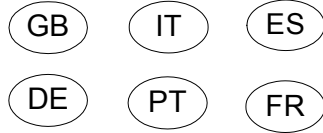









TECHNOZYM® ADAMTS-13 INH



For Research
Use Only

REF	5450401	TECHNOZYM® ADAMTS-13 INH	
REF	5450451	TECHNOZYM® ADAMTS-13 INH	
REF	5450461	TECHNOZYM® ADAMTS-13 INH Calibrator Set	5 x 0.5 mL
REF	5450463	TECHNOZYM® ADAMTS-13 INH 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 / Угобвец / 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 / oppbevaringstemperatur / Oppbevaringstemperatur / θερμοκρασία αποθήκευσης / съхранение на / teplota skladování / температура хранения / teplota skladování / Temperatura lagerovnja		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 bruksanvisningen / συμβουλευθείτε τις οδηγίες για τη χρήση / прочетете инструкцията за работа / potfeba fidiť se instrukcemi / перед использованием читайте инструкцию / sledujte návod k použití / Pročitaj upustvo pre upotrebe
			determinations / Bestimmungen / determinazioni / determinaciones / determinações / déterminations / bestämmingar / 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 / destilированная вода / destilovaná voda / Destilissana Voda	LOT	lot / Charge / lotto / lote / lote / lot / sats / serie / Parti / партиа / партида номер / šarže / lot / šarže / Serija
BUF	Reaction buffer / Reaktionspuffer / tampone di reazione / tampón de reacció / Tampão de reação / tampon de réaction / Reaktionsbuffert / Reaktionsbuffer / Reaksjonsbuffer / διάλυμα αντίδρασης / Реакционен буфер / Рабочий буферный раствор / Reakčni pufr / Reakcioni pufer	MTP	microtiter plate / Mikrotiterplatte / placa microtiter / microplaca / microplaca / microplaques sensibilisées / Mikrotiterplatta / Mikrotiterplade / mikrotiterplate / πλάκα μικροτιτλοδότησης / Микротитерная плака / Микропланшет / Mikrotitrační destička / Mikrotitrationsplöche
CAL	Calibrator / Kalibrator / Calibratore / calibrador / calibrador / calibreur / Kalibrator / Kalibrator / Kalibrator / Βαθμονομητής / Калибратор / калибратор / kalibrátor / Kalibrator	REF	catalogue number / Katalognummer / numero di catalogo / número de catálogo / número de referència / réf. de catalogue / katalognummer / Katalognummer / αριθμός καταλόγων / καταλογен номер / katalogové číslo / каталожный номер / katalogové číslo / Kataloški broj
CONJ	Conjugate / Konjugat / Coniugato / conjugado / conjugado / conjugaté / Konjugerad / Konjugat / Konjugat / συνδεδετικό / 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 / Stopplösning / 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 / späd eller upplös i / fortyndes eller opløses i / Fortyndes eller opløses i / αραιωση ή διάλυση σε / растворите или разредете с / zředit anebo rozpustit v / разбавить или растворить в / naředte 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 / Vaskebufferkoncentrat / 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 / Vattenlösningkoncentrat / Vaskeoppløsningskoncentrat / vaskeløsningskoncentrat / συμπυκνωμένο διάλυμα πλύσης / Концентриран мицк разтвор / Концентрат промывочного раствора / Koncentrat promyvachho roztoku / Koncetrat solucije za ispiranje



PRODUCT DESCRIPTION

INTENDED USE

The TECHNOZYM® ADAMTS-13 INH ELISA is a test for detection of human autoantibodies (IgG) in serum or plasma against ADAMTS-13, the protease which is responsible for cleaving unusually large vWF (ULvWF). Most of these autoantibodies inhibit ADAMTS-13 activity and thus non-cleaved ULvWF accumulates in plasma. This is believed to be the major cause for thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). TECHNOZYM® ADAMTS-13 INH test makes it possible to differentiate between congenital (gene polymorphisms) and acquired (autoantibodies) TTP when coupled to an activity assay and to control efficacy of plasma exchange therapy.

COMPOSITION

1. ELISA test strips (6 for 48 T. and 12 for 96 T.), with 8 wells each, coated with a recombinant form of ADAMTS-13 protease; the drying agent is supplied in an aluminium bag.
2. Washing buffer concentrate (PBS; pH 7.3); containing detergent; 0.01% merthiolate; 1 vial, 80 mL.
3. Incubation buffer (= sample dilution buffer) (PBS; pH 7.3); contains stabiliser protein; 0.05% proclin; and dye, 1 vial, 90 mL, ready for use.
4. Calibrators (Standards) numbered from 1 to 5; lyophilised; 1 vial each; 0.5 mL. **Concentrations are lot-specific; consult the label on the vial.**
5. Positive and negative control plasma; lyophilised; 1 vial each; 0.5 mL. **Concentrations are lot-specific; consult the label on the vial.**
6. Conjugate: anti-human IgG POX; dyed blue; 1 vial, 0.3 mL.
7. Chromogenic substrate TMB (tetramethylbenzidine); 1 vial; 12 mL; ready to use.
8. Stopping solution sulphuric acid 0.45 mol/L; 1 vial; 12 mL; ready to use.
9. Adhesive film: for ELISA test strips; 2 pieces.

MATERIAL REQUIRED (not supplied with the kit)

1. Distilled water
2. Test tubes for diluting samples
3. Measuring cylinder (1000 mL)
4. Precision pipettes (10, 100 and 1000 µL)
5. Variable pipette (1000 µL)
6. Multichannel and/or dispensing pipettes (100 and 200 µL)
7. ELISA washer or multichannel pipette
8. ELISA reader with 450 nm filter, with a 620 nm reference filter if available.

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	60 minutes
Chromogen TMB	after opening	2 ... 8 °C	expiry date

TEST PROCEDURE

PREPARATION OF THE SAMPLES

Sample material: Human serum or citrated plasma. Samples maybe 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

1. Before starting the test, all the required components are to be brought to room temperature.
2. 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.
3. 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).

No dilution is necessary for calibrators and controls!

Reconstituted components are clear to slightly turbid.

4. Sample Dilution: Samples are diluted with incubation buffer (1+100) : Dilute 1 part by volume sample with 100 parts by volume incubation buffer

10 µL sample + 1000 µL incubation (=sample dilution) buffer

5. Preparing the conjugate working solution (1+50): Dilute 1 part by volume conjugate with 50 parts by volume incubation buffer.

For 8 test wells: Mix 20 µL conjugate with 1000 µL incubation (=sample dilution) buffer

PERFORMANCE OF THE TEST

SAMPLE INCUBATION (reference 1,2)	Pipette calibrators, control plasmas, diluted samples into test wells; cover test strips with film	100 µL
	Incubate at room temperature	60 minutes
WASHING (reference 1,3,4)	Washing buffer	3 x 200 µL
CONJUGATE REACTION (reference 1,2)	Pipette conjugate working solution into wells, cover test strip with film	100 µL
	Incubate at room temperature	60 minutes
WASHING (reference 1,3,4)	Washing buffer	3 x 200 µL
SUBSTRATE REACTION (reference 1,2)	Pipette Substrate solution into test wells, cover test strip with film	100 µL
	Incubate at room temperature	10 minutes
STOPPING (reference 1,2)	Pipette stopping solution into wells	100 µL
MEASURING (reference 5, 6)	ELISA-Reader, 450 nm	

References

1. Reagents of different lots must not be combined
2. 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, 20...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 should 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.
 - **Use incubation buffer from actual kit box, do not use incubation buffer left from previous boxes. Keep incubation buffer free from contaminants**
3. Label/number strips with a water resistant pen in case the strips accidentally fall out of the frame during testing.
4. 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.
5. By measuring the difference in wave lengths at 450 and 620 nm the precision of the test is increased.
6. shake 10 sec., measure within 10 min.

