

TECHNOZYM® ADAMTS-13 Antigen



GB


IT

FR

DE

PT

RU

REF	5450601	TECHNOZYM® ADAMTS-13 Antigen	
REF	5450661	TECHNOZYM® ADAMTS-13 Antigen Calibrator Set	5 x 0.5 mL
REF	5450663	TECHNOZYM® ADAMTS-13 Antigen Control Set	2 x 0.5 mL

symbols key / Symbolschlüssel / interpretazione dei simboli / explicación de símbolos / explicação dos símbolos / clé des symboles / Symbolnyckel / symbolforklaring / Tegnforklaring / Κλειδί συμβόλων / Използвани символи / символы / Klíčova slova / Značenje simbola			
	manufacturer / Hersteller / fabbricante / fabricante / fabricant / Tillverkaren / Fabrikanten / Produzent / Κατασκευαστής / Производитель / Производител / výrobce / Proizvođač		expiry date / Verfallsdatum / data di scadenza / fecha de caducidad / data de validade / date d'expiration / utgångsdatum / udløbsdato / Utløpsdato / Ημερομηνία λήξης / срок на годност / datum expirace/ срок годности / datum expirace / Rok trajanja
	storage temperature / Lagertemperatur / temperatura di conservazione / temperatura de conservación / temperatura de conservação / température de stockage / lagringstemperatur / opbevaringstemperatur / Oppbevaringstemperatur / θερμοκρασία αποθήκευσης / хранение на / teplota skladování / температура хранения / teplota skladování / Temperatura lagerovanja		consult instructions for use / Gebrauchsanweisung beachten / consultare le istruzioni per l'uso / consulte las instrucciones de uso / consultar o manual de instruções / instruction d'utilisation / se användarinstruktioner / følg brugsvejledning / Følg brugsanvisningen / συμβουλευθείτε τις οδηγίες για τη χρήση / прочетете инструкцията за работа / potfeba řidit se instrukcemi / перед использованием читайте инструкцию / sledujte návod k použití / Pročitaj upustvo pre upotrebe
			determinations / Bestimmungen / determinazioni / determinaciones / determinações / détermination / déterminations / bestämningar / bestemmelse / Bestemmelse / προσδιορισμοί / брой тестове / stanovení / определний / роčet stanovení / Definicija
AQUA	distilled water / destilliertes Wasser / acqua distillata / agua destilada / água destilada / eau distillée / destillerat vatten / destilleret vand / Destillert vann / απεσταγμένο νερό / destilirana voda / destilovaná voda / дистиллированная вода / destilovaná voda / Destilana Voda	LOT	lot / Charge / lotto / lote / lote / lot / sats / serie / Parti / партиа номер / šarže / лот / šarže / Serija
BUF	Reaction buffer / Reaktionspuffer / tampone di reazione / tampón de reacció / Tampão de reação / tampon de réaction / Reaktionsbuffert / Reaktionsbuffer / Reaktionsbuffer / διάλυμα αντίδρασης / Реакционен буфер / Рабочий буферный раствор / Reakční pufr / Reakcioni pufer	MTP	microtiter plate / Mikrotiterplatte / placa microtiter / microplaca / microplaca / microplaques sensibilisées / Mikrotiterplatta / Mikrotiterplade / mikrotiterplate / πλάκα μικροτιτλοδότησης / Микротитърна плака / Микропланшет / Mikrotitrační destička / Mikrotitracione ploče
CAL	Calibrator / Kalibrator / Calibratore / calibrador / calibrador / Kalibrator / Kalibrator / Kalibrator / Βαθμονομητής / Калибратор / калибратор / kalibrátor / Kalibrátor	REF	catalogue number / Katalognummer / numero di catalogo / número de catálogo / número de referência / réf. de catalogue / katalognummer / Katalognummer / αριθμός καταλόγων / каталожен номер / katalogové číslo / каталожный номер / katalogové číslo / Kataloški broj
CONJ	Conjugate / Konjugat / Coniugato / conjugado / conjugado / conjugaté / Konjugerad / Konjugat / Konjugat / συνδεδεκό / Конюгат / Конъюгат / Konjugát / Konjugat	RTU	ready to use / gebrauchsfertig / pronto all'uso / listo para usar / pronto a usar / prêt à l'emploi / færdig att användas / færdig til brug / klar til bruk / έτοιμο προς χρήση / Готов за употреба / готов к использованию / k přímému použití / Razrediti ili rastvoriti
CONT	Control / Kontrolle / controllo / control / control / contrôle / Kontroll / Kontroll / Kontroll / διάλυμα ελέγχου / Контрол / Контрольный образец / Kontrola / Kontrola	STOP	stop solution / Stopplösung / Soluzione di arresto / solución de parada / solução de paragem / solution d'arrêt / Stoppløsning / Stop-opløsning / Stoppløsning / διάλυμα παύσης / Стоп раствор / Стоп-раствор / Zastavovací roztok / Stop solucija
DIL	dilute or dissolve in / verdünnen oder lösen in / diluire o dissolvere in / diluir o dissolver / diluir ou dissolver em / diluer ou dissoudre dans / spädd eller upplös i / fortyndes eller opløses i / Fortyndes eller oppløses i / αρωση ή διάλυση σε / растворяете или разредете с / zředit anebo rozpustit v / разбавить или растворить в / náfedte nebo rozpustite v / razrediti ili rastvoriti u	SUB	substrate / Substrat / substrato / substrato / substrato / substrat / Substrat / Substrat / Substrat / υπόστρωμα / Субстрат / Субстрат / Substrát / Substrat
INC	incubation buffer / Inkubationspuffer / tampone di incubazione / tampón de incubación / tampão de incubação / tampon d'incubation / Inkubationsbuffert / Inkubationsbuffer / Vaskebufferkonsentrat / διάλυμα επώασης / Инкубационен буфер / Буфер для инкубации / Inkubační pufr / Inkubacioni pufer	WASH	washing solution concentrate / Waschlösungskonzentrat / concentrado de solución de lavado / solución de lavado concentrada / tampão de lavagem concentrado / Tampon de lavage concentré / Vattenlösningsskoncentrat / Vaskeopløsningskoncentrat / vaskeløsningskoncentrat / συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσης / Концентриран миеш разтвор / Концентрат промывочного раствора / Koncentrát promývacieho roztoku / Koncentrat solucije za ispiranje
RUO	For Research Use Only		



PRODUCT DESCRIPTION

INTENDED USE

The TECHNOZYM® ADAMTS-13 Antigen ELISA is a chromogenic test for the determination of ADAMTS-13 antigen concentration in human plasma. ADAMTS-13 is the enzyme that cleaves vWF under laminar flow conditions. A functional defect of this enzyme leads to the presence of higher molecular weight forms of vWF and thus to increased platelet aggregation, mainly in the microvasculature. This is believed to be the major cause for thrombotic thrombocytopenic Purpura (TTP).

COMPOSITION

- ELISA test strips (12), with 8 wells each, coated with a monoclonal anti ADAMTS-13 antibody, directed against the CUB domain; the drying agent is supplied in an aluminium bag.
- Washing buffer concentrate (PBS; pH 7.3); containing detergent; 0.01% merthiolate; 1 vial, 80 mL.
- Incubation buffer (= sample dilution buffer) (PBS; pH 7.3); contains stabiliser protein; 0.05% proclin; and dye, 1 vial, 90 mL, ready for use.
- Calibrators (Standards) numbered from 1 to 5; lyophilised; 1 vial each; 0.5 mL. **Concentrations are lot-specific; consult the label on the vial.**
- High and Low control plasma; lyophilised; 1 vial each; 0.5 mL. **Concentrations are lot-specific; consult the label on the vial.**
- Conjugate: anti-ADAMTS-13 POX; dyed blue; 1 vial, 0.3 mL.
- Chromogenic substrate TMB (tetramethylbenzidine); 1 vial; 12 mL; ready to use.
- Stopping solution sulphuric acid 0.45 mol/L; 1 vial; 12 mL; ready to use.
- Adhesive film: for ELISA test strips; 2 pieces.

MATERIAL REQUIRED (not supplied with the kit)

- Distilled water
- Measuring cylinder (1000 mL)
- Precision pipettes (50, 100 and 1000 µL)
- Variable pipette (100 and 1000 µL)
- Multichannel and/or dispensing pipettes (100 and 200 µL)
- ELISA washer or multichannel pipette
- ELISA reader with 450 nm filter, with a 620 nm reference filter if available.

WARNING AND PRECAUTIONS

- For research use only
- All human blood or plasma products as well as samples must be considered as potentially infectious. They have to be handled with appropriate care and in strict observance of safety regulations. The rules pertaining to disposal are the same as applied to disposing hospital waste.
- Calibrators and control plasmas are made from human blood and any individual plasma involved in the procedure is HBsAg, HIV 1/2 Ab and HCV-Ab-negative (see labels on the vials). However, all human blood products should be handled as potentially infectious material.
- Stopping solution may irritate the skin. Should acid get into your eyes, wash out immediately with water and consult a doctor.
- The reagents sometimes contain preserving agents (merthiolate). Beware of swallowing! Avoid contact with skin or mucous membranes!

STABILITY AND STORAGE

The expiry date printed on the labels applies to storage of the unopened vial at +2...8°C.

