

american diagnostica inc.

500 West Avenue, Stamford, CT 06902
Tel. (203) 602-7777 • Fax. (203) 602-2221



ENGLISH

IMUBIND® ADAMTS13 ELISA

REF 813



EC **REP**

american diagnostica GmbH
Kaplaneigasse 35, D-64319 Pfungstadt, Germany

INTENDED USE

The IMUBIND® ADAMTS13 ELISA is intended for the measurement of ADAMTS13 protein in human plasma. The assay is limited to For Research Use Only in the United States.

EXPLANATION OF THE TEST

ADAMTS13, also known as von Willebrand Factor (vWF) cleaving protease, is a zinc metalloproteinase that cleaves ultra large vWF multimers (UL-vWF) between Tyr(1605)-Met(1606), located in the A2 region of vWF.¹ Studies have shown that low levels of ADAMTS13 activity are associated with Thrombotic Thrombocytopenia Purpura (TTP), a life-threatening hematological condition characterized by low platelet count, microvascular thrombi, red cell fragmentation, CNS and renal complications.^{2,3} A deficiency of ADAMTS13 activity (<5%) can lead to an accumulation of UL-vWF multimers.⁴ The UL-vWF multimers bind to receptors on platelets inducing platelet aggregation and formation of intravascular thrombi.

Congenital TTP is a rare inherited disorder resulting from mutations in the ADAMTS13 gene. Genetic alterations have been identified at many sites within the ADAMTS13 gene, which can lead to the production of non-functional ADAMTS13 protein.^{5,6} The acquired form of TTP is an autoimmune-like disorder caused by the development of autoantibodies to ADAMTS13 that inhibit its activity and may cause a reduction in antigen levels.⁷⁻⁹

PRINCIPLE OF THE METHOD

Diluted plasma samples are added to microwells coated with a monoclonal antibody that binds to ADAMTS13. During an incubation period, ADAMTS13 in a sample binds to the antibody coated to the wells. Following a washing step, a biotinylated rabbit anti-ADAMTS13 polyclonal antibody is added to the microwells, which binds to ADAMTS13 protein captured on the plate during a short incubation period. A streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (SA-HRP) is added to the microwells to complete the formation of the antibody-enzyme detection complex. Following another washing step, the addition of a perborate-3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrate and its subsequent reaction with the HRP present generates a blue colored solution. The reaction is stopped by adding sulfuric acid, which turns the solution color yellow. Measuring the solution absorbance at 450 nm and extrapolating the value with those of a standard curve determines the level of ADAMTS13 in the diluted plasma sample.

REAGENTS

- R1 **Antibody Coated Microwells**, 96, with acetate cover sheet
- R2 **Assay Buffer**, 15 mL, 2 vials (lyophilized)
- R3 **ADAMTS13 Standard**, 100 ng/mL, 0.6 mL, 2 vials (lyophilized)
- R4 **Positive Control**, 0.25 mL, 2 vials (lyophilized)
- R5 **Detection Antibody**, biotinylated rabbit anti-human ADAMTS13 IgG, 120 µL
- R6 **Enzyme Conjugate**, SA-HRP, 120 µL
- R7 **Substrate**, TMB, 11 mL
- R8 **Wash Buffer**, PBS with 0.05% Tween 20, pH 7.4, 1 L (lyophilized)

WARNING

Source material for some of the reagents in this kit is of human origin. This material has been found to be non-reactive for Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg), Hepatitis C Virus (HCV) and Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Type 2 (HIV-1, HIV-2) using FDA approved methods. As no known test method provides complete assurance that products derived from human blood will not transmit HBsAg, HCV, HIV-1, HIV-2 or other blood-borne pathogens, reagents should be handled as recommended for any potentially infectious human specimen. Discard all waste associated with test specimens and human source reagents in a biohazard waste container.

Limited for research use only in the United States. For *in vitro* use only. Not for internal use in humans or animals. Do not use the kit components beyond the stated expiration date. Do not mix reagents from different kits. Avoid microbial contamination of the reagents. Do not smoke, eat or drink in areas in which specimens or kit reagents are handled. Do not pipette reagents by mouth. Wear laboratory coat and disposable gloves throughout the test procedure and wash hands thoroughly afterwards. Avoid splashing or aerosol formation.