WARNING AND PRECAUTIONS

- 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 (sulphuric acid) 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

LIMITATION OF THE TEST

Samples with high concentrations of other than anti ADAMTS-13 autoantibodies may result in weak positive or borderline results.

ANALYSES RESULTS

CALCULATION OF THE RESULTS

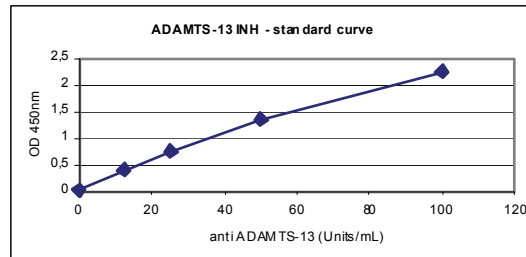
Setting up a reference curve: X axis: concentration ADAMTS-13 IgG (U/mL)
Y axis: Extinction at 450nm

Graph plot is linear-linear with a linear or point to point fit.

Assessment of reference curve

- The extinction coefficient of the highest calibrator should be between 1.0 and 2.5.
- The extinction coefficient of the lowest Calibrator should be <0.1.
- The extinction difference between these two values should be at least 1.0.
- 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 prediluted 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

negative samples: < 12 units/mL

borderline: 12 – 15 units/mL

positive samples: > 15 units/mL

(n=193)

It is recommended that individual laboratories establish their own normal range. When interpreting the serological results the history of the patient has to be taken into account.

STANDARDISATION

Standards are calibrated against a plasma with a very high titre of anti ADAMTS-13 IgG. A 1:200 dilution of this reference plasma is defined to contain an antibody concentration of 100 Units/mL. (arbitrary units).

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	24	24	20	20
Mean (U/mL)	62,9	31,2	75,4	12,8
SD (U/mL)	4,9	0,9	2,7	0,7
CV (%)	7,86%	2,78%	3,54%	5,52%

ASSAY RANGE

2 – 104 U/mL

DETECTION LIMIT

1,68 U/mL

LITERATURE

- Sadler JE. A new name in thrombosis, ADAMTS13. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99: 11552-11554.
- Tsai HM, Li A, Rock G. Inhibitors of von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura. Clin Lab. 2001;47:387-392.
- Fontana S, Hovinga JA, Studd JD et al. Plasma therapy in thrombotic thrombocytopenic purpura: review of the literature and the Bern experience in a subgroup of patients with severe acquired ADAMTS-13 deficiency. Semin Hematol. 2004;41:48-59.
- Klaus C, Plaimauer B, Studd JD et al. Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood. 2004;103:4514-4519.

PRODUKTBESCHREIBUNG

ANWENDUNG

Der TECHNOZYM® ADAMTS-13 INH ELISA ist ein Test für den Nachweis humaner Auto-Antikörper (IgG) in Serum oder Plasma. Diese Antikörper sind gegen die vWF spaltende Protease ADAMTS-13 gerichtet und hemmen deren Aktivität. Die Hauptfunktion von ADAMTS-13 ist die Spaltung von ungewöhnlich großen vWF Molekülen. Das Fehlen der ADAMTS-13 Funktion wird als Hauptursache für die thrombotische thrombozytopenische Purpura (TTP) angesehen. Der TECHNOZYM® ADAMTS-13 INH Test in Kombination mit einem Aktivitätstest dient zur Unterscheidung der erworbenen TTP (Autoantikörper) von der vererbten TTP (Polymorphismen im ADAMTS-13 Gen) und zur Überprüfung der Wirksamkeit einer Plasmaersatztherapie.

ZUSAMMENSETZUNG

- ELISA-Teststreifen (6 für 48 T, und 12 für 96 T.); mit jeweils 8 Testvertiefungen; beschichtet mit rekombinantem ADAMTS-13 Protein; mit Trocknungsmittel im Aluminiumbeutel verpackt.
- Waschpufferkonzentrat (PBS; pH 7,3); detergentenhaltig; 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-human-IgG POX; blauefärbt; 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
- Abklebefolien: für ELISA-Teststreifen; 2 Sk.

BENÖTIGTES MATERIAL (nicht im Kit enthalten)

- Aqua dest.
- Röhrchen zur Verdünnung der Proben
- Messzylinder (1000 mL)
- Präzisionspipetten (10, 100 und 1000 µL)
- Variable Pipette (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.

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	60 Minuten
Chromogenes Substrat	nach Öffnen	2 ... 8 °C	Verfallsdatum

TESTDURCHFÜHRUNG

VORBEREITUNG DER PROBEN

Probenmaterial: Humanserum oder 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!
- Probenverdünnung: Proben werden mit Inkubationspuffer verdünnt (1+100): 1 Volumenteil Probe wird mit 100 Volumenteilen Inkubationspuffer verdünnt.
10 µL Probe + 1000 µL Inkubationspuffer (=Probenverdünnungspuffer)
- Herstellen der Konjugatgebrauchslösung (1+50): 1 Volumenteil Konjugat mit 50 Volumenteilen Inkubationspuffer verdünnen.
Für 8 Testvertiefungen: 20 µL Konjugat mit 1000 µL Inkubationspuffer (=Probenverdünnungspuffer) mischen.

TESTVERFAHREN

PROBEN-INKUBATION (Hinweise 1,2)	Kalibratoren, Kontrollplasmen, verdünnte Proben in Testvertiefung pipettieren. Teststreifen mit Folie abdecken Bei Raumtemperatur inkubieren	100 µL 60 Minuten
WASCHEN (Hinweise 1,3,4)	Waschpuffer	3 x 200 µL
KONJUGAT-REAKTION (Hinweise 1,2)	Konjugatgebrauchslösung in Testvertiefung pipettieren. Teststreifen mit Folie abdecken Bei Raumtemperatur inkubieren	100 µL 60 Minuten
WASCHEN (Hinweise 1,3,4)	Waschpuffer	3 x 200 µL
SUBSTRAT-REAKTION (Hinweis 1,2)	Substratlösung in Testvertiefungen pipettieren; Teststreifen mit frischer Folie abdecken Bei Raumtemperatur inkubieren	100 µL 10 Minuten
STOPPEN (Hinweis 1,2)	Stopplösung in Testvertiefungen pipettieren	100 µL
MESSEN (Hinweis 5,6)	ELISA-Reader, 450nm	

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; 20 - 25°C)
 - Genauere Einhaltung von Pipettierreihenfolge und Zeittakt.
 - Die angegebene Zeit für die Probeninkubation, Konjugat- und Substratreaktion wird nach der Pipettierung der letzten Probe genommen. Inkubationszeiten sollten um nicht mehr als ±5% variieren.
 - Bei der Probeninkubation und Konjugatreaktion darf die Zeit für die Pipettierung der verdünnten 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.
 - Verwenden sie nur den Inkubationspuffer aus der aktuellen Kitpackung, angebrochene Flaschen Inkubationspuffer aus anderen Packungen dürfen nicht verwendet werden. Vermeiden sie jegliche Kontamination des Puffers.**
- 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 ausgeklopft werden.
- Durch Differenzwellenlängenmessung bei 450 nm und 620 nm wird die Präzision des Tests erhöht.
- 10 Sek. schütteln, Messung innerhalb von 10 Min.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- 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 (Schwefelsäure) 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!

TESTEINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit hohen Konzentrationen anderer Autoantikörper als anti-ADAMTS-13 Antikörper können schwach positive oder grenzwertige Ergebnisse liefern.