Stability after reconstitution/opening:

Material/Reagent	State	Storage	Stability
Calibrators, control plasmas	after reconstitution	-20 °C	6 months
ELISA test strip	after opening	+2...8 °C with adhesive film in plastic bag with drying agent	expiry date
Washing buffer conc.	after opening	+2...8°C	6 months
Washing buffer	1+11.5 dilution of concentrate	+2...8°C	3 weeks
Incubation buffer (= sample dilution buffer)	after opening	+2...8°C	2 months
Conjugate	after opening	+2...8°C	6 months
	working solution	room temperature (+18...25°C)	60 minutes
Chromogenic substrate TMB	after opening	+2...8°C	expiry date

TEST PROCEDURE

PREPARATION OF THE SAMPLES

Sample material: Human citrated plasma. Samples may be stored for three hours at room temperature. At -20°C they can be stored for several months. Samples may not be frozen and thawed several times.

PREPARATION OF REAGENT

- Before starting the test, all the required components are to be brought to room temperature.
- Preparing the washing buffer: Dilute 1 part by volume washing buffer concentrate with 11.5 parts by volume distilled water (1+11.5). Mix well! (Diluted washing buffer concentrate = washing buffer). There may be crystalline precipitations which will dissolve at +37°C within 10 minutes.
- Reconstituting calibrators and control plasmas: Calibrators and control plasmas are reconstituted with 500 µL distilled water and mixed for 10 seconds after a reconstitution time of 15 minutes (vortex mixer).
Reconstituted components are clear to slightly turbid.
No dilution is necessary for calibrators and controls!
- Samples are used undiluted
- Preparing the conjugate working solution (1+50): Dilute 1 part by volume conjugate with 50 parts by volume incubation buffer.

PERFORMANCE OF THE TEST

SAMPLE INCUBATION (reference 1,2)	Pipette calibrators, control plasmas, samples into test wells; cover test strips with film	50 µL
	Incubate at room temperature	120 minutes
WASHING (reference 1,3,4)	Washing buffer	4 x 250 µL
	Incubate at room temperature	60 minutes
CONJUGATE REACTION (reference 1,2)	Pipette conjugate working solution into wells, cover test strip with film	50 µL
	Incubate at room temperature	60 minutes
WASHING (reference 1,3,4)	Washing buffer	4 x 250 µL
	Pipette Substrate solution into test wells, cover test strip with film	50 µL
SUBSTRATE REACTION (reference 1,2)	Incubate at room temperature	15 minutes
	Pipette stopping solution into wells	50 µL
MEASURING (reference 5)	ELISA-Reader, 450 nm	shake 10 sec., measure within 10 min.

References

- Reagents of different lots must not be combined
- Precision and performance, among others, essentially depend on the following factors:
 - Thorough mixing of all substances used for dilution, 10 sec. with Vortex Mixer
 - Test calibrators, controls and samples in duplicates
 - Incubate at indicated temperature (RT: room temperature, +18...25°C)
 - Strict observance of the order of pipetting and of the time element as indicated
 - The time for sample incubation, conjugate and substrate reaction as indicated starts after pipetting the last sample. Incubation times shall not vary by more than ± 5%.
 - During sample incubation and conjugate reaction, the time for pipetting calibrators/control plasmas/samples and/or conjugate solutions must not exceed 60 seconds per ELISA test strip (8 wells).
 - During substrate reaction and at stopping, the time needed for pipetting the substrate and/or the stopping solution must not exceed 10 seconds per ELISA test strip. Short pipetting times may be secured by using multichannel- and dispensing pipettes.
- Label/number strips with a water resistant pen in case the strips accidentally fall out of the frame during testing.
- After the last washing, wells must be aspirated thoroughly, turned upside down and positioned on a blotting paper, by gentle tapping, the last remnants must be removed.
- By measuring the difference in wave lengths at 450 and 620 nm the precision of the test is increased.
- A calibration curve has to be created for every assay

LIMITATION OF THE TEST

It can not be excluded that certain forms of ADAMTS-13 (with mutations in the CUB domains) are not equivalently measured due to reduced binding to the capture antibody on the plate. Thrombin is reported to degrade ADAMTS-13. Therefore serum samples should be avoided.

ANALYSES RESULTS

CALCULATION OF THE RESULTS

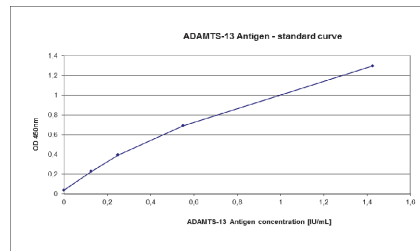
Setting up a reference curve: X axis: concentration ADAMTS-13 antigen [IU/mL]
Y axis: Extinction at 450 nm

Graph plot is linear-linear with a best fit.

Assessment of reference curve

The validity of the test may be checked on the basis of the calculated control values.

Example of standard curve



Measuring concentration of samples

- Read off the concentration from the reference curve.
- If there are samples with extinction coefficients higher than that of the highest point on the curve, they have to be pre-diluted with incubation buffer (1+1, or 1+3). The measured concentration then has to be multiplied with the dilution factor 2 or 4, respectively.

INTERPRETATION OF RESULTS / REFERENCE RANGE

Normal range for ADAMTS-13 Antigen concentration: 0.41 – 1.41 IU/mL (n=188).
Normal range can vary depending on local population. It is recommended that individual laboratories establish their own normal. When interpreting the serological results the history of the patient has to be taken into account.

STANDARDISATION

Standards and controls are produced from a pool of normal donor plasma and calibrated against the WHO International Standard for ADAMTS-13.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Performance data are given below. Results obtained in individual laboratories may differ.

PRECISION

Reproducibility was determined with different samples (in series and day to day). The following results were obtained.

Sample	Intra assay variation		Inter assay variation	
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
N	10	10	3	3
Mean (IU/mL)	0.55	0.11	0.49	0.10
SD IU/mL)	0.04	0.01	0.05	0.01
CV (%)	6.36	5.71	9.97	6.62

ASSAY RANGE

0 IU/mL – 1.0 IU/mL

DETECTION LIMIT

0.012 IU/mL

(or up to the actual value of calibrator 1)

CORRELATION

Correlation with antigen in TECHNOZYM®ADAMTS-13 fluorogenic method is r²= 0.9 for normal samples and r²=0.91 for TTP samples.

LITERATURE

Please contact Technoclone or your local distributor.

For 8 test wells:
Mix 10 µL conjugate with 500 µL incubation (= sample dilution) buffer

PRODUKTBESCHREIBUNG

ANWENDUNG

Der TECHNOZYM® ADAMTS-13 ELISA ist ein chromogener Test zur Bestimmung der ADAMTS-13 Antigenkonzentration in humanem Plasma. ADAMTS-13 ist das Enzym, das in Gegenwart von Scherkräften für die Spaltung von vWF verantwortlich ist. Ein funktionaler Defekt dieses Enzyms führt zu ungewöhnlich großen vWF Molekülen und dadurch zu erhöhter Plättchenaggregation, hauptsächlich in der Mikrovaskulatur. Dieser Vorgang wird als Hauptsache der thrombotischen thrombozytopenischen Purpura (TTP) angesehen.

ZUSAMMENSETZUNG

- ELISA-Teststreifen (12): mit jeweils 8 Testvertiefungen; beschichtet mit monoklonalem anti ADAMTS-13 Antikörper, der gegen die CUB Domäne gerichtet ist; mit Trocknungsmittel im Aluminiumbeutel verpackt.
- Waschpufferkonzentrat: (PBS; pH 7,3); detergentshaltig; 0,01% Merthiolat; 1 Fl.; 80 mL.
- Inkubationspuffer (=Probenverdünnungspuffer): (PBS; pH 7,3); enthält Stabilisatorprotein; 0,05% Proclin; und Farbstoff; 1 Fl.; 90 mL; gebrauchsfertig
- Kalibratoren (Standards): nummeriert von 1-5; lyophilisiert; je eine Fl.; 0,5 mL.
Die chargenabhängigen Konzentrationen entnehmen Sie bitte den Flaschenetiketten!
- Positive und negative Kontrollplasmen, lyophilisiert; je eine Fl.; 0,5mL.
Die chargenabhängigen Konzentrationen entnehmen Sie bitte den Flaschenetiketten!
- Konjugat: anti-ADAMTS-13 POX; blaugefärbt; 1 Fl.; 0,3 mL
- Chromogenes Substrat: TMB (Tetramethylbenzidin) 1 Fl., 12 mL, gebrauchsfertig
- Stopplösung: Schwefelsäure 0,45 mol/L; 1 Fl.; 12 mL, gebrauchsfertig
- Ablebefolien: für ELISA-Teststreifen; 2 Stk.

BENÖTIGTES MATERIAL (nicht im Kit enthalten)

- Aqua dest.
- Messzylinder (1000 mL)
- Präzisionspipetten (50, 100 und 1000 µL)
- Variable Pipette (100 und 1000 µL)
- Mehrkanal- bzw. Dispensierpipetten (100 und 200 µL)
- ELISA-Waschgerät oder Mehrkanalpipette
- ELISA-Reader mit 450 nm Filter und 620 nm Referenzfilter falls verfügbar.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur für Forschungszwecke
- Alle humanen Blut- bzw. Plasmaprodukte und Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden. Sie sind mit der notwendigen Sorgfalt und entsprechend den Sicherheitsvorschriften zu behandeln und wie Krankenhausmüll zu entsorgen.
- Obwohl alle Kalibratoren und Kontrollen, hergestellt aus humanem Blut, und alle hierzu verwendete Einzelplasmen HbsAg, HIV 1/2 Ak und HCV-Ak negativ (siehe Flaschenetikett) sind, müssen sie als potentiell infektiös betrachtet werden.
- Stopplösung kann zu Reizungen der Haut führen. Sollte Säure in die Augen gelangen, sofort mit viel Wasser auswaschen und einen Arzt aufsuchen!
- Die Reagenzien enthalten teilweise Konservierungsmittel (Merthiolat). Nicht schlucken! Haut- oder Schleimhautkontakt vermeiden!