REAGENT PREPARATION AND STORAGE

Unopened and lyophilized reagents are stable until the expiration date printed on the box when stored as instructed.

- R1 **Antibody Coated Microwells**: Once removed from the foil pouch, the microwell strips must be used within 30 minutes. Unused strips may be stored at 2°-8°C for 4 weeks when sealed in the original pouch with the desiccant present and protected from moisture.
- R2 **Assay Buffer**: Reconstitute with 15 mL of filtered deionized/distilled water. Gently mix the contents of the vial. Assay Buffer may be used for up to 4 weeks when stored at 2°-8°C.
- R3 **ADAMTS13 Standard**: Reconstitute with 0.6 mL of Assay Buffer. Standard may be aliquoted and stored at -20°C for up to 6 months. The standard is prepared from normal plasma calibrated against a recombinant ADAMTS13.

R4 **Positive Control**: Reconstitute with 0.25 mL of Assay Buffer. Once reconstituted, the control may be stored for up to 4 weeks at -20°C.

R5 **Detection Antibody**: Supplied as a concentrate, dilute the Detection Antibody 1:100 with Assay Buffer just prior to use. For using all 96 microwells at one time, dilute 100 µL of Enzyme Conjugate to 10 mL in Assay Buffer. If all 96 microwells are not to be used, dilute 20 µL of Enzyme Conjugate to 2 mL in Assay Buffer for each 16-microwell strip that will be used. Working strength Detection Antibody is stable for 4 hours at 2°-8°C. Discard any unused working strength Detection Antibody.

R6 **Enzyme Conjugate, SA-HRP**: Supplied as a concentrate, dilute the Enzyme Conjugate 1:100 with Assay Buffer just prior to use. For running all 96 microwells at one time, dilute 100 µL of Enzyme Conjugate to 10 mL in Assay Buffer. If all 96 microwells are not to be used, dilute 20 µL of Enzyme Conjugate to 2 mL in Assay Buffer for each 16-microwell strip that will be used. Working strength Enzyme Conjugate is stable for 2 hours at 2°-8°C. Discard any unused working strength Enzyme Conjugate.

R7 **Substrate, TMB**: Supplied ready to use. It may be used until the expiration date stated on the vial when stored in the dark at 2°-8°C.

R8 **Wash Buffer**: Dissolve the contents of the packet with 1 L of filtered deionized/distilled water. After reconstitution, the Wash Buffer may be used for up to 4 weeks when stored at 2°-8°C.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Only citrate collected platelet poor plasma may be used for this assay. Do Not Use EDTA collected plasma. See "Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays; Approved Guidelines-Fourth Edition", NCCLS Document H21-A4, Vol. 23, No. 35, December 2003. Plasma collection should be performed as follows:

1. Collect 9 parts of blood into 1 part of 3.2% (0.109 M) trisodium citrate anticoagulant solution.
2. Centrifuge the blood sample at 10,000 x g for 15 minutes.
3. Plasma should be stored at 2°-8°C and assayed within 4 hours. Alternatively, plasma may be stored at -20°C for up to 6 months.
4. Frozen plasma should be thawed rapidly at 37°C. Thawed plasmas should be stored at 2°-8°C and assayed within 4 hours.

PROCEDURE

Materials Provided – See Reagents

Material Required But Not Provided

0.22 µm filtered deionized H₂O
50-300 µL eight channel multi-pipette
0-20 µL, 20-200 µL, 200-1000 µL single pipettes
microwell plate reader for reading absorbance at 450 nm
microwell plate orbital shaker
microwell plate washer (optional)
0.5 M H₂SO₄ **Caution:** Handle sulphuric acid with great care. Avoid any skin and eye contact. Wear protection glasses and gloves when handling.