ANALYSENERGEBNISSE

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

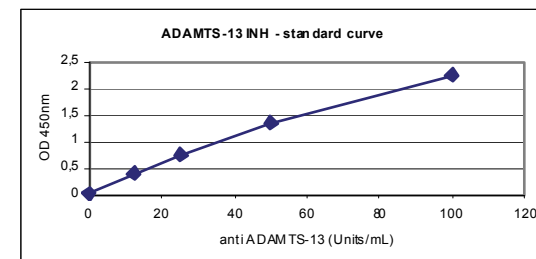
Erstellung der Bezugskurve: x-Achse: anti ADAMTS-13 IgG Konzentration (U/mL)
y-Achse: Extinktion

Bezugskurve ist linear-linear. Werte mittels linearer Regression miteinander verbinden.

Beurteilung der Bezugskurve:

- Die Extinktion des höchsten Kalibrators sollte zwischen 1,0 und 2,5 liegen
- Die Extinktion des niedrigsten Kalibrators sollte <0,1 sein.
- Die Extinktionsdifferenz dieser Kalibratoren sollte mindestens 1,0 sein.
- 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 vorverdünnt werden (1+1 oder 1+3). Die ermittelte Konzentration wird in diesem Fall mit dem Verdünnungsfaktor 2 bzw. 4 multipliziert.

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE/REFERENZBEREICH

Negativ: < 12 Units/mL

Graubereich: 12 – 15 Units/mL

Positiv: > 15 Units/mL

(n=193)

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

Die Standards werden gegen ein Plasma mit einem sehr hohen Titer an anti ADAMTS-13 IgG kalibriert. Die Antikörperkonzentration wird als willkürliche Einheit definiert: 100 U/mL entsprechen einer 1:200 Verdünnung dieses Referenzplasmas.

SPEZIFISCHE LEISTUNGSDATEN

Nachstehend werden repräsentative Leistungsdaten angezeigt. Die Ergebnisse des einzelnen Labors können davon abweichen.

PRÄZISION

Die Reproduzierbarkeit wurde mit verschiedenen Proben (in der Serie und von Tag zu Tag) bestimmt.

Die Resultate gehen aus nachstehender Tabelle hervor:

Sample	Intra assay variation		Inter assay variation	
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
N	24	24	20	20
Mean (U/mL)	62,9	31,2	75,4	12,8
SD (U/mL)	4,9	0,9	2,7	0,7
CV (%)	7,86%	2,78%	3,54%	5,52%

MESSBEREICH

2 – 104 U/mL

BESTIMMUNGSGRENZE

1,68 U/mL

LITERATUR

- Sadler JE. A new name in thrombosis, ADAMTS13. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99: 11552-11554.
- Tsai HM, Li A, Rock G. Inhibitors of von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura. Clin Lab. 2001;47:387-392.
- Fontana S, Hovinga JA, Studt JD et al. Plasma therapy in thrombotic thrombocytopenic purpura: review of the literature and the Bern experience in a subgroup of patients with severe acquired ADAMTS-13 deficiency. Semin Hematol. 2004;41:48-59.
- Klaus C, Plaimauer B, Studt JD et al. Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood. 2004;103:4514-4519.

DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

INDICAZIONI D'USO

L'ELISA TECHNOZYM ADAMTS-13 INH è un test per valutare la presenza di autoanticorpi umani nel siero o nel plasma diretti verso ADAMTS-13, la proteasi responsabile della lisi delle molecole di Fattore di von Willebrand eccezionalmente grandi (ULVWF). Molti di questi autoanticorpi inibiscono l'attività di ADAMTS-13, causando un accumulo di ULVWF non degradato nel plasma. Si pensa che questo possa essere la causa principale della trombocitopenia trombocitica purpurea (TTP). Il saggio TECHNOZYM ADAMTS-13 INH è in grado, in associazione al dosaggio dell'attività plasmatica dell'ADAMTS-13, di distinguere tra la TTP congenita (polimorfismo genetico) e quella acquisita (autoanticorpi) e di controllare l'efficacia della terapia con scambio plasmatico.

COMPOSIZIONE

- Le strisce (6 per 48 T. e 12 per 96 T.) del kit ELISA, ciascuna costituita da 8 pozzetti, sono plastrate con una forma ricombinante della proteasi ADAMT-13; l'agente essiccato è fornito in una busta di alluminio.
- Washing Buffer Concentrate (PBS; pH 7,3); contiene detergente; 0,01% di mertiolato; 1 vial di 80 mL.
- Incubation Buffer (PBS; pH 7,3); contiene proteina stabilizzante; 0,05% di proclin; colorante; 1 vial di 90 mL; pronto per l'uso.
- Calibratori (Standards) numerati da 1 a 5; liofilizzati; 1 vial ciascuno da 0,5 mL. **Le concentrazioni sono lotto-specifiche; consultare l'etichetta sulla vial.**
- Controllo positivo e negativo del plasma; liofilizzato; 1 vial ciascuno di 0,5 mL. **Le concentrazioni sono lotto-specifiche; consultare l'etichetta sulla vial.**
- IgG POX anti-human coniugato; colorato di blue; 1 vial di 0,3 mL.
- Substrato cromogeno TMB (tetrametilbenzidina); 1 vial di 12 mL, pronta per l'uso.
- Stopping Solution di acido solfidrico 0,45 mol/L; 1 vial di 12 mL, pronta per l'uso.
- Film adesivo: per le linee del saggio ELISA; 2 pezzi.

MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI CON IL KIT

- Acqua bidistillata.
- Provette per diluire gli standard e i campioni.
- Cilindro graduato da 1000 mL.
- Pipette di precisione da 10, 100 e 1000 µL.
- Pipetta ripetitiva da 1000 µL.
- Pipette multicanale e/o dispensanti da 100 e 200 µL.
- Burette per ELISA o pipetta multicanale.
- Letture di piastra per ELISA con filtro a 450 nm e con filtro di riferimento a 620 nm se disponibile.

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:

Materiale/Reagente	Stato	Conservazione	Stabilità
Calibratori, plasmici controllo	Dopo ricostituzione	-20 °C	6 mesi
Strisce del kit ELISA	Dopo apertura	2-8°C con il film adesivo nel sacchetto di plastica con un essiccante	Data di scadenza
Washing Buffer Concentrate	Dopo apertura	2 ... 8°C	6 mesi
Washing Buffer	1+11,5 diluizioni del concentrato	2 ... 8 °C	3 settimane
Incubation Buffer	Dopo apertura	2 ... 8 °C	2 mesi
IgG coniugato	Dopo apertura	2 ... 8 °C	6 mesi
	Soluzione di lavoro	Temperatura ambiente	60 minuti
Cromogeno TMB	Dopo apertura	2 ... 8 °C	Data di scadenza

PROCEDURE DEL TEST

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni da utilizzare per il test sono siero umano o plasma trattato con citrato. Campioni forse immagazzinati per tre ore alla temperatura ambiente. A -20°C possono essere immagazzinate per parecchi mesi. I campioni non possono essere congelati e non hanno sciolto parecchie volte.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- Prima di iniziare il saggio, tutti i componenti necessari devono essere portati a temperatura ambiente.
- Preparazione del Washing Buffer: diluire 1 parte in volume del Washing Buffer Concentrate con 11,5 parti in volume di acqua bidistillata (1+11,5). Miscelare bene! (Il Washing Buffer diluito è il tampone utilizzato nei lavaggi). Si potrebbero formare dei precipitati cristallini che si scioglieranno a 37°C in 10 minuti.
- Ricostituzione dei calibratori e dei plasmici controllo: i calibratori e i plasmici controllo sono ricostituiti con 500 µL di acqua bidistillata e miscelati per 10 secondi dopo un tempo di ricostituzione di 15 minuti (usare un Vortex Mixer). I reagenti ricostituiti vanno da un aspetto limpido a leggermente torbido.

Calibratori e controlli non devono essere diluiti ulteriormente.