LAGERUNG UND STABILITÄT

Die Reagenzien sind ungeöffnet bei +2...8°C zu lagern und bis zu dem auf den Etiketten angegebenen Datum verwendbar.

Stabilität nach Rekonstitution/nach Öffnen:

Material/Reagenz	Zustand	Lagerung	Stabilität
Kalibratoren, Kontrollplasmen	nach Rekonstitution	-20 °C	6 Monate
ELISA-Teststreifen	nach Öffnen	+2...8°C mit Abklebefolie in Alubeutel mit Trockenmittel	Verfallsdatum
Waschpufferkonzentrat	nach Öffnen	+2...8°C	6 Monate
Waschpuffer	1+11,5 Verdünnung des Konzentrats	+2...8°C	3 Wochen
Inkubationspuffer (=Probenverdünnungspuffer)	nach Öffnen	+2...8°C	2 Monate
Konjugat	nach Öffnen	+2...8°C	6 Monate
	Gebrauchslösung	Raumtemperatur (+18...25°C)	60 Minuten
Chromogenes Substrat TMB	nach Öffnen	+2...8°C	Verfallsdatum

TESTDURCHFÜHRUNG

VORBEREITUNG DER PROBEN

Probenmaterial: Humanes Citratplasma. Proben können bis zu 3 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Bei -20°C können sie mehrere Monate aufbewahrt werden. Proben dürfen nicht mehrfach eingefroren und wieder aufgetaut werden.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Vor Testbeginn alle benötigten Testkomponenten auf Raumtemperatur bringen.
- Herstellen des Waschpuffers: 1 Volumenteil Waschpufferkonzentrat mit 11,5 Volumenteilen Aqua dest. Verdünnen (1+11,5). Gut mischen! (Verdünntes Waschpufferkonzentrat = Waschpuffer). Eventuelle kristalline Niederschläge gehen bei +37°C innerhalb von 10 min in Lösung.
- Rekonstituieren der Kalibratoren und Kontrollplasmen: Die Kalibratoren und Kontrollplasmen werden mit 500 µL Aqua dest. rekonstituiert und nach einer Rekonstitutionszeit von 15 min, 10 Sekunden gemischt (Probenmischer). Rekonstituierte Komponenten sind klar bis leicht trüb.
Kalibratoren und Kontrollen werden nicht verdünnt!
- Proben werden nicht verdünnt.
- Herstellen der Konjugatgebrauchslösung (1+50): 1 Volumenteil Konjugat mit 50 Volumenteilen Inkubationspuffer verdünnen.

Für 8 Testvertiefungen: 10 µL Konjugat mit 500 µL Inkubationspuffer (=Probenverdünnungspuffer) mischen.

TESTVERFAHREN

PROBEN-INKUBATION (Hinweise 1,2)	Kalibratoren, Kontrollplasmen, Proben in Testvertiefung pipettieren. Teststreifen mit Folie abdecken	50 µL
WASCHEN (Hinweise 1,3,4)	Bei Raumtemperatur inkubieren	120 Minuten
	Waschpuffer	4 x 250 µL
KONJUGAT-REAKTION (Hinweise 1,2)	Konjugatgebrauchslösung in Testvertiefung pipettieren. Teststreifen mit Folie abdecken	50 µL
WASCHEN (Hinweise 1,3,4)	Bei Raumtemperatur inkubieren	60 Minuten
	Waschpuffer	4 x 250 µL
SUBSTRAT-REAKTION (Hinweis 1,2)	Substratlösung in Testvertiefungen pipettieren; Teststreifen mit frischer Folie abdecken	50 µL
STOPPEN (Hinweis 1,2)	Bei Raumtemperatur inkubieren	15 Minuten
	Stopplösung in Testvertiefungen pipettieren	50 µL
MESSEN (Hinweis 5)	ELISA-Reader, 450nm	10 Sek. schütteln, Messung innerhalb von 10 Min.

HINWEISE

- Reagenzien verschiedener Chargen dürfen nicht kombiniert werden.
- Präzision und Wiederfindung hängen u.a. von folgenden Faktoren entscheidend ab:
 - Gute Durchmischung aller Verdünnungsansätze, 10 Sek. auf Probemischer
 - Durchführung von Doppelbestimmungen
 - Inkubation bei der korrekten Temperatur (RT: Raumtemperatur; +18...25°C) Vertiefungen nicht überschreiten.
 - Genaue Einhaltung von Pipettierreihenfolge und Zeitakt.
 - Die angegebene Zeit für die Probeninkubation, Konjugat- und Substratreaktion wird nach der Pipettierung der letzten Probe genommen. Inkubationszeiten sollen um nicht mehr als ± 5% variiert werden.
 - Bei der Probeninkubation und Konjugatreaktion darf die Zeit für die Pipettierung der Kalibratoren/Kontrollplasmen/Proben bzw. Konjugatlösung 60 Sek. pro ELISA-Teststreifen (8 Vertiefungen) nicht überschreiten.
 - Bei der Substratreaktion und beim Stoppen darf die Pipettierzeit der Substrat- bzw. Stopplösung 10 Sek. pro ELISA-Teststreifen nicht überschreiten. Kurze Pipettierzeiten werden durch Verwendung von Mehrkanal- bzw. Dispensierpipetten erreicht.
- Teststreifen mit wasserfestem Stift markieren, falls sie während des Testes versehentlich aus der Halterung fallen sollten.
- Nach dem letzten Waschvorgang müssen die Testvertiefungen leer gesaugt und auf saugfähigem Papier ausgeklippt werden.
- Durch Differenzwellenlängenmessung bei 450 nm und 620 nm wird die Präzision des Tests erhöht.
- Für jeden Test muss eine neue Standardkurve erstellt werden.

TESTEINSCHRÄNKUNGEN

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass manche Formen von ADAMTS-13 (mit Mutationen in den CUB-Domänen) eine geringere Affinität zu dem Bindungsantikörper auf der Platte besitzen und daher deren Konzentration nicht absolut vollständig bestimmt werden kann. ADAMTS-13 kann durch Thrombin gespalten werden, daher sollten Serumproben vermieden werden.

ANALYSENERGEBNISSE

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

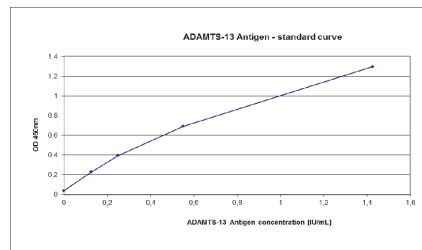
Erstellung der Bezugskurve: x-Achse: ADAMTS-13 Antigenkonzentration [IU/mL]
y-Achse: Extinktion bei 450 nm

Bezugskurve ist linear-linear mit best fit.

Beurteilung der Bezugskurve:

Die Auswertbarkeit des Tests kann anhand der ermittelten Kontrollwerte überprüft werden

Beispiel einer Standardkurve:



Konzentrationsbestimmung der Proben:

- Konzentrationen der Proben an der Bezugskurve ablesen
- Sollte der Extinktionswert einer Probe höher als der des höchsten Standards liegen, so muss die Probe mit Inkubationspuffer verdünnt werden (1+1 oder 1+3). Die ermittelte Konzentration wird in diesem Fall mit dem Verdünnungsfaktor 2 bzw. 4 multipliziert.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE/REFERENZBEREICH

Normalbereich für ADAMTS-13 Antigen Konzentration: 0,41 – 1,41 IU/mL (n=188)
Der Normalbereich kann in Abhängigkeit von der lokalen Bevölkerung variieren. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Normalbereich bestimmt. Die Beurteilung und Interpretation der serologischen Ergebnisse darf nur durch entsprechendes Fachpersonal erfolgen. Dabei muss die Patientenanamnese berücksichtigt werden.

STANDARDISIERUNG

Standards und Kontrollen werden aus einem Plasmapool von Normalspendern produziert und gegen den aktuellen WHO Internationalen Standard für ADAMTS-13 kalibriert.

PRÄZISION

Die Reproduzierbarkeit wurde mit verschiedenen Probenbestimmt (in Serie und von Tag zu Tag). Die Ergebnisse sind wie folgt:

Probe	Intra assay		Inter assay	
	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
N	10	10	3	3
Mean (IU/ml)	0,55	0,11	0,49	0,10
SD (IU/ml)	0,04	0,01	0,05	0,01
CV (%)	6,36	5,71	9,97	6,62

MESSBEREICH

0 IU/mL – 1,0 IU/ml
(oder bis aktuellen Wert des Kalibrators 1)

BESTIMMUNGSGRENZE

0,012 IU/ml

KORRELATION

Die Korrelation mit der Antigenbestimmung im TECHNOZYM® ADAMTS-13 fluorogenen assay ist für Normalplasmen R²=0,9 und für TTP Plasmen R²=0,91.