Preparing ADAMTS13 Standards

1. Open the foil pouch and remove the microwell strips/frame assembly. Remove the strips that will not be used, return them to the foil pouch and tightly reseal the pouch with the desiccant inside. Store the foil pouch at 2 - 8°C.
2. Reconstitute the ADAMTS13 Standard as instructed under REAGENT PREPARATION. Prepare five (5) serial dilutions of the standard as follows. Add 200 µL of Standard to microwells A1/A2. Add 100 µL of Assay Buffer to microwells B1/B2 – F1/F2.
3. Prepare 5 serial dilutions of the ADAMTS13 Standard as follows. Add 200 µL of the standard to microwells A1/A2. Add 100 µL of Assay Buffer to microwells B1/B2-F1/F2. Serially dilute the standard by pipetting 100 µL of the standard from microwells A1/A2 into microwells B1/B2. Mix and pipette 100 µL from wells B1/B2 to wells C1/C2. Repeat this process through wells F1/F2. Remove and discard 100 µL from wells F1/F2. The concentrations of the serially diluted standard will be 100, 50, 25, 12.5, 6.25 and 3.12 ng/mL respectively. For a standard of 0 ng/mL, add 100 µL of Assay Buffer to microwells G1/G2.

Assay Procedure

4. Dilute each plasma sample 1:20 (1 part plasma + 19 parts Assay Buffer). Add 100 µL of Positive Control or diluted sample to a microwell, cover with the acetate sheet provided and incubate for 1 hour at 37°C.
5. Empty the contents of the microwells and wash 4 times with Wash Buffer. Washing may be performed using a microwell plate washer or manually. For manual washing, fill the wells with Wash Buffer with a pipette or squeeze bottle then empty and remove droplets by tapping the plate 4-5 times face down against absorbing material.
6. Add 100 µL of Detection Antibody to each microwell, cover with the acetate sheet and incubate for 30 minutes at room temperature (18-25°C) on an orbital microwell plate shaker with agitation (at 250 rpm).

7. Wash the wells by repeating Step 5.
8. Add 100 µL of working strength Enzyme Conjugate to each microwell, cover with the acetate sheet and incubate for 30 minutes at room temperature (18-25°C) on an orbital microwell plate shaker with agitation (at 250 rpm).
9. Wash the wells by repeating Step 5.
10. Add 100 µL of Substrate to each microwell immediately after the wash step, cover the wells with the acetate sheet and incubate for 5 minutes at room temperature (18° - 25°C), during which time the substrate will turn blue.
11. Stop the enzymatic reaction by adding 50 µL of 0.5M H₂SO₄ to each microwell. Add the acid with the same speed and order as you added the substrate. Tap the sides of the microwell frame to ensure even distribution of the H₂SO₄. The solution color will turn yellow. Read the absorbances using microwell plate reader set to a wavelength of 450 nm within 10 minutes.

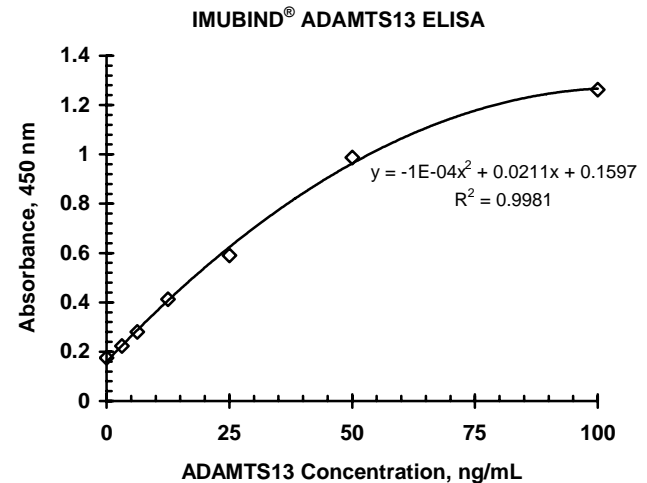
QUALITY CONTROL

The Positive Control plasma should be included each time the assay is performed.

RESULTS

Construct a standard curve by plotting the mean absorbance value for each standard versus its corresponding concentration of ADAMTS13. A standard curve should be generated each time the assay is performed. The following standard curve is for demonstration purposes only.

Representative Standard Curve



CALCULATIONS

Determine the amount of ADAMTS13 in the diluted plasma sample by interpolating directly from the standard curve. Since the unknown plasma sample is diluted 1:20 during preparation, multiply the results by 20 in order to obtain the concentration of ADAMTS13 in the neat plasma sample. The calculation is,

$$[\text{ADAMTS13}]_{\text{Plasma Sample}} = [\text{ADAMTS13}]_{\text{Diluted Test Sample}} \times 20$$

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Platelet contamination in plasma samples will interfere with the assay results. Plasma samples must be free of platelets in order to have a valid result. Exercise great care to minimize disruption of the platelet pellet while recovering the platelet poor plasma. Samples should not be frozen and thawed more than two (2) times.

