INTENTIONALLY LEFT BLANK