LITERATUR

Bitte wenden Sie sich an Technoclone oder an Ihren Händler.

DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

INDICAZIONI D'USO

Il TECHNOZYM® ADAMTS-13 Antigen ELISA è un test cromogenico per la determinazione della concentrazione dell'antigene di ADAMTS-13 nel plasma umano. ADAMTS-13 è l'enzima responsabile del clivaggio del vWF in condizioni di flusso laminare. Un difetto funzionale di tale enzima porta alla presenza di forme ad elevato peso molecolare di vWF e in conseguenza ad una maggiore aggregazione piastrinica, principalmente nel microcircolo. Questa è ritenuta essere la maggiore causa di TTP (Porpora trombocitica trombocitopenica).

COMPOSIZIONE

- ELISA test strips (12), con 8 pozzetti ciascuna, rivestite con Ab monoclonali anti ADAMTS-13, diretti verso il dominio CUB; contenute in busta di alluminio con dissecante.
- Washing buffer concentrato (PBS; pH 7,3); contiene detergenti; 0,01% merthiolate; 1 fiala, 80 mL.
- Incubation buffer (= tampone per diluire anche i campioni) (PBS; pH 7,3); contiene proteina stabilizzante; 0,05% proclina; colorante, 1 fiala, 90 mL, pronto uso.
- Calibratori (Standards) numerate da 1 a 5; liofilizzati; 1 fiala ciascuno; 0,5 mL. **Concentrazioni lotto-specifiche; consultare l'etichetta sulla fiala di ciascun calibratore.**
- plasma di controllo alto e basso; liofilizzato; 1 fiala ciascuno; 0,5 mL. **Concentrazioni lotto-specifiche; consultare l'etichetta sulla fiala di ciascun controllo**
- Coniugato: anti-ADAMTS-13 POX; dyed blue; 1 fiala, 0,3 mL.
- substrato cromogenico TMB (tetramethylbenzidine); 1 fiala; 12 mL; pronto uso.
- Stopping solution Acido Solforico 0,45 mol/L; 1 fiala; 12 mL; pronto uso.
- pellicola adesiva per strip ELISA; 2 fogli

MATERIALI NECESSARI NON FORNITI CON IL KIT

- acqua distillata
- cilindro graduato (1000 mL)
- pipette graduate (50, 100 and 1000 µL)
- pipette variabili (100 and 1000 µL)
- pipette multicanale o multidispensazione (100 and 200 µL)
- lavatore ELISA o pipetta multicanale
- lettore ELISA con filtri a 450 nm e filtro di riferimento disponibile a 620 nm

ATTENZIONI E PRECAUZIONI

- Tutti i prodotti del sangue o del plasma così come tutti i campioni devono essere considerati
- Come potenzialmente infetti. Devono essere maneggiati con particolare attenzione e in stretta osservanza delle regole di sicurezza. Le regole riguardanti l'eliminazione sono le stesse applicate allo smaltimento riguardante gli ospedali.
- I calibratori e i plasmidi controllo sono prodotti a partire da sangue umano e ogni plasma è stato testato e trovato negativo per gli anticorpi per l'HIV 1/2, HBs Ag e HVC (guardare l'etichetta sulle vials). Comunque tutti i prodotti derivati da sangue umano dovrebbero essere maneggiati con cura come se fossero materiale potenzialmente infetto.
- La Stopping Solution (acido solforico) potrebbe essere irritante per la pelle. Se l'acido viene a contatto con gli occhi, risciacquare immediatamente e consultare un dottore.
- Qualche volta i reagenti contengono composti conservanti (merthiolato). Stare attenti a non ingerire! Evitare il contatto con la pelle o le membrane mucose.

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

La data di scadenza riportata sull'etichetta è relativa alla conservazione della vial non aperta a +2...8°C. La stabilità dopo ricostituzione/apertura:

Material/Reagent	State	Storage	Stability
Calibratori, plasmidi di controllo	dopo ricostituzione	-20 °C	6 mesi
ELISA test strip	dopo apertura	+2...8°C with adhesive film in plastic bag with drying agent	data di scadenza
Washing buffer conc.	dopo apertura	+2...8°C	6 mesi
Washing buffer	1+11.5 diluizione concentrato	+2...8°C	3 settimane
Incubation buffer (= tampone diluizione campioni)	dopo apertura	+2...8°C	2 mesi
	dopo apertura	+2...8°C	6 mesi
Coniugato	working solution	room temperature (+18...25°C)	60 minuti
	substrato cromogenico TMB	dopo apertura	+2...8°C

PROCEDURA DEL TEST

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Tipo di Campione: Plasma umano citrato. I campioni dopo prelievo possono essere conservati fino a 3 ore a T° Ambiente. A -20°C possono essere conservati per vari mesi. Evitare cicli di congelamento e scongelamento ripetuti.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- Portare tutti i reattivi a T° ambiente prima dell'uso.
- Preparazione del washing buffer: Diluire 1 parte del washing buffer concentrato con 11.5 parti di acqua distillata (1+11.5). Agitare bene! Eventuali cristalli precipitate si sciolgono ponendo la soluzione diluita a +37°C per 10 minuti.
- Ricostituzione di calibratori e plasmidi di controllo: Calibratori e plasmidi di controllo vanno ricostituiti con 500 µL di acqua distillata e agitati al vortex per 15 minuti, agitare poi per altri 10 secondi dopo ricostituzione. I component ricostituiti possono essere trasparenti o leggermente torbidi. **Calibratori e controlli non vanno diluiti!**
- I campioni non vanno diluiti
- Preparazione del coniugato alla diluizione di lavoro (1+50): Diluire 1 parte di coniugato con 50 parti di incubation buffer.

per 8 test (pozzetti) :
Miscelare 10 µL di coniugato con 500 µL di incubation buffer

SCHEMA DEL SAGGIO

INCUBAZIONE CAMP (rif. 1,2)	dispensare calibratori, controlli al plasma, campioni nei pozzetti; coprire le strip	50 µL
	Incubare a T° ambiente	120 minuti
LAVAGGI (rif. 1,3,4)	Washing buffer	4 x 250 µL
REAZIONE CONIUGATO (rif 1,2)	dispensare il coniugato nei pozzetti e coprire le strip	50 µL
	Incubare a T° ambiente	60 minuti
LAVAGGI (rif. 1,3,4)	Washing buffer	4 x 250 µL
SUBSTRATO (rif 1,2)	dispensare il Substrato nei pozzetti e coprire le strip	50 µL
	Incubare a T° ambiente	15 minuti
STOP (rif 1,2)	dispensare la soluzione di stop nei pozzetti	50 µL
LETTURA (rif 5)	ELISA-lettore, 450 nm	agitare 10 sec., misurare entro 10 min.

Riferimenti

- non mescolare reagenti di lotti diversi
- Precisione e performance, tra le varie cose, dipendono essenzialmente da questi fattori:
 - miscelare tutte le componenti usate per la diluizione 10 secondi con il Vortex Mixer.
 - utilizzare i calibratori, i controlli e i campioni in duplicato
 - incubare alla temperatura indicata (RT: temperatura ambiente, +18...25°C).
 - Osservare rigorosamente l'ordine di dispensazione dei vari reagenti e i tempi come indicato
 - Il tempo di incubazione di coniugato, substrato e campioni inizia dopo dispensazione dell'ultimo campione. I tempi di incubazione non dovrebbero variare di +/- 5%.
 - Durante la dispensazione dei campioni e del coniugato, il tempo di dispensazione dei calibratori/controlli, campioni e / o coniugato non dovrebbe eccedere i 60 secondi per strip (8 pozzetti)
 - Durante la reazione del substrato e della soluzione di stop, il tempo per la dispensazione non dovrebbe eccedere i 10 secondi per strip ELISA. Si possono abbreviare i tempi di dispensazione con l'uso di una multicanale
- contrassegnare con una penna indelebile ogni strip in caso di caduta accidentale dal telaio di plastica.
- Dopo l'ultimo lavaggio i pozzetti devono essere completamente aspirati, capovolti e posti su carta assorbente, rimuovendo le gocce rimanenti colpendo delicatamente sugli stessi
- La precisione del test è aumentata se si calcola la differenza tra la lettura a lunghezza d'onda 450 nm e quella a 620 nm.
- determinare la curva di calibrazione per ogni test

LIMITI DEL TEST

Non è escludibile che alcune forme di ADAMTS-13 (con mutazioni nel dominio CUB) siano equivalentemente misurabili, a seguito della riduzione del legame all'anticorpo di cattura nella piastra. È riportato in letteratura che la Trombina degrada ADAMTS13. Pertanto di dovrebbero evitare campioni di siero.

ANALISI DEI RISULTATI

CALCOLO DEI RISULTATI

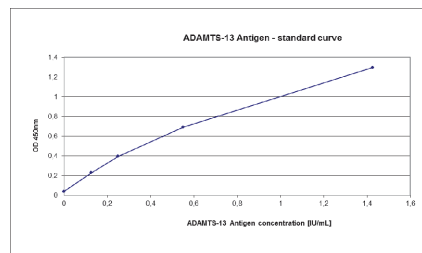
Costruzione della curva: X axis: concentrazione ADAMTS-13 antigene [IU/mL]
 Y axis: densità ottica a 450 nm

Pore in grafico lineare-lineare con migliore adeguamento.