Samples should not be collected with EDTA as the anticoagulant. Icteric, lipemic and hemolyzed samples may interfere with the assay.

EXPECTED VALUES

The mean level of ADAMTS13 in citrated plasma from normal donors (n=49) was determined to be 740 ± 110 ng/mL.⁸ Each laboratory should establish its own normal range using the local population.

In plasma from patients with acquired TTP, the mean level of ADAMTS13 was determined to be 244 ± 121 ng/mL (n=16), significantly lower than the normal level. Some patients with congenital TTP had ADAMTS13 levels below the limit of detection of the ELISA.^{9,10}

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

PRECISION

The intra- and inter-assay coefficients of variations (CV) for this ELISA have been found to be 4.0% and 7.3% respectively.

SPECIFICITY

The capture and detection antibodies are highly specific for human ADAMTS13.

BIBLIOGRAPHY

1. Furlan, M., Robles, R. and Lämmle, B. L. *Blood* 1996, **87**: 4223-4234.
2. Tsai, H. M. *Blood* 1996, **87**: 4235-4244.
3. Furlan, M., *et al.* *N Engl J Med* 1998, **339**: 1578-1584.
4. Moake, J. L., *et al.* *N. Engl J Med* 1982, **307**: 1432-1435.
5. Zheng X, *et al.* *J Biol Chem* 2001, **276**: 41059-41063.
6. Levy, G. G., Nichols, W. C. and Lian, E. C. *Nature* 2001, **413**: 488-494.
7. Tsai, H. M., Rice, L. and Sarode, R. *Ann Intern Med* 2000, **132**: 794-799.
8. Unpublished data from American Diagnostica Inc.

9. Peyvandi, F., *et al.* *Brit J Haematol* 2004, **127**: 433-439.

10. Starke, R., *et al.* *Brit J Haematol* 2006, **136**: 649-655.

DEUTSCH

VERWENDUNGSZWECK

Der IMUBIND® ADAMTS13 ELISA ist ein Test zur Bestimmung von ADAMTS13 Antigen in humanem Plasma. Der Test darf in den Vereinigten Staaten nur für Forschungszwecke (RUO) verwendet werden.

ERKLÄRUNG DES TESTVERFAHRENS

ADAMTS13, auch als Willebrand Factor (vWF) spaltende Protease bekannt, ist eine Zink Metalloproteinase die ultragroße vWF Multimere (UL-vWF) zwischen dem Tyr(1605) und dem Met(1606) Rest in der A2 Region des vWF Moleküls spaltet.¹ Studien haben gezeigt dass niedrige Konzentrationen an ADAMTS13 Aktivität mit dem Krankheitsbild der Thrombotisch-Thrombozytopenischen Purpura (TTP) assoziiert sind. Dieses lebensbedrohliche hämatologische Krankheitsbild ist durch eine geringe Thrombozytenzahl, mikrovaskuläre Thrombosen, Fragmentierung der roten Blutkörperchen, sowie ZNS-Symptomatik und renale Störungen charakterisiert.^{2,3} Ein ADAMTS13 Aktivitätslevel unter 5% des Normalniveaus kann zu einer Anhäufung von UL-vWF Multimeren im Plasma führen.⁴ Diese UL-vWF Multimere binden an Thrombozyten-Rezeptoren und führen so zu einer Thrombozytenaggregation und intravaskulären Thrombosen.

Die familiäre TTP ist eine seltene vererbare Krankheit, die auf Mutationen innerhalb des ADAMTS13 Gen beruht. Genetische Veränderungen wurden an vielen Stellen innerhalb des ADAMTS13 Gens lokalisiert, wodurch nicht-funktionales ADAMTS13 Protein gebildet wird.^{5,6} Die erworbene TTP-Form ist eine Autoimmun-Krankheit die durch inhibitorische ADAMTS13 Autoantikörper, die die Enzymaktivität hemmen, hervorgerufen wird.⁷ Neuere Studien haben Patienten mit klinischen TTP Symptomen identifiziert die normale ADAMTS13 Konzentrationen aufweisen, sowie Patienten mit einer geringen ADAMTS13 Aktivität die aber keine TTP Symptomatik haben.⁸ Dies bedeutet dass neben ADAMTS13 auch andere biologische Faktoren bei der TTP eine Rolle spielen können.