- Diluizione dei campioni: i campioni sono diluiti con il Buffer di incubazione (1+100); diluire 1 parte in volume di campione con 100 parti in volume di Buffer di incubazione

10 µL di campione + 1000 µL di buffer di incubazione

- Preparazione della soluzione di lavoro del coniugato (1+50): diluire 1 parte in volume del coniugato con 50 parti in volume del Buffer di incubazione.

Per 8 pozzetti del test : mischiare 20 µL di coniugato con 1000 µL di buffer di incubazione.

PERFORMANCE DEL SAGGIO

INCUBAZIONE DEL CAMPIONE (reference 1,2)	Calibratori delle pipette, plasmici controllo, campioni diluiti nei pozzetti del saggio; coprire le linee del test con un film	100 µL
	Incubare a temperatura ambiente	60 minuti
LAVAGGI (reference 1,3,4)	Washing Buffer	3 x 200 µL
REAZIONE DI CONIUGAZIONE (reference 1,2)	Aggiungere la Conjugate working solution nei pozzetti, coprendo le strisce del test con un film	100 µL
	Incubare a temperatura ambiente	60 minuti
LAVAGGI (reference 1,3,4)	Washing Buffer	3 x 200 µL
REAZIONE CON IL SUBSTRATO (reference 1,2)	Aggiungere la Substrate solution nei pozzetti, coprendo le strisce del test con un film	100 µL
	Incubare a temperatura ambiente	10 minuti
STOPPING (reference 1,2)	Inserire la Stopping solution nei pozzetti	100 µL
MISURAZIONE (reference 5)	Letture di piastra ELISA, 450 nm	

Reference

- I reagenti di differenti lotti non devono essere mischiati.
- La precisione e la performance, dipendono, tra le altre cose, dai seguenti 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, 20...25°C).
 - stretto rispetto dell'ordine di aggiunta dei composti nei pozzetti e dei tempi come indicato.
 - il tempo di incubazione del campione, di reazione del coniugato e del substrato come indicato inizia dopo aver aggiunto l'ultimo campione. Il tempo di incubazione non dovrebbe variare di più o meno un 5%.
 - durante il tempo di incubazione e di reazione del coniugato, il tempo impiegato per aggiungere i calibratori/controlli plasma/campioni e/o soluzioni dei coniugati non deve superare i 60 secondi per ogni striscia del kit dell'ELISA (8 pozzetti).
 - durante la reazione con il substrato e allo stopping, il tempo necessario per l'aggiunta del substrato e/o della Stopping Solution non deve superare i 10 secondi per ogni striscia del kit dell'ELISA. Un ridotto tempo di pipettamento potrebbe essere ottenuto utilizzando pipette ripetitive o pipette multicanale.
- Utilizzare il buffer incubazione solo di questa confezione, non utilizzare il tampone incubazione proveniente da altre confezioni. Mantenere il tampone incubazione libero da contaminazioni.
- Ogni striscia del kit ELISA deve essere numerata con pennarello indelebile per evitare ogni errore in caso di errato posizionamento nel telaio durante le varie operazioni
- Dopo l'ultimo lavaggio i pozzetti devono essere completamente aspirati, capovolti e posti su carta da blotting, rimuovendo le gocce rimanenti colpendo delicatamente gli 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.
- Agitare 10 secondi; misurare entro 10 minuti

ATTENZIONI E PRECAUZIONI

- Tutti i prodotti del sangue o del plasma così come tutti i campioni devono essere considerati come potenzialmente infettivi. 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 plasmici 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 (mertiolato). Stare attenti a non ingerire! Evitare il contatto con la pelle o le membrane mucose.

LIMITAZIONI DEL SAGGIO

I campioni che hanno alte concentrazioni di altri autoanticorpi oltre a anti ADAMTS-13 potrebbero risultare debolmente positivi o avere valori borderline.

ANALISI DEI RISULTATI

CALCOLO DEI RISULTATI

Costruzione di una curva standard:

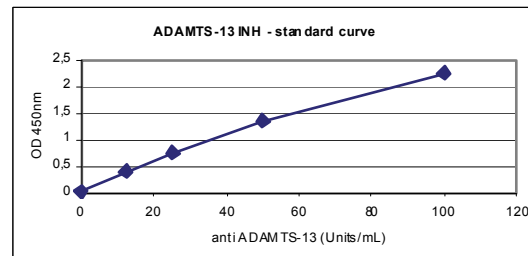
asse delle X: concentrazione di ADAMTS-13 IgG (U/mL).
 asse delle Y: densità ottica a 450 nm.

Il grafico è lineare se calcolato con una regressione lineare o punto per punto.

Calcolo della curva standard:

- Il coefficiente di estinzione del calibratore più alto dovrebbe essere compreso tra 1,0 e 2,5.
- Il coefficiente di estinzione del calibratore più basso dovrebbe essere < 0,1.
- La differenza tra questi due valori dovrebbe essere almeno 1,0.
- La validità del saggio dovrebbe essere controllata sulla base dei valori ottenuti con i controlli.

Esempio di curva standard



Misurazione delle concentrazioni dei campioni

- Calcolare le concentrazioni dalla 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 RIFERENZA

Campioni negativi: < 12 unità/mL

Valore soglia: 12-15 unità/mL

Campioni positivi: > 15 unità/mL

(n=193)

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

Gli standards sono calibrati con un plasma che ha livelli estremamente alti di IgG anti ADAMTS-13. Una diluizione 1:200 di questo plasma di riferimento per definizione contiene una concentrazione di anticorpi di 100 unità/mL. (Unità arbitrarie).

PARAMETRI DI RIFERIMENTO

Di seguito sono riportati i parametri di riferimento. I risultati ottenuti possono differire da un laboratorio all'altro.

PRECISIONE

La riproducibilità è stata determinata analizzando diversi campioni (in serie e giorno per giorno). Sono stati ottenuti i seguenti risultati:

Campione	Intra assay variation		Inter assay variation	
	Campione 1	Campione 2	Campione 1	Campione 2
N	24	24	20	20
Mean (U/mL)	62,9	31,2	75,4	12,8
SD (U/mL)	4,9	0,9	2,7	0,7
CV (%)	7,86%	2,78%	3,54%	5,52%

LINEARITÀ

2 – 104 U/mL

LIMITI DI RILEVAZIONE

1,68 U/mL

LETTERATURA

- Sadler JE. A new name in thrombosis, ADAMTS13. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99: 11552-11554.
- Tsai HM, Li A, Rock G. Inhibitors of von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura. Clin Lab. 2001;47:387-392.
- Fontana S, Hovinga JA, Studt JD et al. Plasma therapy in thrombotic thrombocytopenic purpura: review of the literature and the Bern experience in a subgroup of patients with severe acquired ADAMTS-13 deficiency. Semin Hematol. 2004;41:48-59.
- Klaus C, Plaimauer B, Studt JD et al. Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood. 2004;103:4514-4519.

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

UTILIZAÇÃO

O TECHNOZYM® ADAMTS-13 INH ELISA é um teste para a detecção de auto-anticorpos (IgG) humanos em soro ou plasma contra a ADAMTS-13, a protease que é responsável pela clivagem do vWF involuntariamente grande (ULVWF). A maioria destes auto-anticorpos inibem a actividade da ADAMTS-13 e, portanto, o ULVWF não clivado acumula-se no plasma. Acredita-se que esta é a causa principal para a púrpura trombocitopénica trombótica (TTP). O teste TECHNOZYM® ADAMTS-13 INH permite a diferenciação entre a TTP congénita (polimorfismos de genes) e a adquirida (auto-anticorpos) quando associado a um ensaio de actividade e a um controlo da eficácia da terapia de substituição de plasma.