Calcolo della curva standard

La validità del saggio dovrebbe essere controllata sulla base dei valori ottenuti con i controlli.

Esempio di curva standard



Misurazione della concentrazione dei campioni

- Calcolare le concentrazioni della curva standard.
- Se ci sono campioni con coefficiente d'estinzione più alto di quello del punto più alto della curva, questi devono essere prediluiti con il Buffer di incubazione (1+1 o 1+3). La misura delle concentrazioni poi deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione 2 o 4 rispettivamente.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI / INTERVALLO DI

RIFERIMENTO

Intervallo di normalità per la concentrazione dell'antigene di ADAMTS-13: 0.41 – 1.41 IU/mL (n=188)

L'intervallo di normalità può cambiare a seconda della popolazione locale. Si raccomanda a ciascun laboratorio di determinare i propri valori di normalità. Nell'interpretazione dei dati di tale dosaggio va tenuta in considerazione tutta la storia clinica del paziente.

STANDARDIZZAZIONE

Standards e controlli sono prodotti da un pool di plasma normale donato e calibrati verso lo standard internazionale WHO per ADAMTS-13.

PARAMETRI DI RIFERIMENTO

Performance riportate di seguito. I risultati possono differire tra laboratori.

PRECISIONE

La riproducibilità è stata misurata su diversi campioni (in serie e giornalieri).

campioni	variazione Intra assay		variazione Inter assay	
	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4
N	10	10	3	3
Media (IU/mL)	0.55	0.11	0.49	0.10
SD IU/mL)	0.04	0.01	0.05	0.01
CV (%)	6.36	5.71	9.97	6.62

INTERVALLO DEL TEST

0IU/mL – 1.0 IU/mL
 (o fino all'attuale valore del calibratore 1)

LIMITI DI RILEVAZIONE

0,012 IU/mL

CORRELAZIONE

Correlazione con il test fluorogenico TECHNOZYM® ADAMTS-13 è r²= 0.9 per campioni normali e r²=0.91 per campioni con TTP

LETTERATURA

Si prega di contattare la Technoclone oppure il Vostro distributore

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

UTILIZAÇÃO

O TECHNOZYM® ADAMTS-13 Antigen ELISA é um ensaio cromogénico para a determinação da concentração do antígeno de ADAMTS 13 no plasma humano. A ADAMTS-13 é a enzima que cliva o vWF sob condições de fluxo laminar. Um defeito funcional desta enzima conduz à presença de formas de peso molecular mais elevado do vWF e, deste modo, um aumento da agregação plaquetária, principalmente na microvasculatura. Acredita-se que esta é a causa principal para a púrpura trombocitopénica trombótica (TTP).

COMPOSIÇÃO

- Tiras teste de ELISA (12), com 8 poços cada, revestidas com um anticorpo monoclonal anti ADAMTS-13, direcionada contra o domínio CUB. O agente secante é fornecido num saco de alumínio.
- Tampão de lavagem concentrado (PBS; pH 7,3); contém detergente; 0,01% mertiolato; 1 frasco, 80 mL.
- Tampão de incubação (= tampão de diluição da amostra) (PBS; pH 7,3); contém estabilizador de proteína; 0,05% proclina e corante, 1 frasco, 90 mL, pronto a usar.
- Calibradores (Padrões) numerados de 1 a 5; liofilizados; 1 frasco cada; 0,5 mL. **As concentrações são específicas de lote; consulte o rótulo no frasco.**
- Plasmas de controlo alto e baixo, liofilizados, 1 frasco cada, 0,5 mL. **As concentrações são específicas de lote; consulte o rótulo no frasco.**
- Conjugado: anti-ADAMTS-13 POX; corado de azul; 1 frasco, 0,3 mL.
- Substrato cromogénico TMB (Tetrametilbenzidina); 1 frasco; 12 mL; pronto a usar.
- Solução de paragem; ácido sulfúrico 0,45 mol/L, 1 frasco, 12 mL; pronto a usar.
- Filme adesivo: para tiras de teste ELISA, 2 unidades.

MATERIAL NECESSÁRIO (não fornecido com o kit)

- Água destilada
- Proveta (1000 mL)
- Pipetas de precisão (50, 100 e 1000 µL)
- Pipeta variável (100 e 1000 µL)
- Pipetas de dispensa e/ou Multicanal (100 e 200 µL)
- Lavadora de placas de ELISA ou pipeta Multicanal
- Leitor de ELISA com filtro de 450 nm, e com um filtro de referência de 620 nm se possível.

AVISOS E PRECAUÇÕES

- Para uso em Investigação
- Todos os produtos provenientes de sangue humano ou plasma, bem como as amostras devem ser considerados potencialmente infecciosos. Devem ser manuseados com especial atenção e com rigorosa observância das regras de segurança. Os requisitos para eliminação de desperdícios são os mesmos que os aplicados para a eliminação de lixo hospitalar.
- Os controlos e calibradores são feitos a partir de sangue humano e qualquer plasma individual envolvido no processo é negativo para AgHbs, Anticorpo anti-HIV 1/2 e Anticorpo anti - HCV (veja rótulos nos frascos). No entanto, todos os produtos provenientes de sangue humano devem ser manuseados como material potencialmente infeccioso.
- A solução de paragem pode irritar a pele. Se o ácido entrar em contacto com os olhos, deverá lavá-los imediatamente com água e deverá consultar um médico.
- Por vezes, os reagentes contêm agentes conservantes (mertiolato). Não ingerir! Evite contacto com a pele ou membranas mucosas.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

A data de validade impressa nos rótulos aplica-se aos frascos por abrir e armazenados entre +2...8°C.

Estabilidade após reconstituição/abertura:

Material/Reagente	Estado	Armazenamento	Estabilidade
Calibradores, plasmas controlo	Após reconstituição	-20 °C	6 meses
Tiras de teste ELISA	Após abertura	+2...8°C com o filme adesivo no invólucro plástico com agente dessecante	Data de validade
Tampão lavagem conc.	Após abertura	+2...8°C	6 meses
Tampão lavagem	1+11.5 diluição do concentrado	+2...8°C	3 semanas
Tampão de incubação (= tampão de diluição amostra)	Após abertura	+2...8°C	2 meses
Conjugado	Após abertura	+2...8°C	6 meses
	Solução trabalho	Temperatura ambiente (+18...25°C)	60 minutos
TMB Substrato Cromogénico	Após abertura	+2...8°C	Data de validade

PROCEDIMENTO DO TESTE

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Material de amostra: plasma humano colhido com citrato de sódio. As amostras podem ser armazenadas à temperatura ambiente, até três horas. As amostras podem ser armazenadas a -20°C durante vários meses. As amostras não devem ser congeladas e descongeladas várias vezes.

PREPARAÇÃO DE REAGENTE

- Antes de começar o teste, todos os componentes necessários devem estar à temperatura ambiente.
- Preparação do tampão de lavagem: Dilua 1 parte da solução de lavagem concentrada com 11.5 partes de água destilada (1+11.5). Misture bem! (Tampão de lavagem concentrado após diluição = tampão de lavagem). Pode haver precipitações cristalinas que se dissolverão a +37°C em 10 minutos.
- Reconstituição dos calibradores e plasmas de controlo: Os calibradores e plasmas de controlo são reconstituídos com 500 µL de água destilada e agitados durante 10 segundos após um tempo de reconstituição de 15 minutos (agitador vortex). Os componentes reconstituídos apresentam-se claros a ligeiramente turvos. **Não é necessária diluição para os controlos e calibradores.**
- As amostras são usadas não diluídas.
- Preparação da solução de trabalho do conjugado (1+50): Dilua 1 parte de conjugado com 50 partes de tampão de incubação

Para 8 poços de teste:

Misture 10 µL conjugado com 500 µL tampão de incubação (=diluição conjugado)

EXECUÇÃO DO TESTE

INCUBAÇÃO DA AMOSTRA (referência 1,2)	Pipete os calibradores, plasmas de controlo e amostras para os poços teste; cubra das tiras com filme. Incube à temperatura ambiente	50 µL 120 minutos
LAVAGEM (referência 1,3,4)	Tampão de lavagem	4 x 250 µL
REAÇÃO DO CONJUGADO (referência 1,2)	Pipete a solução de trabalho de conjugado para os poços teste; cubra das tiras com filme. Incube à temperatura ambiente	50 µL 60 minutos
LAVAGEM (referência 1,3,4)	Tampão de lavagem	4 x 250 µL
REAÇÃO DO SUBSTRATO (referência 1,2)	Pipete a solução de Substrato para os poços teste; cubra das tiras com filme. Incube à temperatura ambiente	50 µL 15 minutos
PARAGEM (referência 1,2)	Pipete a solução de paragem para os poços teste	50 µL
LEITURA (referência 5)	Leitor de ELISA, 450 nm	agitar 10 sec., medir em 10 min.