TESTPRINZIP

Verdünnte Plasmaproben werden in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen gegeben, die mit einem polyklonalem (Kaninchen-) Fängerantikörper gegen ADAMTS13 beschichtet sind. Während der anschließenden Inkubation bindet das in der Probe vorliegende ADAMTS13-Antigen an den Antikörper. Nach dem Waschen wird ein biotinylierter polyklonaler (Kaninchen-) Detektionsantikörper der gegen ADAMTS13 gerichtet ist zugegeben. Während einer kurzen Inkubationszeit bindet der Antikörper an das an die Platte gebundene ADAMTS13. Anschließend wird der biotinylierte Zweitantikörper durch ein Streptavidin – Meerrettichperoxidase (SA-HRP) Konjugat nachgewiesen. Nach

einem weiteren Waschschrift wird das Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin Perborat (TMB) zugegeben. Dieses wird durch die HRP umgesetzt, was zu einer Blaufärbung führt. Durch Zugabe von Schwefelsäure wird die Reaktion gestoppt und die Färbung schlägt von blau nach gelb um. Die ADAMTS13 Werte werden durch Messung der optischen Dichte bei 450 nm anhand der mitgeführten Standardkurve ermittelt.

REAGENZIEN

- R1 **Antikörper-beschichtete Mikrotiterstreifen**, 96 Vertiefungen, mit Acetat-Abdeckfolie
- R2 **Testpuffer**, 15 mL, 2 Fläschchen (lyophilisiert)
- R3 **ADAMTS13 Standard**, 100 ng/mL, 0.6 mL, 2 Fläschchen (lyophilisiert)
- R4 **Positiv-Kontrolle**, 0.25 mL, 2 Fläschchen (lyophilisiert)
- R5 **Detektions-Antikörper**, biotyniliertes Kaninchen anti-human ADAMTS13 IgG, 120 µL
- R6 **Enzymkonjugat**, SA-HRP, 120 µL
- R7 **Substrat**, TMB, 11 mL
- R8 **Waschpuffer**, PBS mit 0.05% Tween 20, pH 7.4, 1 L (lyophilisiert)

WARNUNG

Ausgangsmaterialien für einige der im Kit enthaltenen Reagenzien sind humanen Ursprungs. Diese wurden auf Hepatitis B Oberflächenantigene (HBsAg), Hepatitis C Virus (HCV) und Humanes Immundefizienzvirus Typ 1 und 2 (HIV-1 und HIV-2) mit FDA zugelassener Methode getestet und für nicht-reaktiv befunden. Da sich die Übertragung von HBsAg, HCV, HIV-1, HIV-2 und anderen im Blut zirkulierenden Infektionserregern durch Humanblutprodukte derzeit mit keiner bekannten Testmethode mit völliger Sicherheit ausschließen lässt, müssen diese Reagenzien wie potenziell infektiöse Humanproben gehandhabt werden.

In den USA darf dieses Produkt nur für Forschungszwecke verwendet werden. Nur für die *in vitro* Verwendung geeignet. Keine Verwendung in Mensch oder Tier. Keine Kitkomponenten nach dem Verfallsdatum verwenden. Keine Reagenzien aus verschiedenen Kits zusammen verwenden. Mikrobielle Kontamination der Kitkomponenten vermeiden. Bei der Arbeit nicht rauchen, essen und trinken. Nicht mit dem Mund pipettieren. Spritzen oder Aerosolbildung vermeiden.

REKONSTITUTION DER REAGENZIEN UND LAGERUNG

Ungeöffnete und lyophilisierte Reagenzien sind - wenn sie wie angegeben gelagert werden - bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatum stabil.

- R1 **Antikörper-beschichtete Mikrotiterstreifen**: die Mikrotiterstreifen müssen innerhalb von 30 min nach Entnahme aus dem Folienbeutel verwendet werden. Nicht verwendete Streifen können bei 2° - 8°C bis zu 4 Wochen gelagert werden, wenn diese in dem verschlossenen Folienbeutel zusammen mit dem Trocknungsmittel unter Ausschluss von jeglicher Feuchtigkeit gelagert werden.