COMPOSIÇÃO

1. Tiras teste de ELISA (6 para 48 T. e 12 para 96 T.), com 8 poços cada, revestidas com uma forma recombinante da protease da ADAMTS-13. O agente secante é fornecido num saco de alumínio.
2. Tampão de lavagem concentrado(PBS; pH7.3); contém detergente; 0,01% mertiolato; 1 frasco, 80mL.
3. 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.
4. 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.**
5. Plasmas de controlo negativo e positivo, liofilizados, 1 frasco cada, 0,5 mL. **As concentrações são específicas de lote; consulte o rótulo no frasco.**
6. Conjugado: IgG POX anti- humano; corado de azul; 1 frasco, 0,3 mL
7. Substrato cromogénico TMB (Tetrametilbenzidina); 1 frasco; 12 mL; pronto a usar.
8. Solução de paragem; ácido sulfúrico 0,45 mol/L, 1 frasco, 12 mL; pronto a usar.
9. Filme adesivo: para tiras de teste ELISA, 2 unidades.

MATERIAL NECESSÁRIO (não fornecido com o kit)

1. Água destilada
2. Tubos de ensaio para diluir as amostras
3. Proveta (1000 mL)
4. Pipetas de precisão (10, 100 e 1000 µL)
5. Pipeta variável (1000 µL)
6. Pipetas de dispensa e/ou Multicanal (100 e 200 µL)
7. Lavadora de placas de ELISA ou pipeta Multicanal
8. Leitor de ELISA com filtro de 450 nm, e com um filtro de referência de 620 nm se possível.

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

A data de validade impressa nos rótulos aplica-se aos frascos por abrir e armazenados entre + 2 a 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	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

1. Antes de começar o teste, todos os componentes necessários devem estar à temperatura ambiente.
2. 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.
3. 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) **[Não é necessária diluição para os controlos e calibradores!]** Os componentes reconstituídos apresentam-se claros a ligeiramente turvos.
4. Diluição das Amostras: As amostras são diluídas com tampão de incubação (1+100) : Dilua uma parte de amostra com 100 partes de tampão de incubação.

10µL amostra + 1000 µL tampão de incubação (=diluição amostra)

5. 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 20 µL conjugado com 1000 µL tampão de incubação (=diluição conjugado)

EXECUÇÃO DO TESTE

INCUBAÇÃO DA AMOSTRA (referência 1,2)	Pipete os calibradores, plasmas de controlo e amostras diluídos para os poços teste; cubra das tiras com filme.	100 µL
	Incube à temperatura ambiente	60 minutos
LAVAGEM (referência 1,3,4)	Tampão de lavagem	3 x 200 µL
REAÇÃO DO CONJUGADO (referência 1,2)	Pipete a solução de trabalho de conjugado para os poços teste; cubra das tiras com filme.	100 µL
	Incube à temperatura ambiente	60 minutos
LAVAGEM (referência 1,3,4)	Tampão de lavagem	3 x 200 µL
REAÇÃO DO SUBSTRATO (referência 1,2)	Pipete a solução de Substrato para os poços teste; cubra das tiras com filme.	100 µL
	Incube à temperatura ambiente	10 minutos
PARAGEM (referência 1,2)	Pipete a solução de paragem para os poços teste.	100 µL
LEITURA (referência 5, 6)	Leitor de ELISA, 450 nm	

Referências

1. Não devem ser combinados reagentes de lotes diferentes
2. 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, 20 a 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.
 - Use o tampão de incubação de caixa do kit, não use tampão de incubação que sobrou das caixas anteriores. Mantenha o tampão de incubação livre de contaminantes.
3. Marque / numere as tiras com um marcador resistente à água no caso das tiras acidentalmente caírem da armação durante o decorrer do procedimento.
4. 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.
5. Medindo a diferença em comprimento de onda a 450 e 620 nm a precisão do teste é aumentada.
6. Agite durante 10 seg., meça em 10 min.

AVISOS E PRECAUÇÕES

- 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 foi testado e considerado 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 (ácido sulfúrico) 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.

LIMITAÇÃO DO TESTE

As amostras com concentrações elevadas de outros auto-anticorpos , que não anti ADAMTS-13 pode resultar em resultados positivos fracos ou borderline.

RESULTADOS DAS ANÁLISES

CÁLCULO DOS RESULTADOS

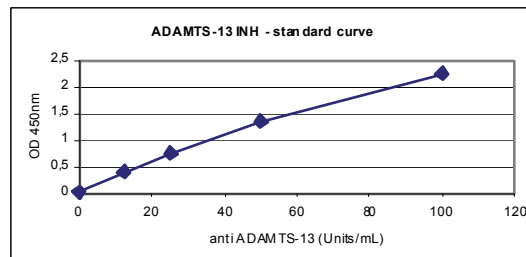
Preparar a curva de referência: eixo X: concentração ADAMTS-13 IgG (U/mL)
eixo Y: Extinção a 450nm

O gráfico é linear-linear com um ajustamento ponto por ponto.

Avaliação da curva de referência

- O coeficiente de extinção do calibrador mais elevado deve situar-se entre 1,0 e 2,5.
- O coeficiente de extinção do calibrador mais baixo deve ser <0,1.
- A diferença de extinção entre estes dois valores devem ser de pelo menos 1,0.
- 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

Amostras negativas: < 12 units/mL

borderline: 12 – 15 units/mL

amostras positivas : > 15 units/mL

(n=193)

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 são calibrados contra um plasma com um título elevado de anti ADAMTS-13 IgG. A diluição 1: 200 deste plasma de referência é definida para conter uma concentração de anticorpo de 100 unidades/ mL. (unidades arbitrárias).

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	24	24	20	20
Média (U/mL)	62,9	31,2	75,4	12,8
SD (U/mL)	4,9	0,9	2,7	0,7
CV (%)	7,86%	2,78%	3,54%	5,52%

INTERVALO DO ENSAIO

2 – 104 U/mL

LIMITE DE DETEÇÃO

1,68 U/mL

LITERATURA

- Sadler JE. A new name in thrombosis, ADAMTS13. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99: 11552-11554.
- Tsai HM, Li A, Rock G. Inhibitors of von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura. Clin Lab. 2001;47:387-392.
- Fontana S, Hovinga JA, Studt JD et al. Plasma therapy in thrombotic thrombocytopenic purpura: review of the literature and the Bern experience in a subgroup of patients with severe acquired ADAMTS-13 deficiency. Semin Hematol. 2004;41:48-59.
- Klaus C, Plaimauer B, Studt JD et al. Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood. 2004;103:4514-4519.

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO

APLICACIÓN

TECHNOZYM® ADAMTS-13 INH ELISA es un test para la detección de autoanticuerpos (IgG) en suero o plasma contra ADAMTS-13, la proteasa responsable de digerir el inusualmente largo vWF (ULVWF). La mayoría de estos autoanticuerpos inhibe la actividad de ADAMTS-13 y por lo tanto, las ULVWF no digeridas se acumulan en el plasma. Se cree que esta es la causa principal de la púrpura trombocitopénica trombótica (TTP). El test TECHNOZYM® ADAMTS-13 INH hace posible diferenciar entre la TTP congénita (polimorfismos de genes) y la adquirida (autoanticuerpos) cuando se une a un ensayo de actividad y para controlar la eficacia de la terapia de intercambio de plasma.