Referências

- Não devem ser combinados reagentes de lotes diferentes
- A precisão e o desempenho, entre outros, dependem essencialmente dos seguintes factores:
 - Agitação cuidadosa de todas as substâncias usadas para diluição, 10 segundos no agitador Vortex.
 - Teste os calibradores, controlos e amostras em duplicado.
 - Incubação à temperatura indicada (TA: temperatura ambiente, +18...25°C)
 - Cumprimento rigoroso da ordem de pipetagem e do tempo tal como indicado
 - O tempo para a incubação de amostra, para a reacção do conjugado e do substrato, tal como indicado, começa após a pipetagem da última amostra. Os tempos de incubação não devem variar mais do que ± 5%.
 - Durante a incubação de amostra e a reacção do conjugado, o tempo para pipetar os calibradores / plasmas de controlo / amostra e/ou o conjugado não deve exceder 60 segundos por tira de teste de ELISA (8 poços).
 - Durante as reacções do substrato e de paragem, o tempo necessário para pipetar o substrato e/ou a solução de paragem não deve exceder 10 segundos por tira de teste de ELISA. Tempos de pipetagem curtos podem ser garantidos usando pipetas Multicanal e pipetas de dispensação.
- Marque / numere as tiras com um marcador resistente à água no caso das tiras acidentalmente caírem da armação durante o decorrer do procedimento.
- Após a última lavagem, os poços devem ser aspirados completamente, devem ser virados para baixo e colocados num papel absorvente; batendo suavemente, deve ser removido o líquido remanescente.
- Medindo a diferença em comprimento de onda a 450 e 620 nm a precisão do teste é aumentada.
- Tem que ser criada para cada ensaio uma curva de calibração.

LIMITAÇÃO DO TESTE

Não se pode excluir que certas formas de ADAMTS-13 (com mutações no domínio CUB) não são medidas equivalentemente devido a uma redução da ligação ao anticorpo de captura na placa. A trombina é reconhecida por degradar a ADAMTS13. Por este motivo devem ser evitadas amostras de soro.

RESULTADOS DAS ANÁLISES

CÁLCULO DOS RESULTADOS

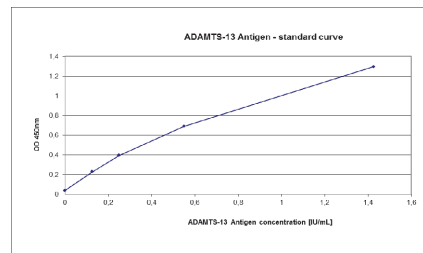
Preparar a curva de referência: eixo X: concentração antígeno ADAMTS-13 [IU/mL] eixo Y: Extinção a 450nm

O gráfico é linear-linear com o melhor ajustamento ponto por ponto.

Avaliação da curva de referência

A validade do teste pode ser verificada com base nos valores calculados do controlo.

Exemplo da curva de referência



Medição da concentração das amostras

- Leia a concentração a partir da curva de referência
- Se houver amostras com coeficientes de extinção superiores ao ponto mais alto da curva, elas devem ser previamente diluídas com tampão de incubação (1+1 ou 1+3). A concentração medida tem que ser multiplicada pelo factor de diluição 2 ou 4, respectivamente.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTOS/INTERVALO DE REFERÊNCIA

Intervalo normal para a concentração do Antígeno ADAMTS-13: 0.41 – 1.41 IU/mL (n=188)
Intervalo normal pode variar dependendo da população local. É recomendável que cada laboratório estabeleça o seu próprio intervalo normal. Na interpretação dos resultados serológicos, deve-se ter em consideração o histórico do paciente.

PADRONIZAÇÃO

Os padrões e controlos são produzidos a partir de um pool de plasma de doadores normais, calibrados contra o Padrão Internacional da OMS para a ADAMTS-13.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Os dados de desempenho são apresentados abaixo. Os resultados obtidos em laboratórios individuais podem diferir.

PRECISÃO

A reprodutibilidade foi determinada com amostras diferentes (em séries e dia a dia), foram obtidos os seguintes resultados.

Amostra	Variação Intra ensaio		Variação Inter ensaio	
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
N	10	10	3	3
Média (IU/mL)	0.55	0.11	0.49	0.10
SD (IU/mL)	0.04	0.01	0.05	0.01
CV (%)	6.36	5.71	9.97	6.62

INTERVALO DO ENSAIO

0 IU/mL – 1.0 µg/mL
(ou até ao valor atual do calibrador 1)

LIMITE DE DETEÇÃO

0.012 IU/mL

CORRELAÇÃO

Correlação com o antígeno em TECHNOZYM® ADAMTS-13 método fluorogénico é R² = 0.9 para as amostras normais e R² = 0.91 para as amostras de TTP.

BIBLIOGRAFIA

Por favor entrar em contacto com a Technoclone ou com o seu distribuidor local.

DESCRIPTION DU PRODUIT

UTILISATION PRÉVUE

Le TECHNOZYM® ADAMTS-13 Antigen ELISA est un test chromogénique pour la détermination de l'ADAMTS-13 Antigène dans le plasma humain. L'ADAMTS-13 (désintégrine-like et métalloprotéinase avec thrombospondine de type 1 motif 13) est une protéase spécifique du facteur von Willebrand (vWF) ou vWF-CP qui clive spécifiquement et réduit la taille anormalement grande des multimers du facteur von Willebrand (vWF), lesquels permettent la formation d'agrégats plaquettaires dans la microcirculation où les forces de cisaillement sont élevées. Si l'activité de l'ADAMTS-13 est plus basse pour diverses raisons, le vWF circule sous la forme anormale de multimers de grandes tailles pouvant s'accumuler dans le sang entraînant des phénomènes de coagulation anormaux, par activation et adhésion des plaquettes puis formation de thrombi, qui peuvent à son tour générer un Purpura Thrombotique Thrombocytopenique (PTT).

COMPOSITION

- 12 barrettes de test ELISA contenant 8 puits recouverts avec un anticorps monoclonal anti ADAMTS-13 directement dirigé contre le domaine CUB. Les barrettes sont emballées dans un sac en aluminium contenant un agent dessiccant.
- Tampon de lavage 10 fois concentré (PBS; pH 7,3) contenant un détergent méristhionate 0,01%, 1 flacon de 80 mL.
- Tampon d'incubation (= tampon de dilution des échantillons), (PBS; pH 7,3) contenant un stabilisant de protéine, 0,05% proclin, 1 flacon prêt à l'emploi de 90 mL.
- Calibreurs numérotés de 1 à 5, lyophilisés, chaque calibreur est fourni dans un flacon de 0,5 mL. **Les concentrations sont dépendantes du lot; consulter les étiquettes sur les flacons.**
- Contrôles plasmatiques haut et bas, lyophilisés et fournis chacun dans un flacon de 0,5mL. **Les concentrations sont dépendantes du lot; consulter les étiquettes sur les flacons.**
- Solution de Conjugué : anticorps monoclonal anti-ADAMTS-13 POX, 1 flacon lyophilisé bleu de 0,3 mL.
- Substrat chromogène : TMB (tétraméthylbenzidine), 1 flacon prêt à l'emploi de 12 mL.
- Solution d'arrêt: acide sulfurique 0,45 mol/L; 1 flacon prêt à l'emploi de 12 mL.
- films protecteurs pour microplaque.

MATÉRIEL REQUIS (non fourni avec le kit)

- Eau distillée
- Eprouvette graduée de 1000 mL
- Pipettes de précision (5, 50, 100, 1000 µL)
- Pipettes réglables (200 et 1000 µL)
- Pipettes multicanaux (100 et 200 µL)
- Automate de lavage ELISA ou pipettes multicanaux
- Lecteur de plaque ELISA équipée d'un filtre à 450 nm et si possible avec un filtre de référence à 620 nm

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- Dispositif médical IVD uniquement pour le diagnostic in vitro.
- Tous les produits élaborés à partir de sang humain et de plasma aussi bien que tous les échantillons doivent être considérés comme étant potentiellement infectieux. Ils doivent être manipulés avec une attention particulière, et ceci dans la stricte observance des règles de sécurité. Les règles concernant le stockage des déchets sont identiques à celles appliqués à l'hôpital.
- Les standards et contrôles plasmatiques sont élaborés à partir de sang humain, et tous les plasmas utilisés ont été vérifiés HBS Ag, HIV 1/2 Ab et HCV-Ag négatifs (voir les étiquettes sur le kit et/ou sur les flacons). Cependant, comme tout plasma humain, ils doivent être manipulés comme du matériel potentiellement infectieux.
- La solution d'arrêt (acide sulfurique) peut être irritante pour la peau. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement avec de l'eau et consulter un médecin.
- Les réactifs contiennent parfois des agents conservateurs (merthiolate). Ne pas les avaler ! Éviter tout contact avec la peau ou les muqueuses.

STABILITÉ ET STOCKAGE

La date d'expiration des réactifs sur les flacons concernent uniquement le stockage des flacons non ouverts à +2...+8°C. Stabilité après reconstitution / après ouverture:

Matériel/Réactif	État	Stockage	Stabilité
Calibreurs et contrôles	Après reconstitution	-20 °C	6 mois
Bandelettes de test ELISA	Après ouverture	+2...+8°C sous film adhésif avec agent dessiccant dans un sac en plastique	Date de péremption
Tampon de lavage concentré	Après ouverture	+2...+8°C	6 mois
Tampon de lavage	Dilué concentré au 1+11,5	+2...+8°C	3 semaines
Tampon d'incubation	Après ouverture	+2...+8°C	2 mois
Conjugué	Après ouverture	+2...+8°C	6 mois
	Solution de travail	Température ambiante (+18...+25°C)	60 minutes
Substrat Chromogène TMB	Après ouverture	+2...+8°C	Date de péremption

PROCÉDURE DU TEST

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Matériel: Plasma citraté humain. Les échantillons peuvent être conservés jusqu'à 3 heures au maximum à température ambiante. Mais ils peuvent être stockés pendant plusieurs mois à -20°C. Les échantillons ne doivent pas être congelés et décongelés plusieurs fois.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

- Avant de commencer les dosages, tous les composants doivent être placés et stabilisés à température ambiante.
- Préparation du tampon de lavage à utiliser: Diluer 1 vol de tampon de lavage concentré avec 11,5 volumes d'eau distillée (1+11,5). Bien mélanger ! Il se peut qu'il y ait des précipitations cristallines: celles-ci se dissolvent à +37°C en 10 minutes.
Le tampon de lavage cité par la suite est toujours du tampon de lavage dilué
- Reconstitution des calibreurs et des contrôles plasmatiques : Les calibreurs et les contrôles plasmatiques sont reconstitués avec 500 µL d'eau distillée. Attendre la stabilisation pendant 15 minutes puis agiter la solution au vortex pendant 10 secondes. Les solutions reconstituées sont claires ou très légèrement troubles.