- R2 **Testpuffer**: mit 15 mL gefiltertem deionisierten bzw. destillierten Wasser rekonstituieren und vorsichtig mischen. Der Testpuffer ist bei Lagerung bei 2-8°C bis zu 4 Wochen haltbar.

- R3 **ADAMTS13 Standard**: mit 0.6 mL Testpuffer rekonstituieren. Der Standard kann aliquotiert bei -20°C bis zu 6 Monate gelagert werden. Der Standard ist ein verdünntes Normalplasma, das gegen rekombinantes ADAMTS13 kalibriert wurde.

- R4 **Positiv-Kontrolle**: mit 0.25 mL Testpuffer rekonstituieren. Die Positiv-Kontrolle entspricht einem 1:10 verdünnten Normalplasma. Nach Rekonstitution kann die Positiv-Kontrolle bei -20°C bis zu 4 Wochen gelagert werden.

- R5 **Detektions-Antikörper**: das konzentrierte Detektions-Antikörper wird kurz vor Gebrauch 1:100 mit Testpuffer verdünnt. Bei Verwendung der ganzen Mikrotiter-Platte, 100 µL Detektions-Antikörper in 10 mL Testpuffer verdünnen. Wenn nicht alle 96 Microwells verwendet werden, dann werden pro 16 Vertiefungen (1 Riegel) 20 µL Detektions-Antikörper in 2 mL Testpuffer verdünnt. Diese Enzymkonjugatlösung ist bei 2-8°C für 4 Stunden stabil. Nach Gebrauch das verdünnte Detektions-Antikörper verwerfen.

- R6 **Enzymkonjugat, SA-HRP**: das konzentrierte Enzym-Konjugat wird kurz vor Gebrauch 1:100 mit Testpuffer verdünnt. Bei Verwendung der ganzen Mikrotiter-Platte, 100 µL Enzymkonjugat in 10 mL Testpuffer verdünnen. Wenn nicht alle 96 Microwells verwendet werden, dann werden pro 16 Vertiefungen (1 Riegel) 20 µL Enzym-Konjugat in 2 mL Testpuffer verdünnt. Diese Enzymkonjugatlösung ist bei 2-8°C für 2 Stunden stabil. Nach Gebrauch das verdünnte Enzymkonjugat verwerfen.

- R7 **Substrat, TMB**: gebrauchsfertige Lösung. Kann im Dunkeln bei 2-8°C für den auf dem Etikett angegebenen Zeitraum gelagert werden.

- R8 **Waschpuffer**: den Inhalt des Beutels in 1 Liter gefiltertem deionisierten bzw. destillierten Wasser auflösen. Der gebrauchsfertige Waschpuffer kann bei 2 - 8°C bis zu 4 Wochen gelagert werden.

PROBENABNAHME UND VORBEREITUNG

Nur Thrombozyten-armes Zitratplasma sollte für den Test verwendet werden. Kein EDTA verwenden. Siehe "Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Tests; Approved Guidelines-Fourth Edition", NCCLS Document H21-A4, Vol. 23, No. 35, December 2003. Die Vorbereitung der Blutproben sollte wie folgt durchgeführt werden:

1. 9 Teile Blut in 1 Teil 3.2% (0.109 M) Trinatrium-Zitrat Antikoagulans Lösung geben.
2. Blut Proben bei 10,000 x g für 15 Minuten zentrifugieren.
3. Das Plasma sollte bei 2°-8°C gelagert und innerhalb von 4 h bestimmt werden. Alternativ kann das Plasma bei -20°C bis zu 6 Monate gelagert werden.
4. Gefrorenes Plasma sollte zügig bei 37°C aufgetaut werden. Aufgetautes Plasma sollte bei 2°-8°C gelagert und innerhalb von 4 Stunden bestimmt werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

Kitkomponenten – Siehe Reagenzien

Notwendige Materialien, die nicht mitgeliefert werden

0.22 µm gefiltertes deionisiertes H₂O
Achtkanal Multipipette für den Volumenbereich 50-300 µL
Einkanalpipetten für den Volumenbereich 0-200, 200-1000 µL
Spektralphotometer für Mikrotiterplatten mit einer Wellenlänge von 450 nm
Orbital-Schüttler für Mikrotiterplatten
Plattenwaschgerät (optional)
0.5 M Schwefelsäure (H₂SO₄) **Achtung:** Schwefelsäure ist mit äußerster Vorsicht zu verwenden. Kontakt mit Haut und Augen ist zu vermeiden. Bei Gebrauch sind Schutzbrille und Schutzhandschuhe zu tragen.