COMPOSICION

- ELISA Tiras de prueba ELISA (6 para 48 T. y 12 para 96 T.), con 8 pocillos cada una; recubiertas con una forma recombinante de la proteasa ADAMTS-13; el agente deshidratante se suministra en una bolsa de aluminio.
- Concentrado de tampón de lavado: (PBS; pH 7,3); containing detergent; 0,01% merthiolate; 1 frasco; 80 mL.
- Tampón de incubación (=diluyente de la muestra): (PBS; pH 7,3); contiene proteína estabilizadora; 0,05% Proclin y colorante; 1 frasco; 90 mL; listo para usarse
- Calibradores (Standards) numerados del 1 al 5; liofilizados; 1 frasco de cada uno; 0,5 mL. **Las concentraciones dependen del lote; consultar la etiqueta en el vial.**
- Positivo y negativo plasma de control, liofilizados; 1 frasco de cada uno; 0,5 mL. **Las concentraciones dependen del lote; consultar la etiqueta en el vial.**
- Conjugado: anti-human-IgG POX; teñido de azul; 1 frasco de cada uno; 0,3 mL
- Cromógeno TMB (tetrametilbenzidina); 1 frasco, 12 mL, listo para usarse
- Solución de parada ; ácido sulfúrico 0,45 mol/L; 1 frasco, 12 mL, listo para usarse
- Película adhesiva para las tiras de pruebas ELISA (2).

MATERIAL NECESARIO (no se suministra con el kit)

- Agua destilada
- Tubos de ensayo para la dilución de las muestras
- Probeta graduada (1000 mL)
- Pipetas de precisión (10, 100 y 1000 µL)
- Pipeta variable (1000 µL)
- Pipetas multicanal y/o dispensadoras (100 y 200 µL)
- Lavador ELISA o pipeta multicanal
- Lector ELISA con filtro de 450 nm (filtro de referencia de 620 nm si resulta disponible.)

ESTABILIDAD Y CONSERVACION

Todos los componentes que contiene el kit se pueden usar hasta la fecha de caducidad indicada si se conservan cerrados a +2...8 °C.

Estabilidad después de la reconstitución/de su apertura:

Material/ Reactivo	Situación	Conservación	Estabilidad
Calibradores, plasma de control	después de la reconstitución	-20 °C	6 meses
Tiras de prueba	después de su apertura	2...8 °C con película adhesiva en una bolsa de plástico con deshidratante	fecha de caducidad
Concentrado de tampón de lavado	después de su apertura	2...8°C	6 meses
Tampón de lavado	Dilución 1+11,5 del concentrado	2...8 °C	3 semanas
Tampón de incubación (=diluyente de la muestra)	después de su apertura	2...8 °C	2 meses
Conjugado	después de su apertura	2...8 °C	6 meses
	solución de empleo	temperatura ambiente	60 minutos
Cromógeno TMB	después de su apertura	2...8 °C	fecha de caducidad

MÉTODO DE LA PRUEBA

PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Material: suero humano o plasma citratado. La muestra de plasma se puede conservar durante 3 horas a temperatura ambiente. Puede mantenerse congelada a -20° C durante varios meses. No pueden congelarse y descongelarse más de 1 vez.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

- Antes de iniciar la prueba, deberán llevarse a temperatura ambiente todos los componentes necesarios.
- Preparar el tampón de lavado: Diluir una parte de volumen de concentrado de tampón de lavado con 11,5 partes de volumen de agua destilada (1+11,5). Mézclase bien! (concentrado de tampón de lavado diluido = tampón de lavado). Pueden producirse precipitaciones cristalinas que se disolverán a 37°C en 10 minutos.
- Calibradores de reconstitución y plasmas de control: Los calibradores y los plasmas de control se reconstituyen con 500 µL de agua destilada y se mezclan durante 10 segundos después de un tiempo de reconstitución de 15 minutos (mezclador Vortex). Los componentes reconstituidos resultan claros o ligeramente turbios.

Calibradores y plasmas de control no diluir

- Dilución de la muestra: la muestras se diluyen con el tampón de incubación (1+100): Diluir 1 parte del volumen de la muestra en 100 partes del volumen del tampón de incubación

10 µL muestra + 1000 µL tampón de incubación (=diluyente de la muestra)

- Preparar la solución de empleo de conjugado (1+50): Diluir 1 parte de volumen de conjugado con 50 partes de volumen de tampón de incubación:

Para 8 pocillos: Mezclar 20 µL de conjugado con 1000 µL de tampón de incubación (=diluyente de la muestra)

MÉTODO DE LA PRUEBA

INCUBACIÓN DE LA MUESTRA (referencia 1,2)	Dispensar calibradores, controles, y muestras diluidos en las tiras de pruebas. Cubrir las tiras de pruebas con una película	100 µL
	Incubar a temperatura ambiente	60 minutos
LAVADO (referencia 1,3,4)	Tampón de lavado	3 x 200 µL
	Pipetear la solución de empleo de conjugado en pocillos. Cubrir las tiras de pruebas con una película	100 µL
REACCION CONJUGADO (referencia 1,2)	Incubar a temperatura ambiente	60 minutos
	Tampón de lavado	3 x 200 µL
LAVADO (referencia 1,3,4)	Pipetear la solución de sustrato de conjugado en pocillos; Cubrir las tiras de pruebas con una película	100 µL
	Incubar a temperatura ambiente	10 minutos
PARADA (referencia 1,2)	Dispensar solución de parada en los pocillos de las tiras de pruebas	100 µL
LECTURA (referencia 5, 6)	Lector ELISA, 450 nm	

Referencias

- No se deben combinar los reactivos de diferentes lotes
- La precisión y reproducibilidad dependen principalmente, entre otras cosas, de los siguientes factores:
 - La mezcla a fondo todas las substancias empleadas en la dilución, 10 seg y luego con vortex.
 - Deben testarse los calibradores, controles y muestras en duplicado
 - La incubación debe llevarse a cabo a las temperaturas indicadas (RT: Temperatura ambiente, 20...25°C)
 - La estricta observancia del orden pipeteo y de los tiempos indicados
 - El tiempo indicado para la incubación de la muestra, la reacción de conjugado y de sustrato se inicia tras pipetear la última muestra. Los tiempos de incubación no deberán variar en más de ±5%.
 - Durante la incubación de la muestra y la reacción de conjugado, el tiempo para pipetear los calibradores/muestras/plasmas de control y/o soluciones de conjugado diluidos, no debe exceder de 60 segundos para la tira de prueba ELISA (8 pocillos).
 - Drante la reacción de sustrato y la parada, el tiempo necesario para pipetear el sustrato y/o la solución parada no debe exceder de 10 segundos por cada tira de prueba ELISA. Se podrán lograr tiempos breves en las pruebas usando pipetas multicanal y dispensadoras.
 - Utilizar el tampón de incubación del kit actual, no utilizar el tampón de incubación restante de otros kits anteriores. Mantener el tampón de incubación libre de contaminantes**
- Indicar el número en las tiras con un lápiz resistente al agua para el caso en de que se desprendan accidentalmente de su sitio durante la realización de la prueba.
- Después del último lavado, los pocillos deben ser aspirados a fondo, darlos la vuelta y colocarlos sobre un papel absorbente; los últimos residuos se deben eliminar golpeando suavemente.
- Midiendo la diferencia entre la lectura a 450 y 620 nm se incrementa la precisión del test..
- Mézclase 10 segundos, medir menos de 10 minutos.

ADVERTENCIA Y PRECAUCIONES

- Todos los productos sanguíneos o plasmáticos, así como las muestras se deben considerar potencialmente infecciosos. Se deben tratar con las debidas precauciones de conformidad con los reglamentos de seguridad biológica vigentes. Los desechos se deberán eliminar como en los hospitales.
- Los calibradores y plasmas de control son fabricados con sangre humana y cada plasma empleado en el procedimiento es HBsAg, HIV 1/2 Ac y HCV-Ac negativo (véanse las etiquetas en el kit y/o en los frascos). No obstante todos los productos procedentes de sangre humana deben manipularse como si fueran potencialmente infecciosos.
- La solución de parada (ácido sulfúrico) puede irritar la piel. En caso de que el ácido alcanzase sus ojos, láveselos inmediatamente y acuda a un médico
- Los reactivos contienen en ocasiones agentes conservantes (merthiolate). NO DEBE SER INGERIDO! Evítese el contacto con la piel o membranas mucosas.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

Las muestras con elevadas concentraciones de otros autoanticuerpos diferentes a anti ADAMTS-13 pueden presentar resultados positivos débiles o dudosos.

RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS

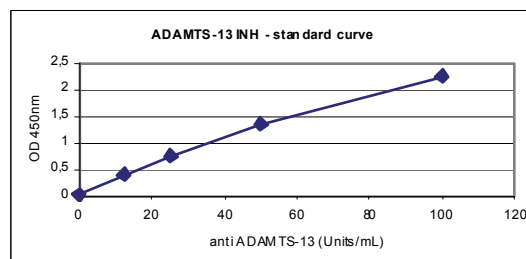
CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Trazado de una curva de referencia: Eje.x: concentración anti ADAMTS-13 IgG (U/mL)
Eje y: Extinción

La curva de referencia es lineal-lineal con un ajuste lineal o punto a punto.

- Evaluación de la curva de referencia:
- El coeficiente de extinción del calibrador más alto debería estar entre 1.0 y 2.5.
- El coeficiente de extinción del calibrador más bajo debería ser < 0.1.
- La diferencia de extinción entre estos dos valores debería ser al menos de 1.0.
- La validez de la prueba se puede comprobar sobre la base de los valores de control calculados.

Ejemplo de curva estándar:



- Medida de la concentración de las muestras :**
- Léase la concentración en la curva de referencia.
- En caso de haber muestras con mayores coeficientes de extinción que el punto estándar más elevado en la curva, tendrán que ser diluidos previamente con tampón de incubación (1+1 o 1+3). La concentración medida tiene que multiplicarse por el factor 2 o 4 de dilución respectivamente.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS / RANGO DE REFERENCIA

Negativo: < 12 Unidades /mL
Zona Gris: 12 – 15 Unidades /mL
Positivo: > 15 Unidades /mL
(n=193)

Se recomienda que los distintos laboratorios establezcan su propio rango de referencia. Cuando se interpreten los resultados sexológicos de un paciente se tiene que tener en cuenta su historia clínica.

ESTANDARDIZACIÓN

Los estándares se calibran contra un plasma con un título muy alto de anti ADAMTS-13 IgG. Una dilución 1:200 de este plasma de referencia debería contener una concentración de 100 Unidades/mL (unidades arbitrarias).

CARACTERÍSTICAS DE FUNCIONAMIENTO

Los datos de funcionamiento del kit se presentan abajo. Los resultados obtenidos en laboratorios independientes pueden diferir.

PRECISIÓN

La reproducibilidad se determinó con diferentes muestras (en series y día a día). Se obtuvieron los siguientes resultados:

Muestra	Intra assay variation		Inter assay variation	
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
N	24	24	20	20
Mean (U/mL)	62,9	31,2	75,4	12,8
SD (U/mL)	4,9	0,9	2,7	0,7
CV (%)	7,86%	2,78%	3,54%	5,52%

RANGO DEL TEST

2 – 104 U/mL

LÍMITE DE DETECCIÓN

1,68 U/mL

BIBLIOGRAFÍA

- Sadler JE. A new name in thrombosis, ADAMTS13. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99: 11552-11554.
- Tsai HM, Li A, Rock G. Inhibitors of von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura. Clin Lab. 2001;47:387-392.
- Fontana S, Howings JA, Studd JD et al. Plasma therapy in thrombotic thrombocytopenic purpura: review of the literature and the Bern experience in a subgroup of patients with severe acquired ADAMTS-13 deficiency. Semin Hematol. 2004;41:48-59.
- Klaus C, Plaimauer B, Studd JD et al. Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood. 2004;103:4514-4519.

DESCRIPTION DU PRODUIT

UTILISATION PRÉVUE

Le TECHNOZYM® ADAMTS-13 INH ELISA est un test pour la détection dans le plasma ou le sérum des auto anticorps humains dirigés contre ADAMTS-13. Cette protéase a pour rôle la régulation de la taille des multimères anormalement grands du facteur de von Willebrand. La plupart de ces auto anticorps inhibent l'activité de clivage d'ADAMTS-13, ce qui résulte en l'accumulation de multimères anormalement grands du facteur de von Willebrand dans le plasma. Les auto anticorps sont considérés comme étant la principale cause du Purpura thrombotique thrombocytopenique. Le TECHNOZYM® ADAMTS-13 INH ELISA permet de contrôler l'efficacité de la thérapie d'échange plasmatique, et de différencier la forme congénitale et celle acquise de la maladie quand il est couplé à un test d'activité d'ADAMTS-13.

CONTENU

1. (6 pour 48 T. et 12 pour 96 T.) bandelettes de test ELISA contenant 8 puits chacune, recouvertes d'une protéine ADAMTS-13 recombinante et emballées dans un sac d'aluminium.
2. Tampon de lavage concentré: (PBS; pH 7,3); contient du détergent; 0,01% Merthiolate; 1 flacon 80 mL.
3. Tampon d'incubation: (=Tampon de dilution) (PBS ; pH 7,3);contient des stabilisateurs protéiques; 0,05% proclin; et colorant; 1 bouteille 90 mL prête à l'emploi.
4. Calibrateurs numérotés 1-5; lyophilisés; fournis chacun dans un flacon de 0,5 mL.
Les concentrations sont dépendantes du lot; consulter les étiquettes sur les flacons.
5. Les contrôles plasmatiques positif et négative sont lyophilisés et fournis chacun dans un flacon de 0,5mL .
Les concentrations sont dépendant du lot; consulter les étiquettes sur les fioles.
6. Conjugué : Anticorps anti-anticorps humain IgG de couleur bleu marqués à la peroxydase, dans une fiole, 0,3 mL.
7. Chromogène TMB (tétraméthylbenzidine); 1 bouteille, 12 mL ; prêt à l'emploi.
8. Solution d'arrêt: acide sulfurique 0,45 mol/L; 1 bouteille 12 mL; prêt à l'emploi.
9. 2 films adhésifs pour couvrir les bandes de tests ELISA.

MATÉRIEL REQUIS (non fourni avec le kit)

1. Eau distillée
2. Tubes de dilution pour les échantillons
3. Eprouvette graduée de 1000 mL
4. Pipettes de précision (10, 100, 1000 µL)
5. Pipette variable (1000 µL)
6. Pipettes multi canal (100, 200 µL)
7. Automate de lavage ELISA ou pipette multi canal.
8. Lecteur de plaque ELISA équipée d'un filtre à 450 nm et si possible d'un filtre de référence à 620 nm.

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
Calibrateurs et contrôles	après reconstitution	-20 °C	6 mois
Bandelettes de test ELISA	Après ouverture	2 ... 8 °C sous film adhésif avec agent détreissant dans un sac en plastique	Date de péremption
tampon de lavage concentré	Après ouverture	2 ...8°C	6 mois
tampon de lavage	1+11,5 dilution du concentré	2 ... 8 °C	3 semaines
tampon d'incubation (Tampon de dilution)	Après ouverture	2 ... 8 °C	2 mois
Conjugué	Après ouverture	2 ... 8 °C	6 mois
	Solution conjugué prête à l'emploi	Température ambiante	60 minutes
substrat TMB	Après ouverture	2 ... 8 °C	Date de péremption

PROCÉDURE DU TEST

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Matériel: Sérum humain ou plasma citrate. Les échantillons peuvent être stockés 3 heures maximum à température ambiante. À -20°C ils peuvent être stockés pendant plusieurs mois. Les échantillons ne doivent pas être congelés et dégelés plusieurs fois de suite.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

1. Tous les composants doivent être amenés à la température ambiante avant de commencer le test.
2. Préparation du tampon de lavage: Diluer 1 vol de tampon de lavage concentré avec 11,5 vol d'eau distillée (1+11,5). Bien mélanger! Il se peut qu'il y ait des précipitation cristallines: celles-ci se dissolvent à 37°C en 10 minutes à température ambiante.
3. Reconstitution des calibrateurs et des contrôles plasmatiques: Les calibrateurs et les contrôles plasmatiques sont reconstitués avec 500 µL d'eau distillée et mélangés pendant 10 secondes après 15 minutes de temps de reconstitution. Les composants ainsi reconstitués sont claires ou très légèrement troubles.