AUCUNE DILUTION n'est nécessaire pour les calibreurs et les contrôles.
Les échantillons sont utilisés non dilués

- Préparer la solution de travail pour le conjugué au 1/51ème (1+50). Diluer 1 vol de conjugué avec 50 volumes du tampon d'incubation.

Pour 8 puits :
mélanger 10µL de conjugué avec 500µL de tampon d'incubation

PERFORMANCE DU TEST

INCUBATION DES ÉCHANTILLONS (référence 1,2)	Ajouter les calibreurs / contrôles / échantillons dans chaque puits	50 µL
	Incuber à température ambiante	120 minutes
LAVAGE (référence 1,3,4)	Tampon de lavage, 3 lavages	4 x 250 µL
REACTION AVEC LE CONJUGUE (référence 1,2)	Ajouter la solution de conjugué dans chaque puits	50 µL
	Incuber à température ambiante	60 minutes
LAVAGE (référence 1,3,4)	Tampon de lavage, 3 lavages	4 x 250 µL
REACTION DU CHROMOGENE (référence 1,2)	Ajouter la solution de substrat chromogène dans chaque puits	50 µL
	Incuber à température ambiante	15 minutes
SOLUTION D'ARRÊT (référence 1,2)	Ajouter la solution d'arrêt dans chaque puits	50 µL
MESURE (référence 5)	Lecture de plaque ELISA, 450 nm	Agiter 10 sec., mesurer avant 10 minutes

Références :

- Ne pas utiliser ensemble des réactifs provenant de différents lots.
- Le bon déroulement et la précision du test dépendent des facteurs suivants:
 - Bien mélanger les substances utilisées lors des dilutions : vortex 10 secondes.
 - Les standards, les contrôles et les échantillons doivent être testés en double.
 - Les incubations doivent être effectuées à la température indiquée (température ambiante : +18...+25°C).
 - Respecter strictement l'ordre de pipetage et le temps d'incubation pour chaque élément comme indiqué.
 - Le temps d'incubation des échantillons, conjugués, et substrat démarre après le pipetage du dernier échantillon. Les temps d'incubation ne doivent pas varier de ± 5 %.
 - Durant l'incubation des échantillons et la réaction avec le conjugué, les temps de pipetage du calibreur / échantillon / contrôle et/ou des solutions conjuguées, ne doivent pas excéder 60 secondes par barrette de test ELISA (8 puits).
 - Durant la réaction du substrat et lors de l'arrêt de la réaction, le temps nécessaire au pipetage du substrat et/ou de la solution d'arrêt ne doit pas excéder 10 secondes par barrette. Pour cela utiliser de préférence une pipette multicanaux
- Numéroter les barrettes avec un feutre résistant à l'eau au cas où les bandes tombent accidentellement de la plaque durant le test.
- Après le dernier lavage, les puits doivent être rigoureusement secs : pour cela, retourner la plaque d'analyse sur du papier absorbant et la taper doucement.
- En mesurant la différence de densité optique à 450 nm et 620 nm, la précision de l'analyse est augmentée.
- Une courbe de calibration doit être effectuée pour chaque analyse.

LIMITES DU TEST

Il n'est pas exclu que certaines formes d'ADAMTS-13 (avec une mutation dans les domaines CUB) ne soient pas mesurées de façon équivalente due à la réduction de la liaison à l'anticorps fixé sur la microplaque.

ANALYSE DES RÉSULTATS

CALCUL DES RÉSULTATS

Établissement de la gamme d'étalonnage :

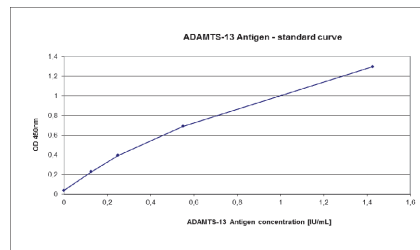
Axe des X: concentration d'antigène ADAMTS-13 [IU/mL]
Axe des Y: Densité optique mesurée à 450 nm

Le graphique est de type linéaire-linéaire. Le meilleur modèle mathématique doit être choisi pour la courbe de calibration.

Évaluation de la gamme d'étalonnage :

La validité du test doit être vérifiée sur la base des valeurs calculées des contrôles.

Exemple de gamme d'étalonnage :



Mesure des concentrations des échantillons :

- Lire la concentration à partir de la gamme d'étalonnage.
- Si des échantillons ont une densité optique supérieure à celle du point le plus haut de la gamme d'étalonnage, ils doivent alors être pré-dilués avec le tampon de réaction (1+1 ou 1+3). La concentration mesurée doit alors être multipliée par 2 ou 4, respectivement.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS / GAMME DE RÉFÉRENCE

Les valeurs normales pour la concentration en antigène de l'ADAMTS-13 sont comprises entre 0,41 – 1,41 IU/mL (n=188)

Il est recommandé pour chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs normales. Lors de l'interprétation des résultats sérologiques, l'historique du patient doivent être pris en compte.

STANDARDISATION

Les standards et les contrôles sont produits à partir de donneurs normaux et ils sont étalonnés contre le standard international WHO pour l'ADAMTS-13.

PERFORMANCES

Les performances sont établies à partir des données ci-dessous. Les résultats obtenus peuvent varier selon les Laboratoires.

PRÉCISION

La reproductibilité a été déterminée avec différents échantillons (en séries et sur plusieurs jours) Les résultats suivants ont été obtenus:

échantillon	Intra assay variation		Inter assay variation	
	échantillon 1	échantillon 2	échantillon 3	échantillon 4
N	10	10	3	3
Mean (IU/mL)	0.55	0.11	0.49	0.10
SD (IU/mL)	0.04	0.01	0.05	0.01
CV (%)	6.36	5.71	9.97	6.62

LINEARITÉ

0 IU/mL – 1.0 IU/mL

LIMITE DE DÉTECTION

0.012 IU/mL

(ou jusqu'à la valeur indiquée pour le calibreur 1)

CORRÉLATION

La corrélation de l'ADAMTS-13 antigène avec la méthode du TECHNOZYM® ADAMTS-13 fluorogénique est de r²= 0.9 pour les échantillons normaux et de r²=0.91 pour les échantillons ayant un PTT.

LITTÉRATURE

Veillez vous adresser SVP à la société Technoclone ou directement à votre revendeur

ОПИСАНИЕ ПРОДУКТА

НАЗНАЧЕНИЕ

TECHNOZYM® ADAMTS-13 Antigen является хромогенным тестом для определения концентрации антигена ADAMTS-13 в плазме человека. ADAMTS-13 является ферментом, который расщепляет vWF в условиях ламинарного потока. Функциональные дефекты этого фермента приводят к наличию высокомолекулярных vWF и, поэтому, повышенной агрегации тромбоцитов, главным образом в микрокапиллярах. Это наиболее вероятная причина тромбоцитопенической тромбогемолитической пурпуры (ТТР).

СОСТАВ

- ИФА тест стрипы (12), по 8 лунок каждый, покрытые моноклональными анти-ADAMTS-13 антителами, против домена CUB; осушающий агент находится в алюминиевом пакете.
- Концентрат промывочного буфера (PBS; pH 7,3); содержит детергент; 0,01% мертиолат; 1 флакон, 80 мл.
- Инкубационный буфер (=буфер для разведения проб) (PBS; pH 7.3); содержит белок-стабилизатор; 0,05% Проклин ; и краситель, 1 флакон, 90 мл, готов к использованию.
- Калибраторы (Стандарты) пронумерованные от 1 до 5; лиофилизаты; 1 флакон каждого; 0,5 мл.
Концентрации лот-специфичны; см. наклейки флаконов.
- Высокая и низкая контрольные плазмы; лиофилизаты; 1 флакон каждой; 0,5 мл.
Концентрации лот-специфичны; см. наклейки флаконов.
- Конъюгат: анти-ADAMTS-13 POX; синий; 1 флакон, 0,3 мл.
- Хромогенный субстрат ТМВ (тетраметилбензидин); 1 флакон; 12 мл; готов к использованию.
- Останавливающий раствор серной кислоты 0,45 моль/л; 1 флакон; 12 мл; готов к использованию.
- Клейкая пленка: для ИФА тест-стрипов; 2 шт.