Vorbereitung der ADAMTS13 Standards

1. Teststreifen und Halter aus der Folienverpackung entnehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen in die Folienverpackung zurückgeben. Den Folienbeutel mit dem innen liegenden Trocknungsmittel gut verschließen und bei 2° - 8°C lagern.
2. Den ADAMTS13 Standard, wie unter REKONSTITUTION DER REAGENZIEN angegeben, ansetzen.
3. Fünf serielle Verdünnungen des ADAMTS13 Standards wie folgt ansetzen: je 200 µL des Standards in die Vertiefungen A1 und A2 pipettieren. Je 100 µL Testpuffer in die Vertiefungen B1/B2 – F1/F2 pipettieren. Serielle Verdünnung herstellen, hierzu je 100 µL des Standards aus den Vertiefungen A1/A2 in die Vertiefungen B1/B2 pipettieren. Mischen und je 100 µL aus den Vertiefungen B1/B2 in die Vertiefungen C1/C2 pipettieren. Diesen Vorgang bis zu den Vertiefungen F1/F2 wiederholen. Je 100 µL aus den Vertiefungen F1/F2 entnehmen und verwerfen. Die Konzentrationen der seriell verdünnten Standards betragen: 100, 50, 25, 12.5, 6.25 and 3.12 ng/mL. 100 µL Testpuffer in die Vertiefungen G1/G2 pipettieren (Nullwert, 0 ng/mL).

Testdurchführung

4. Die Plasmaproben 1:20 verdünnen (1 Teil Plasma + 19 Teile Testpuffer). Je 100 µL Positivkontrolle bzw. verdünnte Probe in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettieren. Mit der Azetat-Abdeckfolie bedecken und 1 Stunde bei 37°C inkubieren.
5. Inhalt aus den Vertiefungen entfernen und 4 mal mit Waschpuffer waschen. Dieser Waschschrift kann entweder mit einem Plattenwaschgerät oder manuell durchgeführt werden. Zur manuellen Waschung den Waschpuffer mit einer Spülflasche oder Pipette in die Vertiefungen geben und 3 Minuten warten. Waschpuffer verwerfen und Tropfen entfernen indem die Platte 4-5 mal umgekehrt auf einem Papiertuch ausgeklopft wird.
6. Je 100 µL Detektions-Antikörper in die Vertiefungen pipettieren, mit der Azetat-Abdeckfolie bedecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) auf dem Schüttler bei 250 rpm inkubieren.

7. Vertiefungen wie unter Schritt 5 angegeben waschen.
8. Je 100 µL verdünntes Enzym-Konjugat in die Vertiefungen pipettieren, mit der Azetat-Abdeckfolie bedecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) auf dem Schüttler bei 250 rpm inkubieren.
9. Vertiefungen wie unter Schritt 5 angegeben waschen.
10. Je 100 µL Substrat unmittelbar nach dem letzten Waschschrift in die Vertiefungen pipettieren, mit der Azetat-Abdeckfolie bedecken und 5 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren (blaue Farbentwicklung).
11. Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion je 50 µL 0.5 M H₂SO₄ in die Vertiefungen geben. Platte an den Seiten antippen um eine gleichmäßige Verteilung der H₂SO₄ zu bewirken. Die Lösung färbt sich gelb. Die Extinktion innerhalb von 10 Minuten mit dem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm messen.

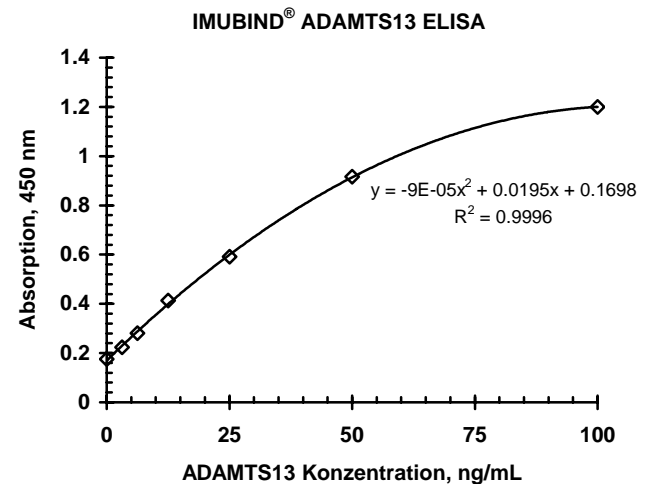
QUALITÄTSKONTROLLE

Die Positiv-Kontrolle sollte bei jedem Testdurchlauf mitgeführt werden.