Les calibrateurs et contrôles ne doivent pas être dilués!

4. Dilution de échantillons : Les échantillons doivent être dilués avec le tampon de dilution (1+100): 1 volume d'échantillon est dilué dans 100 volumes de tampon de dilution.

10 µL échantillon+ 1000 µL de tampon d'incubation (=Tampon de dilution)

5. Préparer la solution conjugué prête à l'emploi (1+50): Diluer 1 vol de solution de conjugué concentré avec 50 vol de tampon d'incubation.

Pour 8 puits de test: Mélanger 20 µL de conjugué concentré avec 1000 µL de tampon d'incubation (=Tampon de dilution)

PERFORMANCE DU TEST

INCUBATION DE L'ÉCHANTILLON (références 1, 2)	Pipeter les calibrateurs, contrôle plasmatiques et échantillons dilués dans les puits. Couvrir les bandelettes avec un des 2 films.	100 µL
	Incuber à température ambiante	60 minutes
LAVAGE (référence 1,3,4)	TAMPON DE LAVAGE	3 x 200 µL
RÉACTION DU CONJUGAT (référence 1,2)	Pipeter la solution de conjugué prête à l'emploi dans les puits, couvrir les bandelettes de test avec un film.	100 µL
	Incuber à température ambiante	60 minutes
LAVAGE (référence 1,3,4)	TAMPON DE LAVAGE	3 x 200 µL
RÉACTION DU SUBSTRAT (référence 1,2)	pipeter la solution de substrat dans chaque puit. Couvrir les bandelettes avec un film.	100 µL
	Incuber à température ambiante	10 minutes
SOLUTION D'ARRÊT (référence 1,2)	pipeter la solution d'arrêt dans les puits	100 µL
MEASURE (référence 5)	Lecteur de plaque ELISA, 450 nm	

Références:

1. Ne pas utiliser ensemble des réactifs provenant de différents lots.
2. Le bon déroulement et la précision du test dépendent des facteurs suivants:
 - Bien mélanger les substances utilisées lors des dilutions
 - Les standards, les contrôles et les échantillons doivent être testés en duplicat.
 - Les incubations doivent être effectuées à la bonne température.
 - Respecter strictement l'ordre de pipetage et le temps 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 de l'échantillon et la réaction du conjugué, le temps nécessaire au pipetage du calibrateur/échantillon/contrôle plasmatique dilué et/ou des solutions de conjugué, ne doivent pas excéder 60 secondes par bandelette 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 ne doit pas excéder 10 secondes par bandelette. Pour cela utiliser de préférence une pipette multi canal.
 - **Utiliser le tampon d'incubation inclus dans coffret, ne pas utiliser de tampon d'incubation des boîtes précédemment ouvertes. Le tampon d'incubation doit être conservé à l'abri de tous contaminants.**
3. Numérotier les bandelettes avec un feutre résistant à l'eau au cas où les bandes tombent accidentellement de la plaque durant le test.
4. Après le dernier lavage, les puits doivent être rigoureusement secs : Pour cela positionner la plaque d'analyse sur du papier absorbant et taper doucement la plaque d'analyse
5. Mesurer l'absorbance à 450 et 620 nm ou à 450 et 690 nm, la précision du test est alors Augmentée
6. Secouer 10 sec., Mesurer dans un intervalle de 10 minutes

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- Tous les produits élaborés à partir de sang humain et de plasma 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 tout plasma utilisé lors du test est HBS Ag, HIV 1/2 et HCV-Ag négatifs (voir les étiquettes sur le kit et/ou sur les bouteilles).
- 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 distillée et consulter un docteur.
- Les réactifs contiennent des agents préservant (Merthiolate). Ne pas avaler! Éviter tout contact avec la peau ou les muqueuses.

LIMITES DU TEST

Les échantillons avec des concentrations élevés d'auto anticorps autres que ceux dirigés contre ADAMTS-13 peuvent être considérés comme étant faiblement positifs ou dans la zone limite.

RÉSULTATS DU TEST

CALCUL DES RÉSULTATS

Établissement de la courbe de référence: Axe X: Concentration d'anti ADAMTS-13 IgG (U/mL)

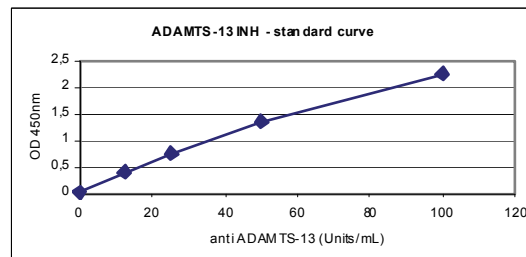
Axe Y: Absorbance

Le graphique est linéaire-linéaire.

Évaluation de la courbe de référence:

- Le coefficient de la courbe d'extinction du calibrateur le plus grand devrait se situer entre 1,0 et 2,5.
- Le coefficient d'extinction du plus faible calibrateur doit être <0,1.
- La différence de coefficients d'extinction entre ces 2 valeurs doit être au moins égale à 1,0.
- La validité du test doit être vérifiée sur la base des valeurs calculées des contrôles

Exemple de courbe de référence :



Mesure des concentrations des échantillons:

- Lire la concentration à partir de la courbe de référence.
- Si des échantillons présentent un coefficient d'extinction supérieur à celui du plus haut point de la courbe de référence, ils doivent alors être pré dilués avec le tampon d'incubation (1+1 ou 1+3), et la concentration mesurée doit alors être multipliée par 2 ou 4.

INTERPRETATION DES RESULTATS / GAMME DE REFERENCE

Négatif: < 12 U/mL

Zone limite: 12 – 15 U/mL

Positif: > 15 U/mL

(n=193)

Il est recommandé que chaque laboratoire établisse sa propre gamme de référence. Lors de l'interprétation des résultats l'histoire ainsi que le profil pathologique du patient doivent être pris en compte.

STANDARDISATION

Les standards sont calibrés contre un plasma ayant un titre très élevé d'auto anticorps dirigés contre ADAMTS-13. Une dilution au 200e de ce plasma référence est définie comme ayant une concentration d'auto anticorps de 100U/mL.

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	
	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 1	Echantillon 2
N	24	24	20	20
Mean (U/mL)	62,9	31,2	75,4	12,8
SD (U/mL)	4,9	0,9	2,7	0,7
CV (%)	7,86%	2,78%	3,54%	5,52%

LINÉARITÉ

2 – 104 U/mL

LIMITES DE DETECTION

1,68 U/mL

LITTÉRATURE

- Sadler JE. A new name in thrombosis, ADAMTS13. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99: 11552-11554.
- Tsai HM, Li A, Rock G. Inhibitors of von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura. Clin Lab. 2001;47:387-392.
- Fontana S, Hovinga JA, Studt JD et al. Plasma therapy in thrombotic thrombocytopenic purpura: a review of the literature and the Bern experience in a subgroup of patients with severe acquired ADAMTS-13 deficiency. Semin Hematol. 2004;41:48-59.
- Klaus C, Plaimauer B, Studt JD et al. Epitope mapping of ADAMTS13 autoantibodies in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood. 2004;103:4514-4519.