ПОТРЕБУЮТСЯ МАТЕРИАЛЫ (не входят в набор)

- Дистиллированная вода
- Мерный цилиндр (1000 мл)
- Прецизионные пипетки (50, 100 и 1000 мкл)
- Варипипетки (100 и 1000 мкл)
- Многоканальные пипетки и/или диспенсеры (100 и 200 мкл)
- ИФА Промыватель, или многоканальная пипетка
- Ифа ридер со светофильтрами 450 и 620 нм.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Только для исследовательских целей
- Все продукты человеческой крови или плазмы, а также пробы, должны рассматриваться как потенциально инфицированные. С ними следует обращаться с соответствующими предосторожностями и в строгом соответствии с правилами безопасности. Правила утилизации такие же, как для больничных отходов.
- Калибраторы и контрольные плазмы делаются из человеческой крови и каждая индивидуальная плазма, включенная в процедуру является HBSAg, HIV 1/2 Ab и HCV-Ab-отрицательной (см. наклейки на флаконах). Однако, со всеми продуктами человеческой крови следует обращаться как с потенциально инфицированным материалом.
- Останавливающий раствор может раздражать кожу. Если кислота попадет в глаза, немедленно промойте водой и обратитесь к врачу.
- Реагенты иногда содержат консерванты (мертиолат). Остерегайтесь заглатывания! Избегайте контакта со слизистыми оболочками!

СТАБИЛЬНОСТЬ И ХРАНЕНИЕ

Срок годности, указанный на наклейке, применим к невскрытым флаконам при + 2...8°C. Стабильность после растворения/вскрытия:

Материал/Реагент	Состояние	Хранение	Стабильность
Калибраторы, Контр.плазмы	После растворения	-20 °C	6 месяцев
ИФА тест-стрипы	После вскрытия	+ 2...8°C с клейкой пленкой в пластиковом пакете с осушителем	До срока годности
Конц.промыв.буф.	После вскрытия	+ 2...8°C	6 месяцев
Промыв. буфер	1+11,5 развед.конц.	+ 2...8°C	3 недели
Инкубаци. буфер (=буфер для развед. проб)	После вскрытия	+ 2...8°C	2 месяца
Конъюгат	После вскрытия	+ 2...8°C	6 месяцев
	Рабочий раствор	Комнатная температура (+18...25°C)	60 минут
Хромогенный субстрат ТМВ	После вскрытия	+ 2...8°C	До срока годности

ПРОЦЕДУРА ТЕСТА

ПОДГОТОВКА ПРОБ

Материал проб: человеческая плазма с цитратом. Пробы могут храниться 3 часа при комнатной температуре. При -20°C они могут храниться несколько месяцев. Пробы не могут быть заморожены и разморожены несколько раз.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ

- Перед началом тестирования все требуемые компоненты должны быть доведены до комнатной температуры.
- Подготовка промывочного буфера: Разбавьте 1 объем концентрата промывочного буфера 11,5 объемами дистиллированной воды (1+11,5). Хорошо перемешайте! (Разбавленный концентрат промывочного буфера=промывочный буфер). Может быть кристаллический осадок, который растворится при +37°C в течение 10 минут.
- Растворы калибраторов и контрольных плазм: Калибраторы и контрольные плазмы растворяются в 500 мкл дистиллированной воды, перемешиваются в течение 10 секунд и выдерживаются 15 минут.
Растворенные компоненты от прозрачных до слегка мутных.
Не требуется разводит калибраторы и контроли!
- Пробы используются неразведенными
- Подготовка рабочего раствора конъюгата (1+50): Разбавьте 1 объем конъюгата 50 объемами инкубационного буфера.

Для 8 тест-лунок: Смешайте 10 мкл конъюгата с 500 мкл инкубационного (= для разведения проб) буфера

ВЫПОЛНЕНИЕ ТЕСТА

ИНКУБАЦИЯ ПРОБ (ссылки 1,2)	Пипетируйте калибраторы, контрольные плазмы, пробы в тест-лунок; закройте пленкой	50 мкл
ПРОМЫВКА (ссылки 1,3,4)	Инкубируйте при комнатной температуре	120 минут
РЕАКЦИЯ С КОНЪЮГАТОМ (ссылки 1,2)	Пипетируйте рабочий раствор конъюгата в тест-лунок; закройте пленкой	50 мкл
	Инкубируйте при комнатной температуре	60 minutes
ПРОМЫВКА (ссылки 1,3,4)	Промывочный буфер	4 x 250 мкл
РЕАКЦИЯ С СУБСТРАТОМ (ссылки 1,2)	Пипетируйте Раствор субстрата в тест-лунок; закройте пленкой	50 мкл
	Инкубируйте при комнатной температуре	15 minutes
ОСТАНОВКА (ссылки 1,2)	Пипетируйте останавливающий раствор в лунки	50 мкл
ИЗМЕРЕНИЕ (ссылка 5)	ИФА-ридер, 450 нм	встряхните 10 сек., измерьте в течение 10 мин.

Ссылки

- Реагенты разных лотов не должны комбинироваться
- Точность и другие метрологические характеристики существенно зависят от следующих факторов:
 - Тщательно перемешайте все вещества, используемые для разведения, 10 секунд на вортексе.
 - Тестируйте калибраторы, контроли и пробы в дублях
 - Инкубируйте при указанной температуре (комнатная температура +18...25°C)
 - Строго соблюдайте порядок пипетирования и указанное время этапов
 - Время инкубации проб, конъюгата и субстрата начинается с момента пипетирования в последнюю лунку. Время инкубации не может варьироваться более чем ± 5 %.
 - Во время инкубации проб и реакции конъюгатом время пипетирования калибраторов, контролей, проб и раствора конъюгата не должно превышать 60 секунд на один стрип (8 лунок).
 - Во время реакции с субстратом и остановки, время необходимое для пипетирования субстрата и стоп-раствора не должно превышать 10 секунд на стрип. Время пипетирования может сокращаться, если использовать многоканальные пипетки, или диспенсеры.
- Помечайте стрипы водостойким карандашом на случай их выпадения при тестировании.
- После последней промывки жидкость из лунок должна быть тщательно аспирирована, плашку необходимо перевернуть лунками вниз, поместить на фильтровальную бумагу, осторожно постукивая перевернутой плашкой по бумаге, чтобы удалить оставшуюся жидкость.
- Бихроматическое считывание при длинах волн 450 нм (основная) и 620 нм (вспомогательная) увеличивает точность определений.
- Калибровочная кривая должна строиться при каждом исследовании.

ОГРАНИЧЕНИЯ ТЕСТА

Нельзя исключать, что определенные формы ADAMTS-13 (с мутацией в домене CUB) не эквивалентно измеряются вследствие пониженной связываемости с антителами, прикрепленными к плашке. Сообщалось, что тромбин разрушает ADAMTS-13. Поэтому, проб сыворотки следует избегать.

РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗОВ РАСЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ

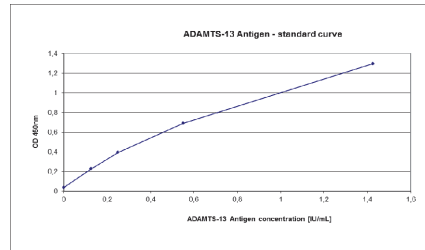
Построение калибровочной кривой: Ось X: концентрация антигена ADAMTS-13 [IU/mL]
Ось Y – оптическая плотность при 450 нм

График с линейными осями координат с наилучшим профилем линии регрессии.

Оценка калибровочной кривой

Достоверность результатов может быть проверена по значениям в контрольных образцах.

Пример стандартной кривой.



Измерение концентрации проб

Считайте концентрацию с калибровочной кривой. Если есть пробы с оптической плотностью выше верхней точки калибровки, их следует разбавить инкубационным буфером (1 + 1, или 1 + 3). Измеренная концентрация затем должна умножаться на фактор разведения 2 или 4 соответственно.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ / ДИАПАЗОН ОРМЫ

Диапазон нормы для концентрации антигена ADAMTS-13: 0.41 – 1.41 IU/mL (n=188)
Диапазон нормы может варьировать в зависимости от локальной популяции. Рекомендуется индивидуальным лабораториям устанавливать свои собственные нормы. При интерпретации серо логических результатов истории пациентов также должны быть приняты во внимание.

СТАНДАРТИЗАЦИЯ

Стандартные и контрольные образцы получены из пула нормальной донорской плазмы и калиброваны по международному стандарту ВОЗ для ADAMTS-13.

ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЫПОЛНЕНИЯ

Данные приведены ниже. Результаты, полученные в индивидуальных лабораториях, могут отличаться.

ВОСПРОИЗВОДИМОСТЬ

Воспроизводимость определялась с различными пробами (в серии и изо дня в день). Были получены следующие результаты:

образец	воспроизводимость внутри серии		воспроизводимость между сериями	
	образец 1	образец 2	образец 3	образец 4
N	10	10	3	3
среднее (IU/mL)	0.55	0.11	0.49	0.10
SD (IU/mL)	0.04	0.01	0.05	0.01
CV (%)	6.36	5.71	9.97	6.62

ДИАПАЗОН ИЗМЕРЯЕМЫХ ЗНАЧЕНИЙ

0 IU/mL – 1.0 IU/mL
(or up to the actual value of calibrator 1)

ПРЕДЕЛ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ

0.012 IU/mL

КОРРЕЛЯЦИЯ

Корреляция с флуоресцентным методом TECHNOZYM® ADAMTS-13: для нормальных образцов r²= 0.9, для ТТР образцов r²=0.91.

ЛИТЕРАТУРА

Контактируйте с фирмой Technoclone, или вашим локальным дистрибьютором.