ERGEBNISSE

Die Standardkurve wird erstellt, indem man die Mittelwerte der gemessenen Extinktionswerte für die einzelnen ADAMTS13 Standards gegen die entsprechende ADAMTS13 Konzentration aufträgt. Bei jeder Testdurchführung ist eine Standardkurve zu erstellen. Nachstehend ein Beispiel für eine Standardkurve (nur zu Demonstrationszwecken):

Repräsentative Standardkurve



BERECHNUNGEN

Die ADAMTS13-Konzentration der verdünnten Plasmaprobe wird direkt aus der Standardkurve interpoliert. Da die Plasmaproben 1:20 verdünnt eingesetzt wurden, müssen die gemessenen Werte mit 20 multipliziert werden um die ADAMTS13 Konzentration in der ursprünglichen Probe zu bestimmen. Die Berechnung erfolgt wie unten stehend:

$$[\text{ADAMTS13}]_{\text{Plasmaprobe}} = [\text{ADAMTS13}]_{\text{verdünnte Plasmaprobe}} \times 20$$

GRENZEN DES VERFAHRENS

Nicht ordnungsgemäß vorbereitete Proben können mit Thrombozyten kontaminiert sein, welche das Testergebnis verfälschen können. Die Plasmaproben müssen Thrombozyten-frei sein um verlässliche Ergebnisse zu erzielen. Besondere Vorsicht ist bei der Überführung des Plasmas nach der Zentrifugation geboten, hierbei darf das Thrombozyten-Sediment nicht aufgewirbelt werden. Die Plasmaproben dürfen höchstens zweimal eingefroren und wieder aufgetaut werden.

EDTA darf **nicht** als Anti-Kogulanz verwendet werden. Ikterische, lipämische und hämolytische Proben können die Testergebnisse verfälschen.

ERWARTETE WERTE

Die ADAMTS13 Konzentration in Zitratplasma von Normal Spendern (n=49) betrug 740 ± 110 ng/mL.⁸ Jedes Laboratorium sollte seinen eigenen Normalbereich bestimmen.

In Plasma von Patienten mit erworbener TTP (n=16) wurde eine ADAMTS13 Konzentration von 244 ± 121 ng/ml gemessen, signifikant niedriger als der Normalwert. Einige Patienten mit angeborener TTP hatten ADAMTS13 Werte unterhalb der Nachweisgrenze des ELISAs.^{9,10}

LEISTUNGSMERKMAL

Präzision

Der Intra-Assay Variationskoeffizient wurde mit 4.0% bestimmt.

Der Inter-Assay Variationskoeffizient wurde mit 7.3% bestimmt.

Spezifität

Der Fänger- und Detektionsantikörper ist hoch-spezifisch für humanes ADAMTS13.

LITERATURHINWEISE

1. Furlan, M., Robles, R. and Lämmle, B. L. *Blood* 1996, **87**: 4223-4234.
2. Tsai, H. M. *Blood* 1996, **87**: 4235-4244.
3. Furlan, M., *et al.* *N Engl J Med* 1998, **339**: 1578-1584.
4. Moake, J. L., *et al.* *N. Engl J Med* 1982, **307**: 1432-1435.
5. Zheng X, *et al.* *J Biol Chem* 2001, **276**: 41059-41063.
6. Levy, G. G., Nichols, W. C. and Lian, E. C. *Nature* 2001, **413**: 488-494.
7. Tsai, H. M., Rice, L. and Sarode, R. *Ann Intern Med* 2000, **132**: 794-799.
8. Unpublizierte Daten von American Diagnostica Inc.
9. Peyvandi, F., *et al.* *Brit J Haematol* 2004, **127**: 433-439.
10. Starke, R., *et al.* *Brit J Haematol* 2006, **136**: 649-655.